

# Výhody a nevýhody klonování v *E. coli*

## Výhody:

- detailně prostudovaný druh
- snadný přenos DNA
  - vysoká účinnost transformace
  - k dispozici jsou R<sup>-</sup> mutanty
  - existuje řada expresních vektorů, s regulovatelnými promotory

## Nevýhody:

- řadu cizorodých proteinů nevytváří ve funkční podobě
- postrádá vedlejší metabolické dráhy
- neexkretuje proteiny
- nepatří k tradičním průmyslovým mikroorganismům

# Poznatky z klonování v G- (jiných než *E. coli*) a G+ bakteriích

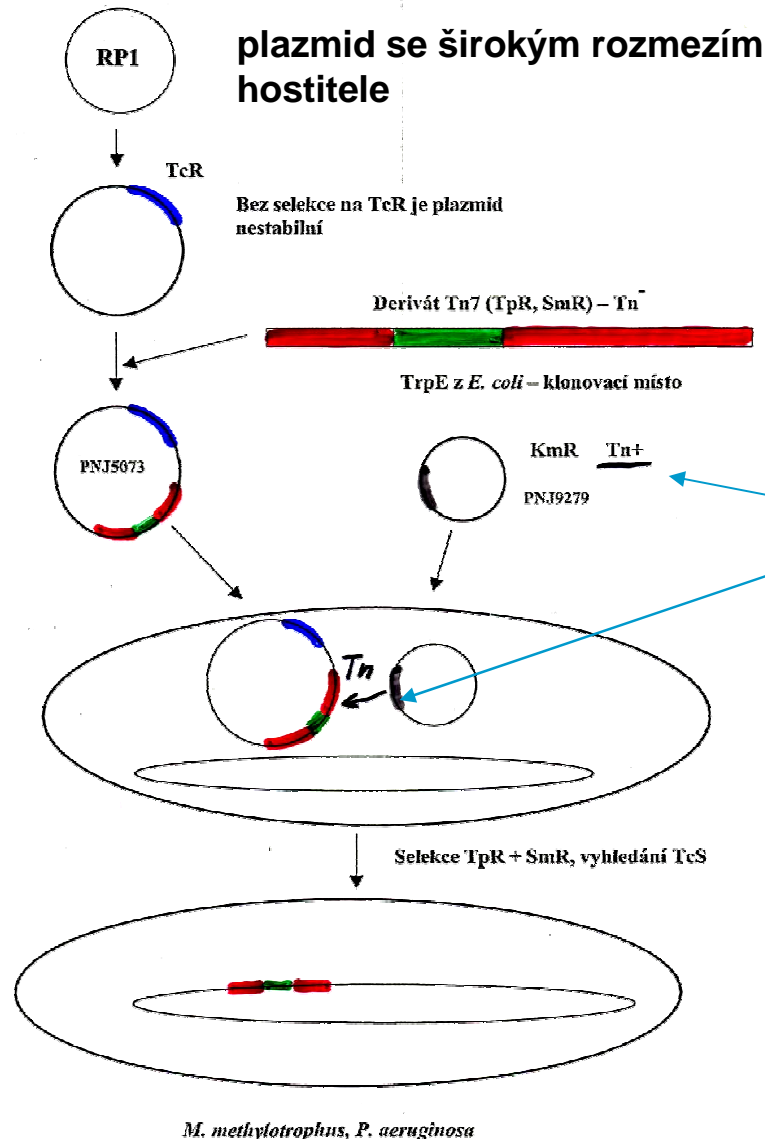
- nedostatek vhodných vektorů
- nízká účinnost přenosu DNA do buněk
- negativní vliv RM-systémů
- nízká exprese klonovaných genů i selekčních markerů
- nízký počet kopií vektorů, jejich nestabilita

**Vhodné jsou vektory se širokým spektrem hostitelů: transpozony**

## **Výhody:**

- stabilní začlenění do chromozomu
- nezatěžují hostitele extrachromozomovou DNA (průmyslové kmeny)

# Využití transpozonů jako vektorů s širokým rozmezím hostitele



## Deriváty Tn7

- gen lacZ spojen s různými vektory (deriváty pUC - vysoký počet kopií)
- vnesení do buněk na sebevražedných vektorech (využití inkompatibility)

Pomocný plazmid = Zdroj transponázy

Stabilní začlenění Tn7 do chromozomu, následné vnášení nových genů do genu trpE (záměny)

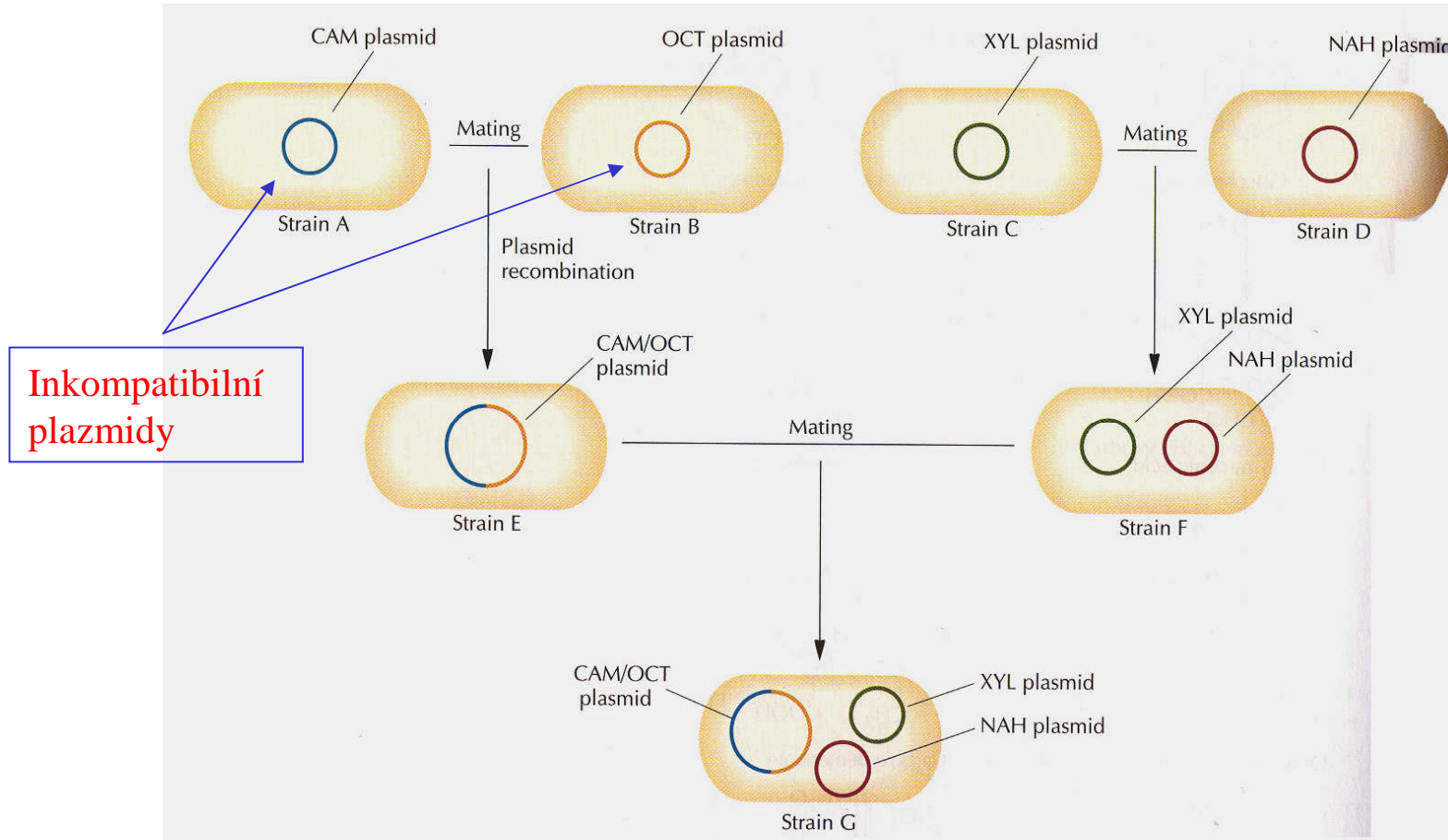
Produkční kmeny

*Micrococcus*, *Pseudomonas*

## Plazmidy *Pseudomonas* (G-) s degradačními vlastnostmi

Name of plasmid	Compound(s) degraded	Plasmid size (kb)
SAL	Salicylate	60
SAL	Salicylate	72
SAL	Salicylate	83
TOL	Xylene and toluene	113
pJP1	2,4-D	87
pJP2	2,4-D      Dichlorofenoxyoctová kyselina	54
pJB3	2,4-D	78
CAM	Camphor	225
XYL	Xylene	15
pAC31	3,5-Dichlorobenzoate	108
pAC25	3-Chlorobenzoate	102
pWWO	Xylene and toluene	176
NAH	Naphthalene	69
XYL-K	Xylene and toluene	135

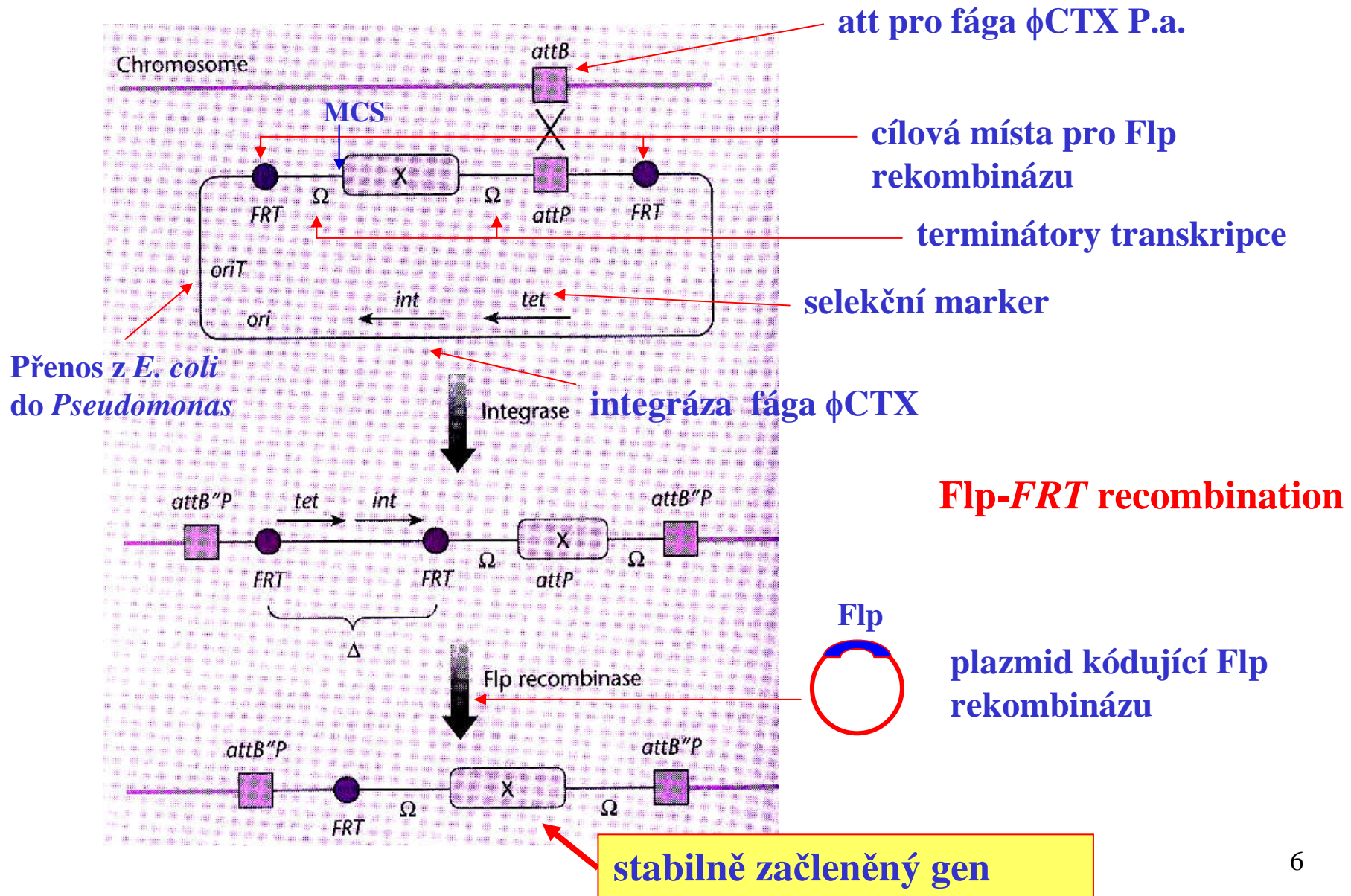
# Vývoj bakteriálního kmene s několika degradačními aktivitami



**CAM – kafr, OCT – octan, XYL – xylen, NAH - naftalen**

**První patent udělený v USA GMO-mikroorganismu**

# Použití integračních vektorů pro vnášení genů (X) do chromozomu u *Pseudomonas aeruginosa*



# Výhody klonování genů v *Bacillus* spp.

- produkují velká kvanta extracelulárních enzymů, které lze snadno izolovat z media
- lze je snadno kultivovat a adaptovat na řadu podmínek kultivace
- lze připravit celou řadu mutantů, hyperprodukcí enzymů a jiné látky
- jsou nepatogenní pro vyšší organismy
- jsou modelem diferenciací prokaryotických buněk

*Itahiki-natto* - národní potrava v Japonsku, fermentované sojové boby.



**Natto je tradiční japonská potravina, fermentovaná sója, která se používá v japonské kuchyni, ale i v tradiční medicíně. Má charakteristický, velmi nepříjemný zápach, způsobený přítomností vitamínu K2. Japonci se dožívají velmi vysokého věku, což je částečně připisováno i vysoké spotřebě sojových produktů a hlavně "natto". Využívá se přitom její jednoznačný trombolytický účinek.**

**Mezi nejúčinnější komponenty "natto" patří fibrinolytický enzym "natokináza". Snižuje viskozitu krve a tím zabraňuje zpomalení toku krve a možnosti vytvoření trombu. Jeho antikoagulačně-fibrinolytický účinek je velmi vyrovnaný a zabraňuje možnosti nadměrného rozpouštění fibrinu.**

**Kdy Natto NKCP pomáhá:**

**při nutnosti zvýšit prokrvování mozkových cév,**

**při potřebě zvýšit přítok krve v srdečních cévách, je prevencí infarktu,**

**je součástí prevence vzniku trombóz v těhotenství, po operaci, při onkologických onemocněních, při cukrovce, při užívání antikoncepce apod.,**

**při problémech v oblasti dolních končetin (potrombotické stavy, bércové vředy, otoky, zvýšená pigmentace, nedokrvování končetin),**

**je prevencí tzv. economy class syndromu (trombózy v průběhu dlouhých a častých letů letadlem),**

**při arterioskleróze,**

**při osteoporóze**



# Příklady látek připravovaných v druzích r. *Bacillus*

*B. amyloliquefaciens* - 90% průmyslově vyráběných enzymů

- alfa-amyláza, celuláza
- dextranáza, maltáza, pektátlyáza
- esteráza, alkalická fosfatáza
- proteázy (subtilizin)
- lysozym
- pektináza

***B. thuringiensis*:  $\delta$ -toxin**

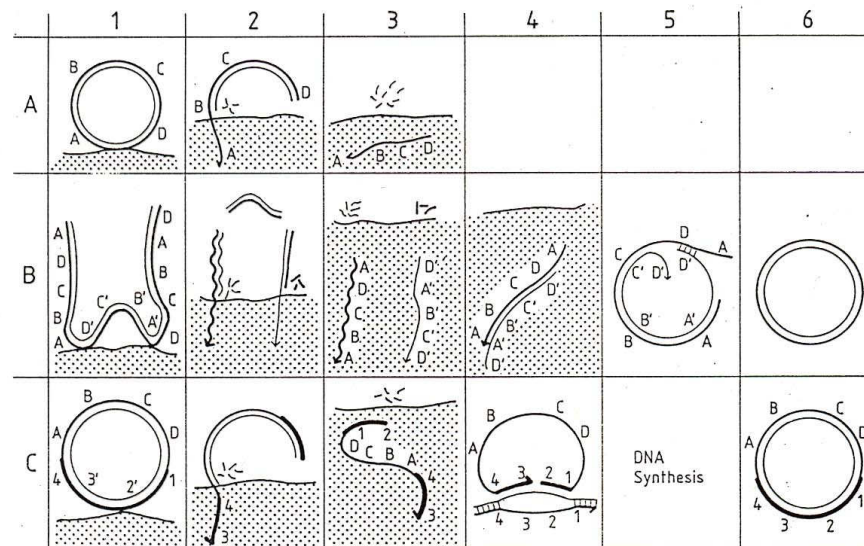
Cizorodé látky

- interferon (myší, lidský)
- proinzulin

# Možnosti přenosu DNA do *B. subtilis*

1. Transformace kompetentních buněk
2. Transformace plazmidovým vektorem nesoucím homologní sekvenec („plasmid rescue“)
3. **Transformace protoplastů (umělá transformace!)**

Transformace kompetentních buněk *B. subtilis* plazmidovou DNA (CCC forma)



- A. Monomerní heterologní plazmidová DNA
- B. Oligomerní plazmidová DNA
- C. Monomerní plazmidová DNA s částečnou homologií k chromozomové DNA *B. subtilis*. Oblasti homologie jsou znázorněny tučně.

## Srovnání různých metod pro transformaci buněk *B. subtilis*

System	Efficiency (transformants/ $\mu\text{g}$ DNA)	Advantages	Disadvantages	
Competent cells	Unfractionated plasmid	$2 \times 10^4$	Competent cells readily prepared. Transformants can be selected readily on any medium. Recipient can be $\text{Rec}^-$ .	Requires plasmid oligomers or internally duplicated plasmids which makes shotgun experiments difficult unless high DNA concentrations and high vector/donor DNA ratios are used. Not possible to use phosphatase-treated vector
	Linear	0		
	CCC monomer	$4 \times 10^4$		
	CCC dimer	$8 \times 10^3$		
	CCC multimer	$2.6 \times 10^5$		
Plasmid rescue	Unfractionated plasmid	$2 \times 10^6$	Oligomers not required. Can transform with linear DNA. Transformants can be selected on any medium	Transformants contain resident plasmid and incoming plasmid and these have to be separated by segregation or retransformation. Recipient must be $\text{Rec}^+$
Protoplasts	Unfractionated plasmid	$3.8 \times 10^6$	Most efficient system. Gives up to 80% transformants. Does not require competent cells. Can transform with linear DNA and can use phosphatase-treated vector	Efficiency lower with molecules which have been cut and re-ligated. Efficiency also very size-dependent, and declines steeply as size increases
	Linear	$2 \times 10^4$		
	CCC monomer	$3 \times 10^6$		
	CCC dimer	$2 \times 10^6$		
	CCC multimer	$2 \times 10^6$		

**Hlavní výhoda: účinný přenos monomerních plazmidových molekul, nezávislý na rekombinaci – DNA je přijímána jako dsDNA**

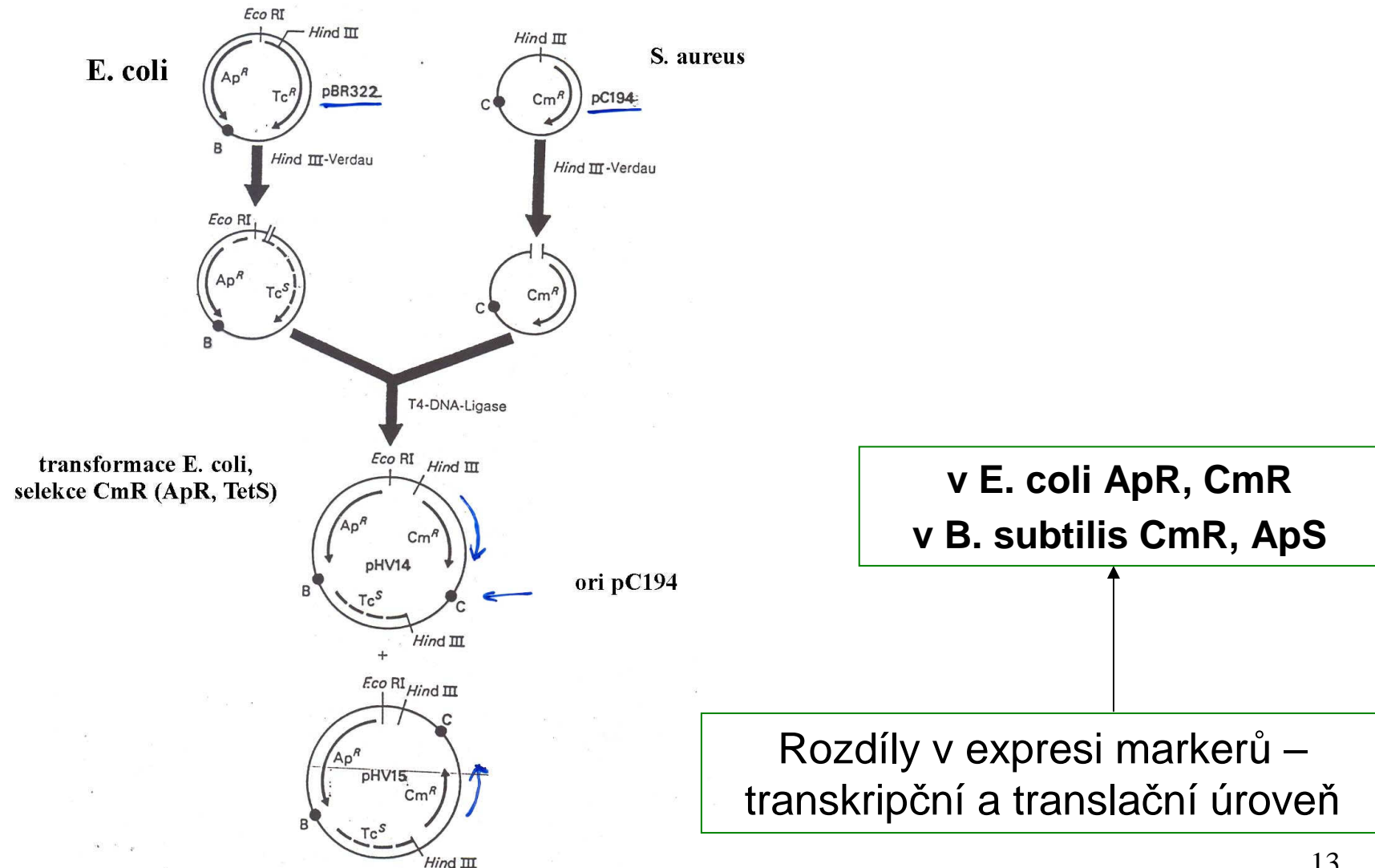
## Plazmidy *r. Bacillus*:

- kryptické
- značně veliké, nevhodné pro konstrukci vektorů
- chybí vhodné selekční markery

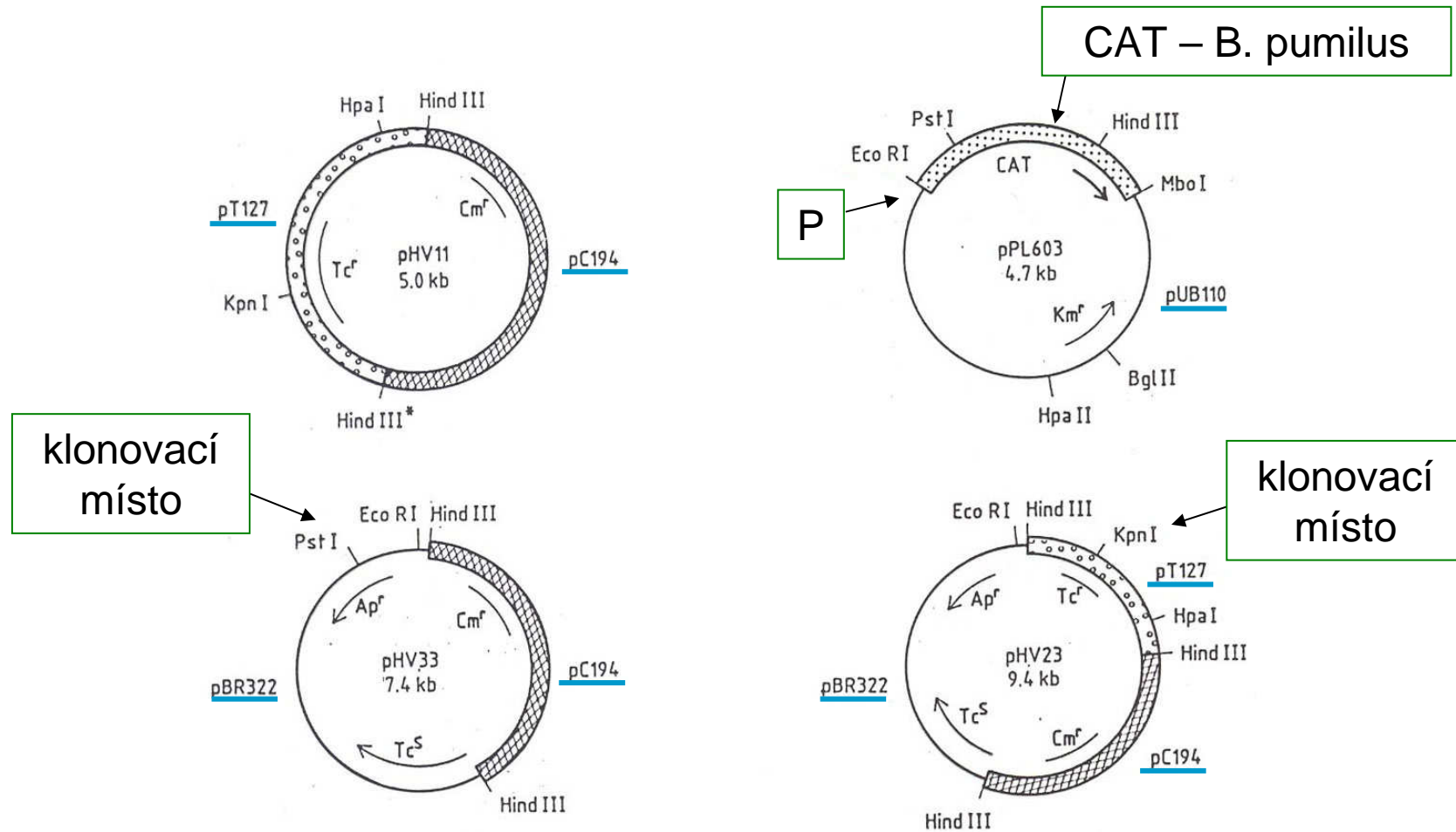
<b>Plazmidy <i>S.aureus</i> vhodné pro transformaci <i>B. subtilis</i></b>			
Plasmid	Fenotyp hostitelské buňky	Velikost	
pC194	Chloramphenicol-Resistenz	$1,8 \cdot 10^6$	<b>Počet kopií 20-50</b>
pE194	Erythromycin-Resistenz	$2,3 \cdot 10^6$	
pSA0501	Streptomycin-Resistenz	$2,7 \cdot 10^6$	
pUB110	Kanamycin-Resistenz	$3,0 \cdot 10^6$	
pT127	Tetracyclin-Resistenz	$2,9 \cdot 10^6$	

Izolace plazmidových mutant se zvýšeným počtem kopií (800-1000)

# Konstrukce pendlujících vektorů pHV14 a pHV15



# Chimerické pendující vektory pro klonování v *B. subtilis*



CAT – *B. pumilus*

P

klonovací místo

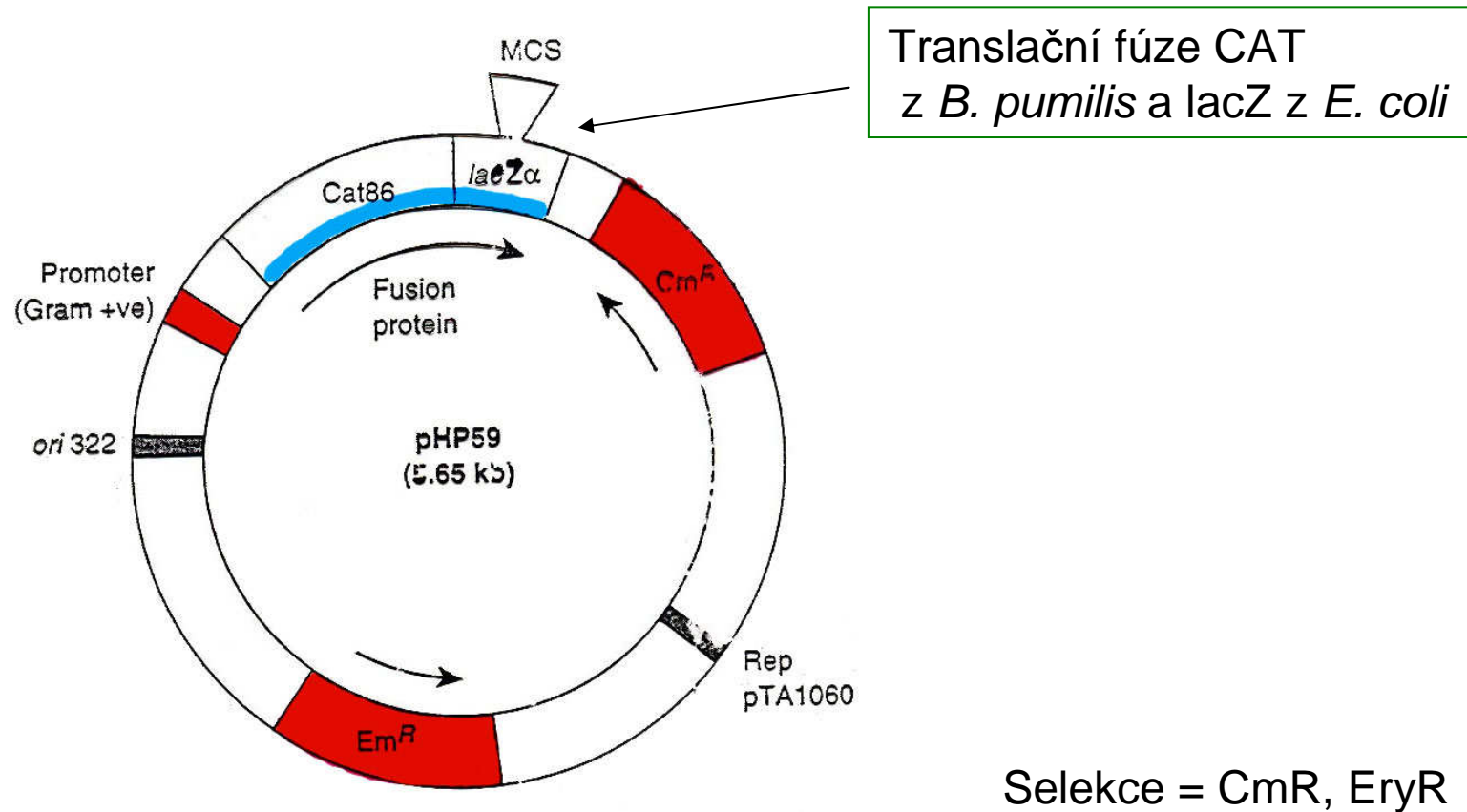
klonovací místo

**Table 12.4 *B. subtilis* – *E. coli* kyvadlové (shuttle) plasmidy**

Plasmid	Size (kbp)	Replicon		Markers		Comments
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	
pHV14	4.6	pBR322	pC194	Ap,Cm	Cm	pBR322/pC194 fusion. Sites: <i>Pst</i> I, <i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I, <i>Nco</i> I (Ehrlich 1978)
pHV15	4.6	pBR322	pC194	Ap,Cm	Cm	pHV14, reversed orientation of pC194 relative to pBR322
pHV33	4.6	pBR322	pC194	Ap,Tc,Cm	Cm	Revertant of pHV14 (Primrose & Ehrlich 1981)
pEB10	8.9	pBR322	pUB110	Ap,Km	Km	pBR322/pUB110 fusion (Bron <i>et al.</i> 1988)
pLB5	5.8	pBR322	pUB110	Ap,Cm,Km	Cm,Km	Deletion of pBR322/pUB110 fusion, <i>Cm<sup>R</sup></i> gene of pC194 Segregationally unstable (Bron & Luxen 1985). Sites: <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Bq</i> III (in <i>Km<sup>R</sup></i> gene), <i>Nco</i> I (in <i>Cm<sup>R</sup></i> gene)
pHP3	4.8	pBR322	pTA1060	Em,Cm	Em,Cm	Segregationally stable pTA1060 replicon (Peeters <i>et al.</i> 1988). Copy number, ca. 5. Sites: <i>Nco</i> I ( <i>Cm<sup>R</sup></i> gene), <i>Bcl</i> I and <i>Hpa</i> I (both <i>Em<sup>R</sup></i> gene)
pHP3Ff	5.3	pBR322	pTA1060	Em,Cm	Em,Cm	Like pHP3; phage f1 replication origin and packaging signal
pGPA14	5.8	pBR322	pTA1060	Em	Em	Stable pTA1060 replicon. Copy number, ca. 5. $\alpha$ -Amylase-based selection vector for protein export functions (Smith <i>et al.</i> 1987). MCS of M13mp11 in <i>lacZ<math>\alpha</math></i>
pGPB14	5.7	pBR322	pTA1060	Em	Em	As pGPA14, probe gene TEM- $\beta$ -lactamase
pHP13	4.9	pBR322	pTA1060	Em,Cm	Em,Cm	Stable pTA1060 replicon. Copy number, ca. 5. Efficient (shotgun) cloning vector (Haima <i>et al.</i> 1987). MCS of M13mp9 in <i>lacZ<math>\alpha</math></i> <i>LacZ<math>\alpha</math></i> not expressed in <i>B. subtilis</i> . Additional sites: <i>Bcl</i> I and <i>Hpa</i> I (both <i>Em<sup>R</sup></i> gene)
pHV1431	10.9	pBR322	pAM $\beta$ 1	Ap,Tc,Cm	Cm	Efficient cloning vector based on segregationally stable pAM $\beta$ 1 (Janni $\grave{e}$ re <i>et al.</i> 1990). Copy number, ca. 200. Sites: <i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Nco</i> I. Structurally unstable in <i>E. coli</i>
pHV1432	8.8	pBR322	pAM $\beta$ 1	Ap,Tc,Cm	Cm	pHV1431 lacking stability fragment orfH. Structurally stable in <i>E. coli</i>
pHV1436	8.2	pBR322	pTB19	Ap,Tc,Cm	Cm	Low-copy-number cloning vector (Janni $\grave{e}$ re <i>et al.</i> 1990) Structurally stable

- Problémy:**
1. Nestabilita plazmidů (segregační a strukturní)
  2. Restrikce exogenní DNA

# Struktura vektoru pro přímou selekci v *B. subtilis*



**Recipient:** *B. subtilis* 6GM15 – obsahuje lacZD15 napojený na G+promotor + signály pro iniciaci translace



# Faktory ovlivňující expresi klonovaných genů v *B. subtilis*

- **transkripce:** značný počet sigma-faktorů rozpoznávajících různé promotory
- **translace:**
  - vyšší stupeň konzervovanosti oblastí mRNA vázajících se na ribozomy,
  - odlišnost iniciačního kodonu (UUG n. GUG namísto AUG, aj),
  - odlišné ribozomové proteiny zajišťující vazbu mRNA (nastavení SD- AUG na 30S)
  - odlišné využívání kodonů
- **transport:** signální sekvence (stejná funkce jako u *E. coli*)

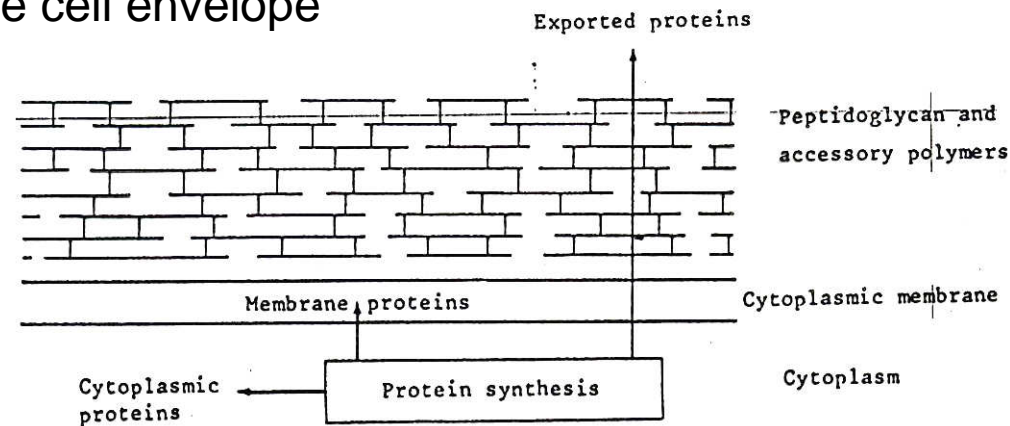
## Degradace proteinů vlivem silné proteolytické aktivity

- nutnost používat indukovatelné promotory: CAT
- snížení rozkladu přípravou proteáza-deficientních mutant (odstranění 6-8 exoproteáz: prodloužení poločasu rozpadu z 1,5 na 85 hodin)

# Lokalizace proteinů u G+ a G- bakterií

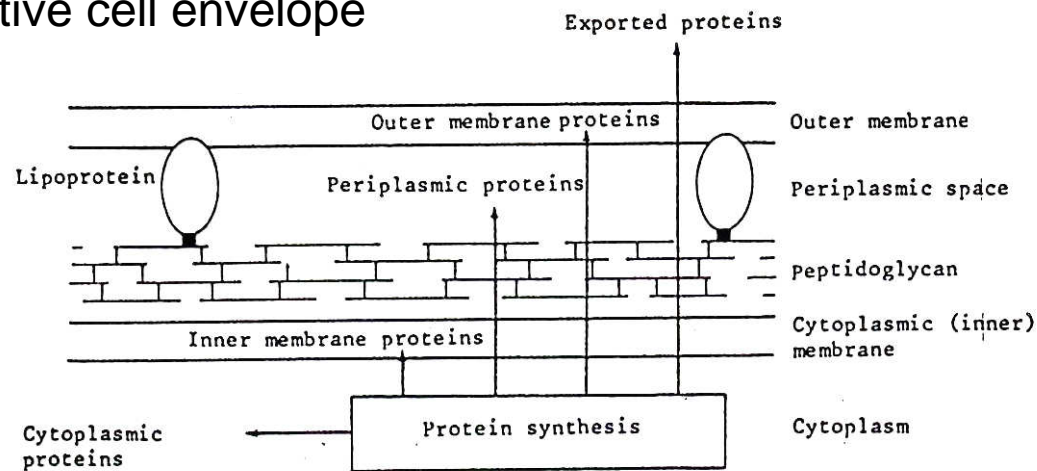
## a) Gram-positive cell envelope

G+



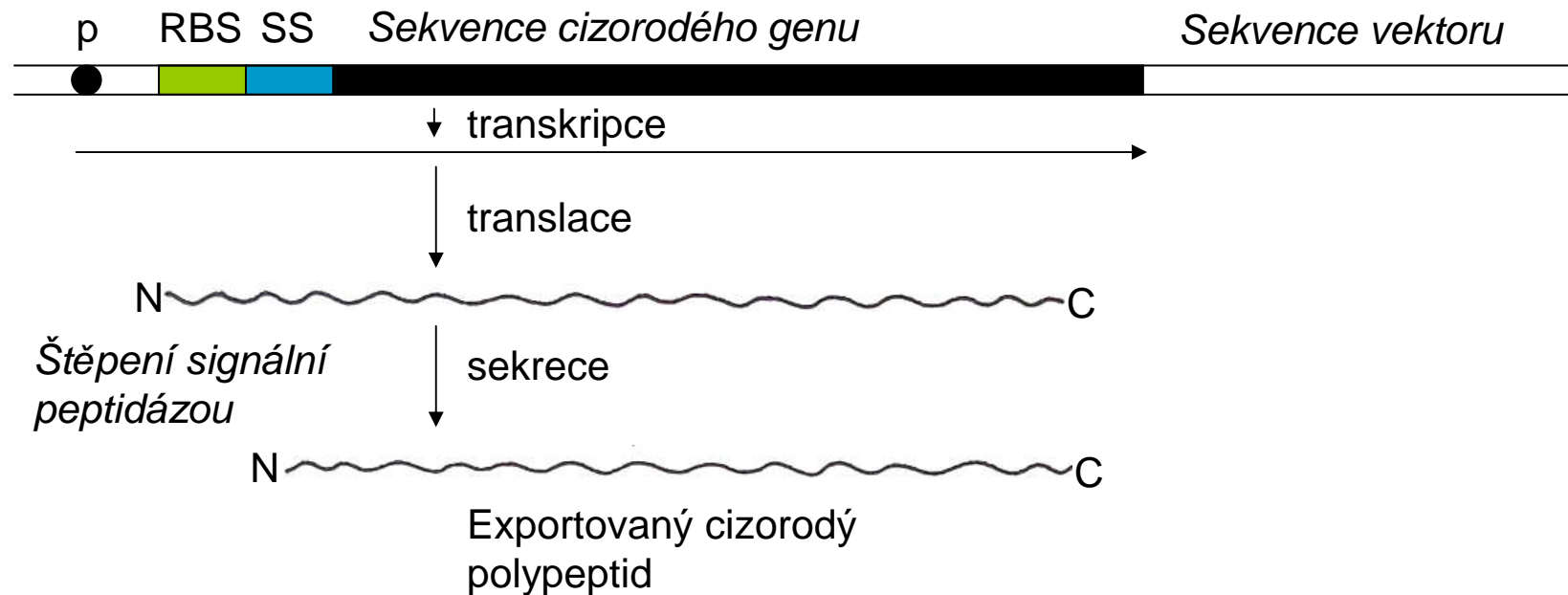
## b) Gram-negative cell envelope

G-



# Expresse cizorodých genů v *B. subtilis* s využitím sekrečního vektoru

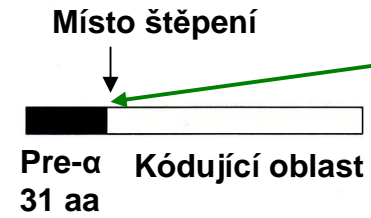
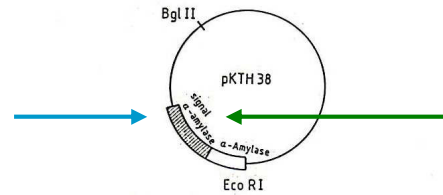
**SS = signální sekvence alfa-amyláza z *B. amyloliquefaciens***



**Signální sekvence u *Bacillus* jsou delší než u G- bakterií a eukaryot**

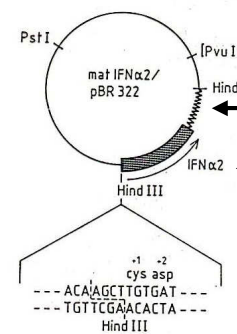
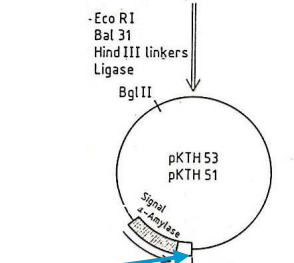
# Konstrukce plazmidového vektoru pro sekreci interferonu

Signální sekvence alfa-amylázy včetně promotoru



Odštěpení signální sekvence alfa-amylázy probíhá přesně za 31 aa Pre- $\alpha$

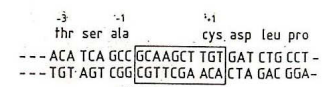
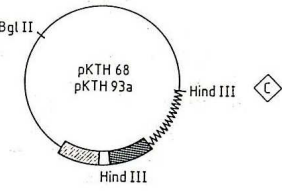
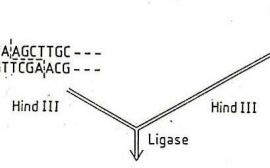
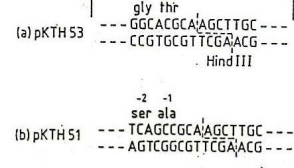
Zkrácení oblasti kódující alfa-amylázu



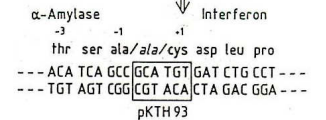
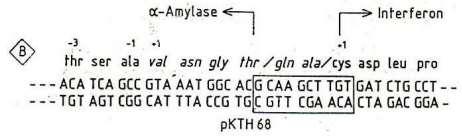
Plazmid nesoucí gen pro zralý IFN $\alpha$ 2

Nekódující sekvence

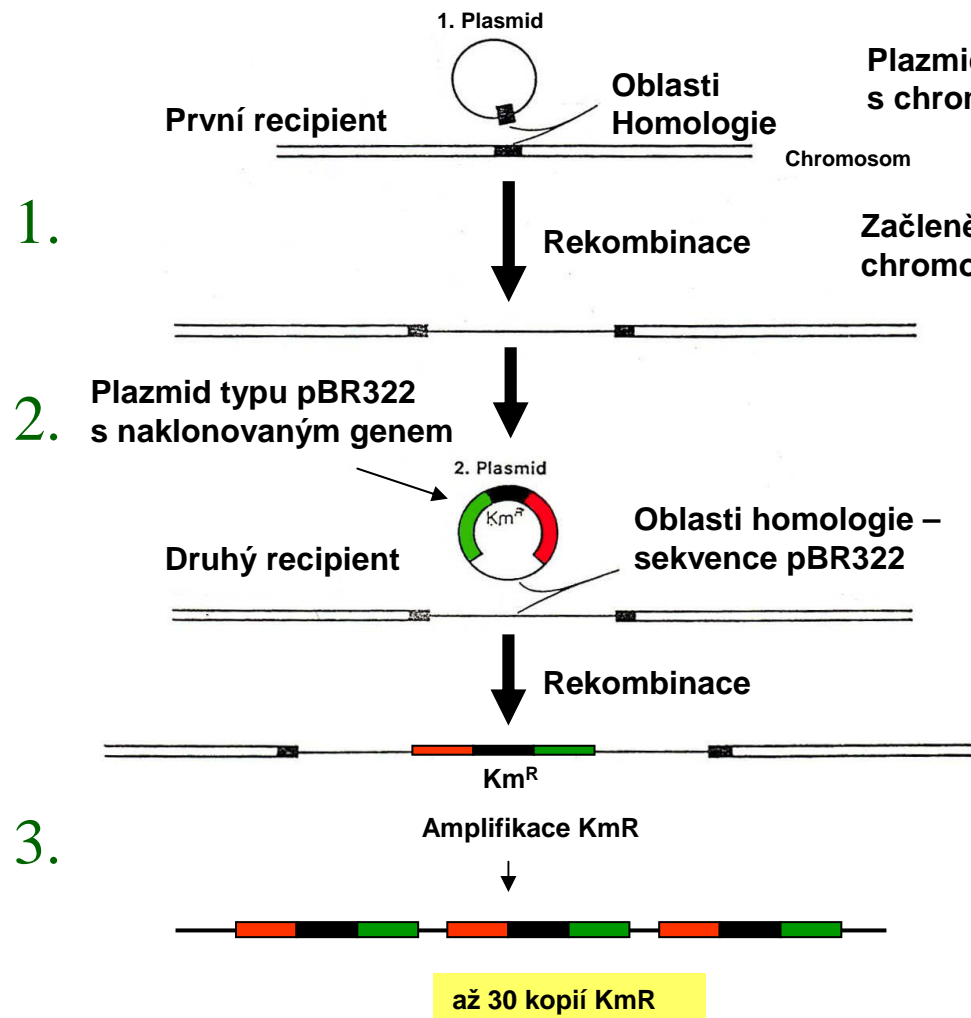
Kódující sekvence



Optimalizace spojení kódujících sekvencí



# Vnášení heterologních plazmidů do *B. subtilis* s využitím „lešení“ („scaffolding“)



1. Vytvoření oblasti homologie pro začlenění klonovacího vektoru
2. Klonování genu zájmu a jeho přenos do recipienta
3. Možná amplifikace začleněného genu – selekce na AntR

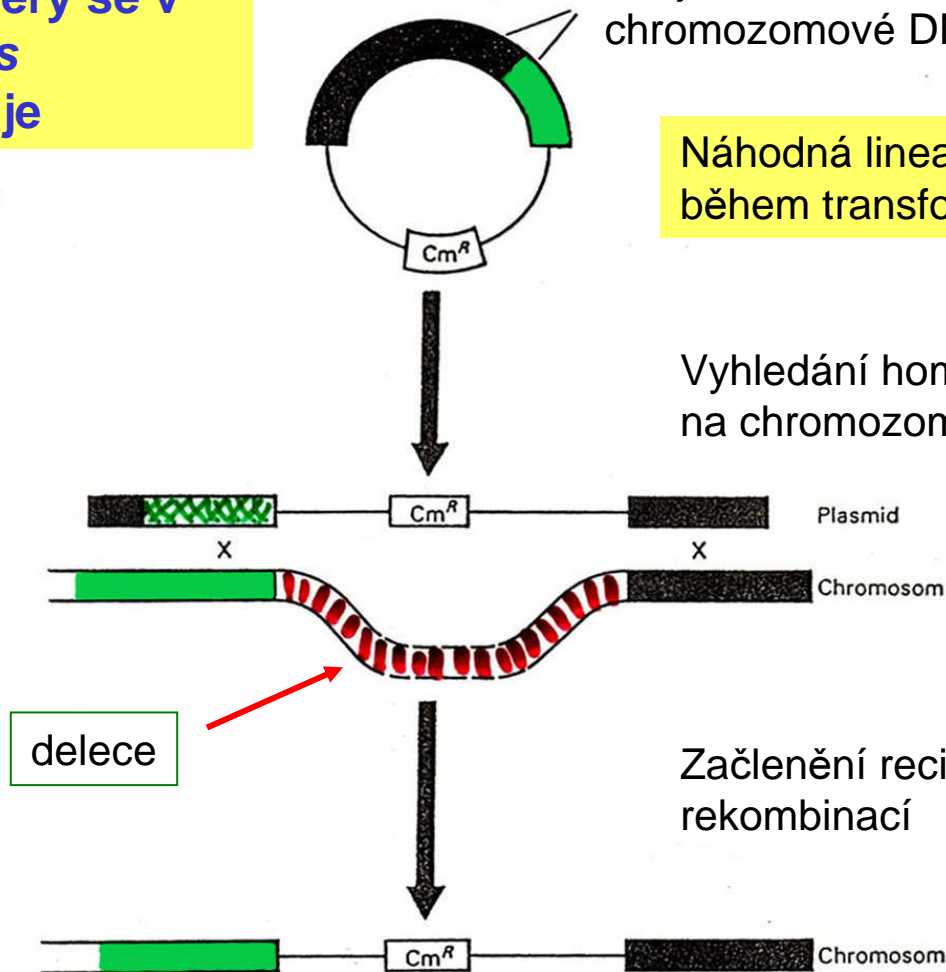
# Vytváření delecí v chromozomu *B. subtilis*

vektor, který se v *B. subtilis* nereplikuje

Vzájemně nesousedící oblasti chromozomové DNA *B. subtilis*

Náhodná linearizace DNA během transformace

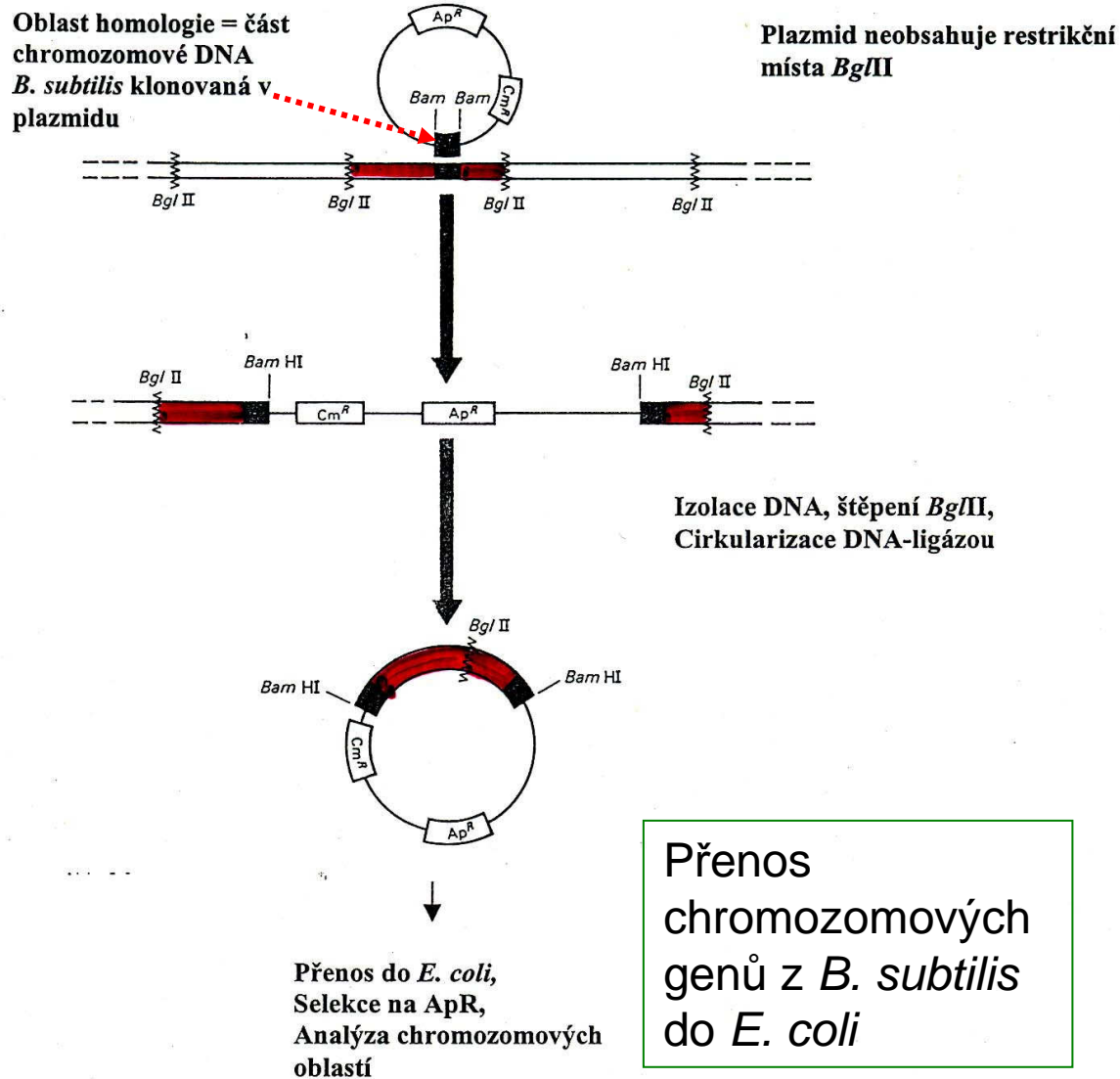
Vyhledání homologních oblastí na chromozomu *B. subtilis*



Začlenění reciproknou rekombinací

Selekce klonů CmR 22

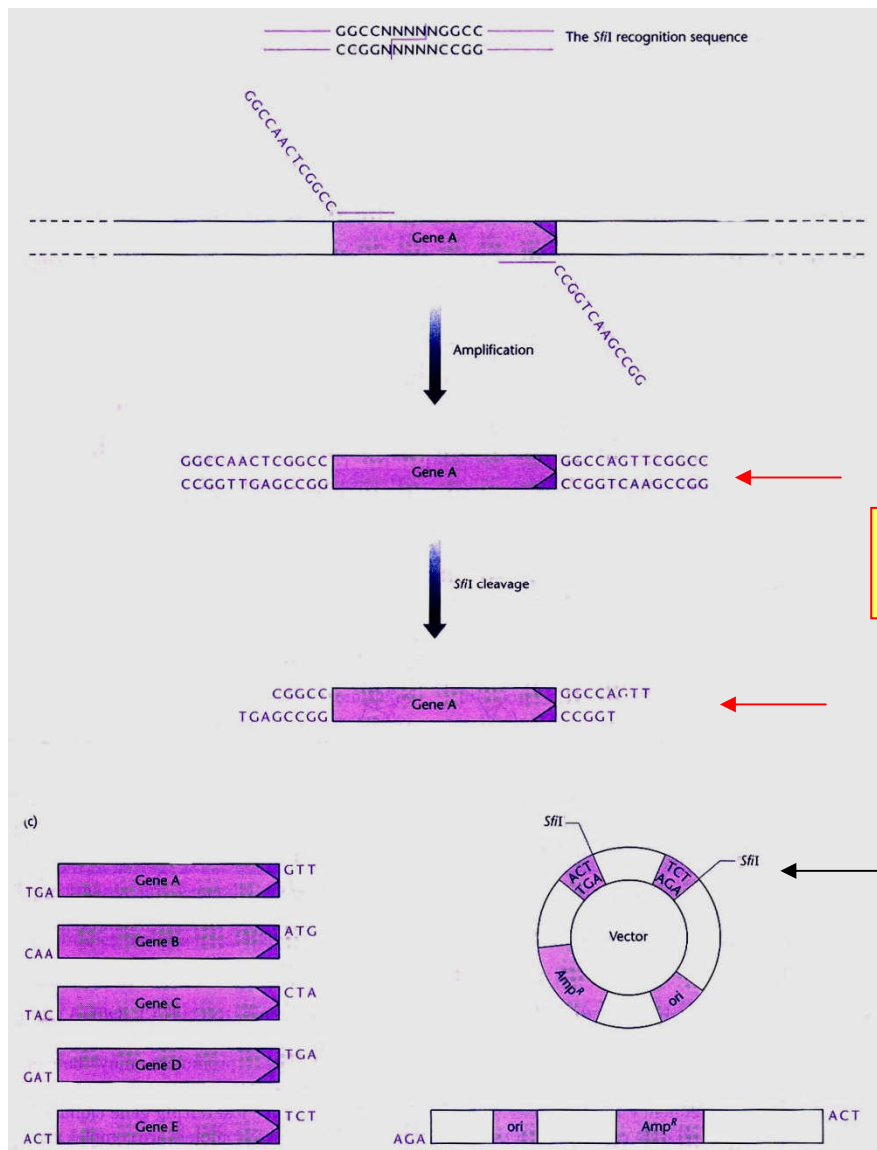
# Klonování sekvencí chromozomu sousedících s místy začlenění plazmidového vektoru



# Klonování klastrů genů v požadovaném pořadí

Rozpoznávací sekvence *Sfi*I –  
vnitřní část (NNNN) je variabilní  
(vzácně štěpící enzym)

Amplifikace genu A pomocí PCR  
s primery nesoucími v extenzích  
místa *Sfi*I s vhodně navrženou vnitřní  
sekvencí



PCR produkt s extenzemi *Sfi*I

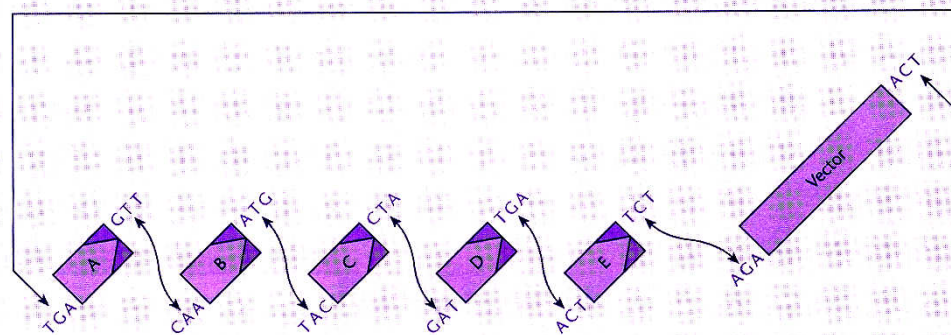
Vnitřní NNNNN má odlišnou podobu u  
každého z amplifikovaných genů

PCR produkt po štěpení *Sfi*I

Klonovací vektor



# Klonování klastrů genů v požadovaném pořadí – pokrač.



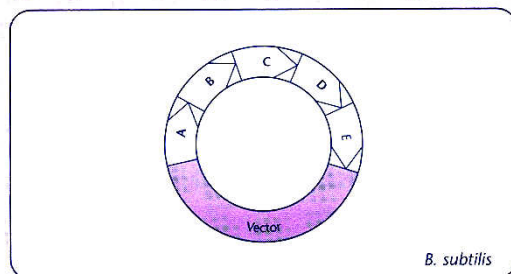
Formation of multimers on ligation

## štěpení rekombinantních vektorů a jejich ligace



přenos lineárních molekul do buněk *B. subtilis* transformací

v buňkách se rekombinantní vektor cirkularizuje



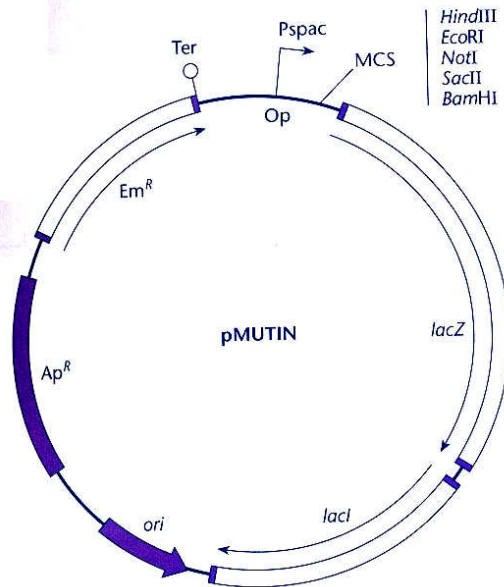
Vzájemné spojení genů vybavených *SfiI* místy a jejich začlenění do vektoru

*B. subtilis* lze transformovat lineárními DNA za předpokladu, že obsahují duplikace

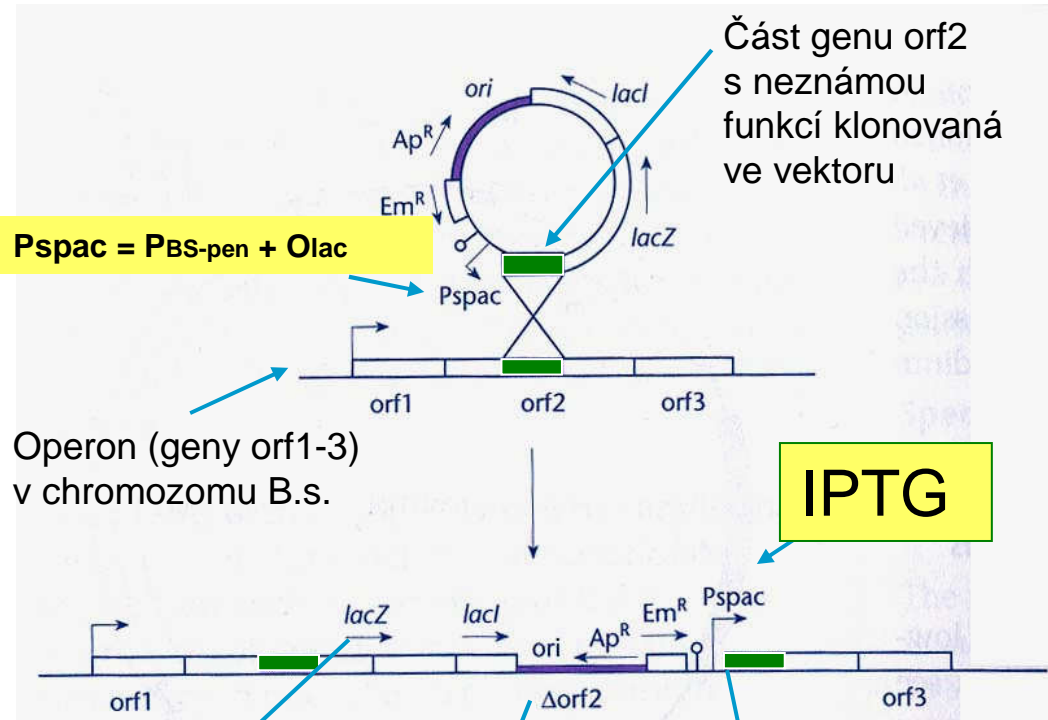
**Příklad: příprava kmene *B. subtilis* pro tvorbu hydrokortizonu postupným spojením 8 genů**

# Analýza genů s neznámou funkcí v *B. subtilis* pomocí vektoru pMUTIN

## Vektor pMUTIN



- vektor není schopen se replikovat v *B. subtilis*, což umožňuje provádět inzerční mutagenézu
- reportérový gen *lacZ* usnadňuje sledovat expresi cílového genu
- promotor *Pspac* umožňuje navodit expresi genů nacházejících se v témže operonu jako cílový gen



Operon (geny orf1-3) v chromozomu *B.s.*

Reportérový gen je exprimován (vytvoří se transkripční fúze)

orf2 je inzerčně inaktivován

exprese genů po směru transkripce od orf2

## Charakteristika promotoru P<sub>spac</sub>

$$P_{\text{spac}} = P_{\text{BSp<sub>en</sub>} + O_{\text{lac}}$$

### hybridní promotor regulovatelný v bacilech pomocí IPTG

K 3' konci promotoru genu pro penicilinázu z *B. licheniformis* (*P<sub>BSp<sub>en</sub></sub>*) byl připojen lac operátor z *E. coli* (*O<sub>lac</sub>*).

Gen kódující lac represor z *E. coli* byl zařazen pod kontrolu bacilového promotoru a RBS umožňujících jeho expresi v *B. subtilis*

*Promotor je aktivní v řadě dalších G+ bakterií (stafylokoky, streptokoky...)*

# Klonování ve streptomycetách

- producenti antibiotik (60%) a extracelulárních proteinů (enzymy a inhibitory enzymů)  
**(neomycin, cypemycin, grisemycin, bottromycins, chloramphenicol)**
- přenos transformací do protoplastů (PEG)
- vektory odvozeny z plazmidů (SCP2) – charakter kyvadlových vektorů
- selekční markery – antibiotika (thiostrepton, viomycin, neomycin nebo metylenomycin)
- fágové vektory podobné lambda fágu (např.  $\Phi$ C31) – přenos transformací do lyzogenů nebo má vektor sekvenci homologickou s chromozomem recipienta

## **Přenos kompletní biosyntetické dráhy pro tvorbu antibiotik**

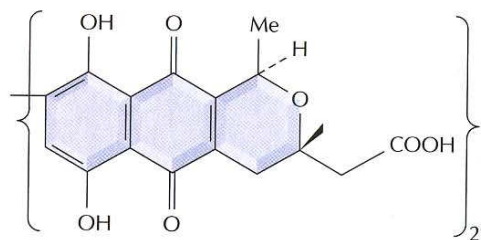
**Klonování velkých úseků (40-100 kb) genomové DNA streptomycet ve vektorech BAC, pak přenos vektorů elektroporací do buněk streptomycet (nebo do protoplastů) a selekce klonů, v nichž se klonovaný úsek začlenil do chromozomu**

## Antibiotika vytvářené různými kmeny streptomycet a kmeny s geny vnesenými na plazmidech pIJ2303 a pIJ2315

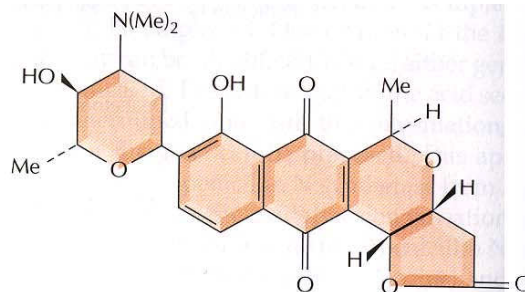
Strain/plasmid	Color of culture		Antibiotic(s)
	Acidic	Alkaline	
<i>S. coelicolor</i>	Red	Blue	Actinorhodine
<i>Streptomyces</i> sp.	Yellow	Brown	Medermycin
<i>Streptomyces</i> sp./pIJ2303	Red	Blue	Medermycin, actinorhodine
<i>Streptomyces</i> sp./pIJ2315	Red	Purple	Mederrhodine A, medermycin
<i>S. violaceoruber</i> B1140	Red	Blue-purple	Granaticin, dihydrogranaticin
<i>S. violaceoruber</i> B1140/pIJ2303	Red	Blue-purple	Granaticin, dihydrogranaticin, actinorhodine
<i>S. violaceoruber</i> Tü22	Red	Blue-purple	Granaticin, dihydrogranaticin
<i>S. violaceoruber</i> Tü22/pIJ2303	Red	Blue-purple	Dihydrogranatirhodine, actinorhodine

**Do buněk kmene streptomycet produkujícího určité antibiotikum se vnese transformací plazmid obsahující všechny nebo část genů kódujících příbuzné antibiotikum. Kmen pak vedle původního antibiotika vytváří nové antibiotikum, které je mírně odlišnou strukturální variantou toho původního.**

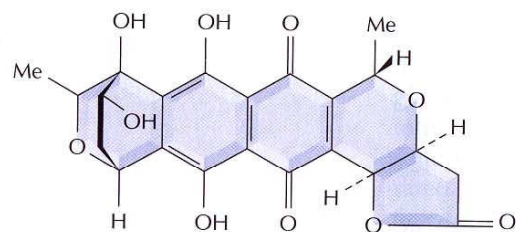
# Struktura přírodních a hybridních isochromanchinonových antibiotik vytvářených streptomycetami po přenosu plazmidu



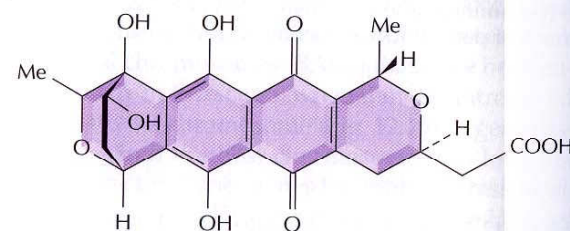
Actinorhodine



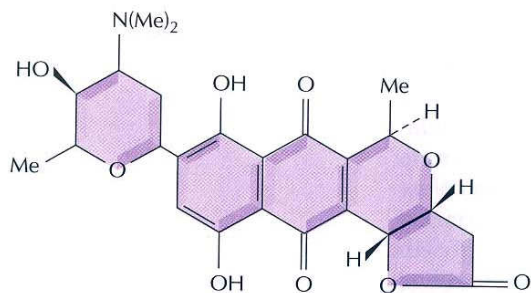
Medermycin



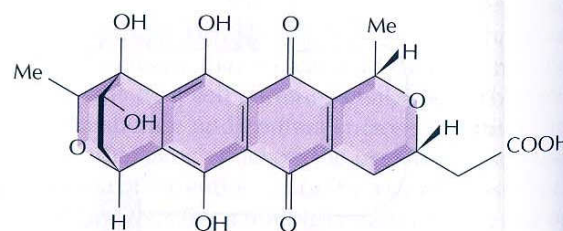
Granaticin



Dihydrogranaticin



Mederrhodine A



Dihydrogranatirhodine

přírodní

hybridní

# Klonování genů v archeích

- extremofilní organismy (T, pH, konc. solí)
- jedinečné fyziologické vlastnosti (např. striktně anaerobní a metanogenní, halofilní) – enzymy pro průmyslové využití

## Přenos genů:

- elektroporace, nízká účinnost
- transformace zprostředkovaná PEG
- transformace zprostředkovaná lipozomy

**Vektory:** používány jako kyvadlové, některé se integrují do chromozomu (inz. inaktivace)

- plazmidy
- viry

**Selekční markery:** rezistence k antibiotikům (puromycin, novobiocin, thiostreptin, mevinolin)

**Reportérové geny:**  $\beta$ -glukuronidáza,  $\beta$ -galaktozidáza, trehaláza

