

Výhody a nevýhody klonování v *E. coli*

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

= řadu cizorodých proteinů nevytváří ve funkční podobě

= postrádá vedlejší metabolické dráhy

= neexkretuje proteiny

= nepatří k tradičním průmyslovým mikroorganismům

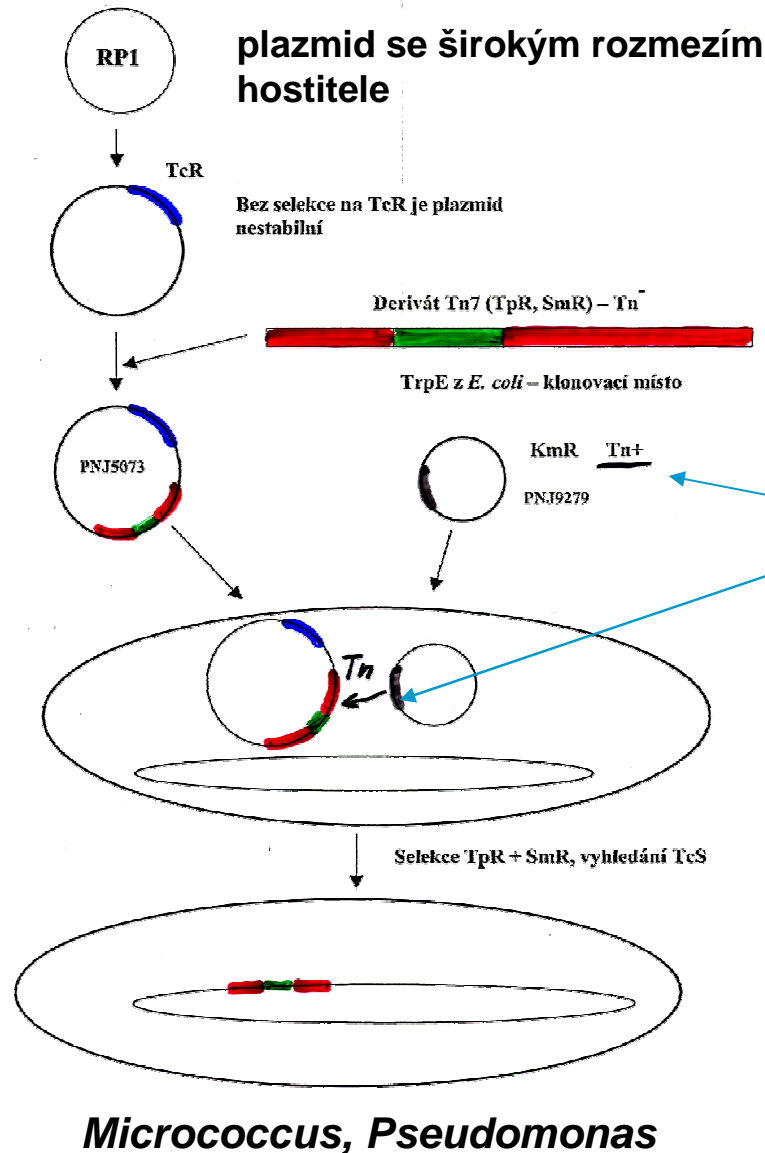
Poznatky z klonování v G- (jiných než E.coli) a G+ bakteriích

- 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

- 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 do chromozomu, následné vnášení nových genů do genu trpE

Produkční kmeny

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 diferenciace prokaryotických buněk

Itohiki-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 trombolitický 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 fibrínu.

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*: δ -toxin**

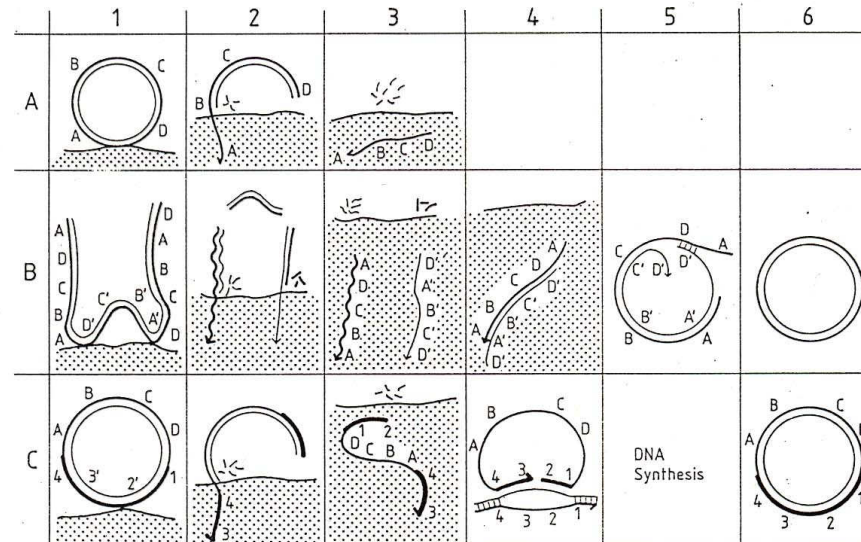
Cizorodé látky

- interferon (myší, lidský)
- proinzulin

Možnosti přenosu DNA do *B. subtilis*

1. Transformace kompetentních buněk
2. Transformace plazmidovým vektorem nesoucím homologní sekvenční („plasmid rescue“)
3. **Transformace protoplastů**

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.

Table 12.2 Comparison of the different methods of transforming *B. subtilis*

System	Efficiency (transformants/ μg DNA)	Advantages	Disadvantages	
Competent cells	Unfractionated plasmid	2×10^4	Competent cells readily prepared. Transformants can be selected readily on any medium. Recipient can be 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	4×10^4		
	CCC dimer	8×10^3		
	CCC multimer	2.6×10^5		
Plasmid rescue	Unfractionated plasmid	2×10^6	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 Rec^+
	Unfractionated plasmid	3.8×10^6	Most efficient system.	Efficiency lower with molecules which have been cut and re-ligated. Efficiency also very size-dependent, and declines steeply as size increases
Protoplasts	Linear	2×10^4	Gives up to 80% transformants.	
	CCC monomer	3×10^6	Does not require competent cells.	
	CCC dimer	2×10^6	Can transform with linear DNA and	
	CCC multimer	2×10^6	can use phosphatase-treated vector	

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

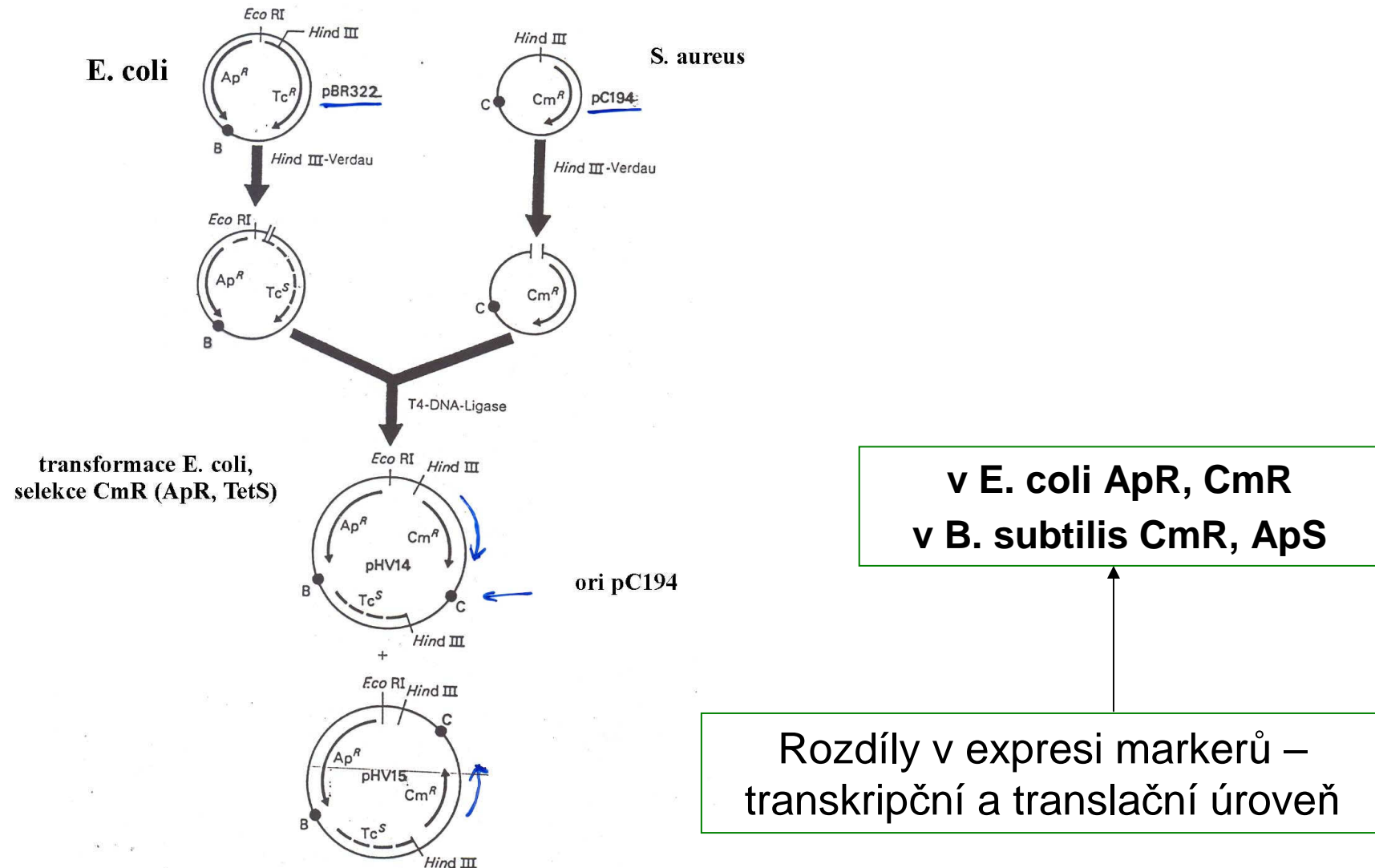
Plazmidy *r. Bacillus*:

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

<i>Plazmidy S.aureus</i> vhodné pro transformaci <i>B. subtilis</i>			
Plasmid	Fenotyp hostitelské buňky	Velikost	
pC194	Chloramphenicol-Resistenz	$1,8 \cdot 10^6$	Počet kopií 20-50
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*

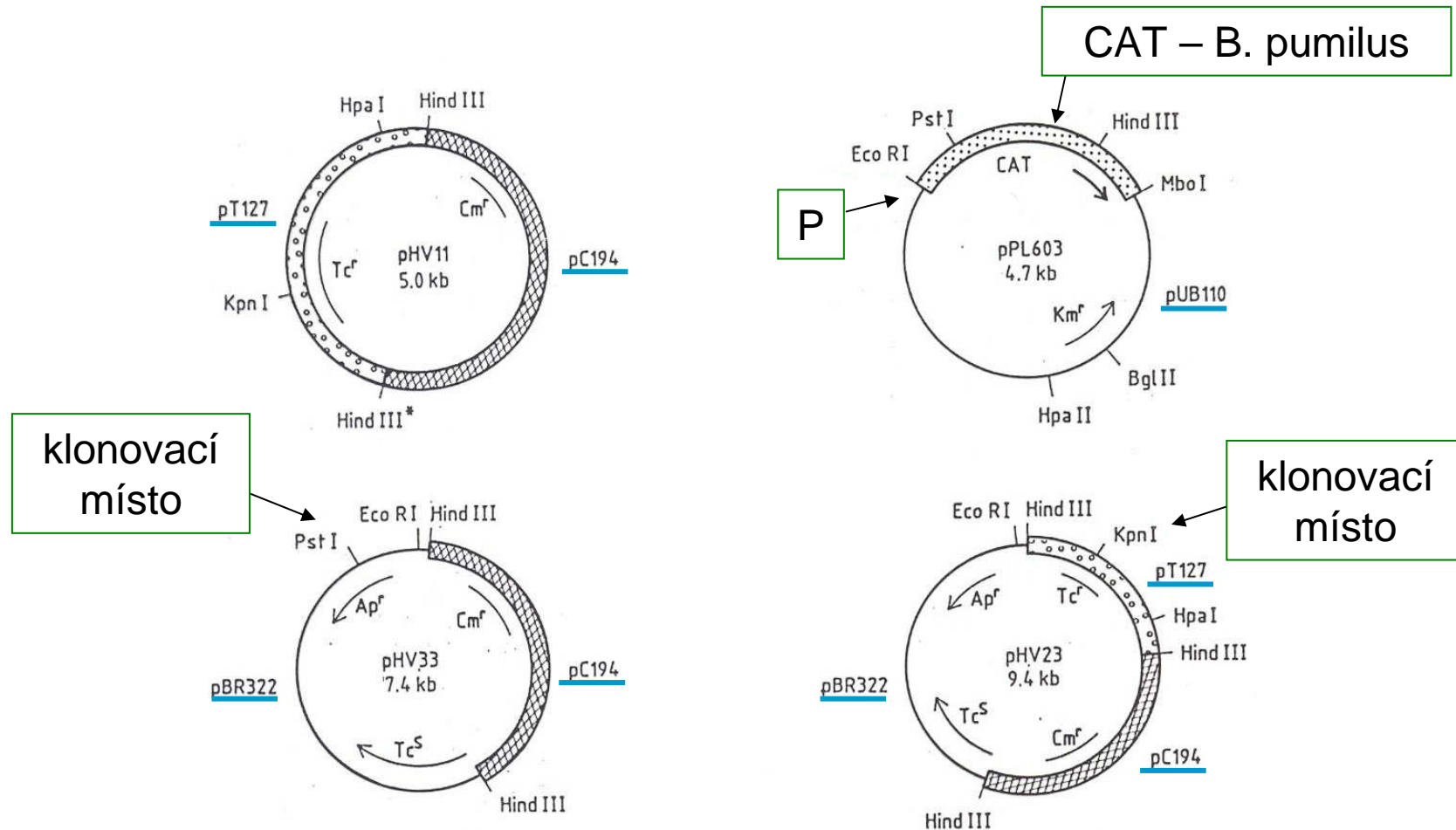
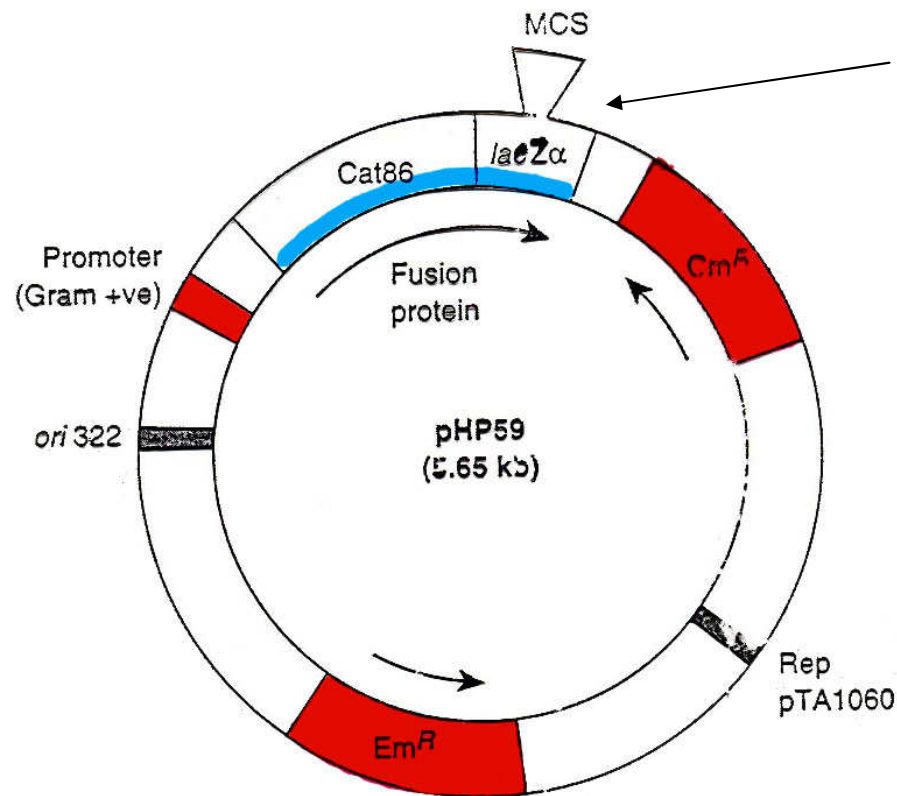


Table 12.4 *B. subtilis* – *E. coli* shuttle plasmids

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^R</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^R</i> gene), <i>Nco</i> I (in <i>Cm^R</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^R</i> gene), <i>Bcl</i> I and <i>Hpa</i> I (both <i>Em^R</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. α -Amylase-based selection vector for protein export functions (Smith <i>et al.</i> 1987). MCS of M13mp11 in <i>lacZα</i>
pGPB14	5.7	pBR322	pTA1060	Em	Em	As pGPA14, probe gene TEM- β -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>lacZα</i> <i>LacZα</i> not expressed in <i>B. subtilis</i> . Additional sites: <i>Bcl</i> I and <i>Hpa</i> I (both <i>Em^R</i> gene)
pHV1431	10.9	pBR322	pAM β 1	Ap,Tc,Cm	Cm	Efficient cloning vector based on segregationally stable pAM β 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 β 1	Ap,Tc,Cm	Cm	pHV1431 lacking stability fragment <i>orfH</i> . 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*



Translační fúze CAT z *B. pumilis* a lacZ z *E. coli*

Selekce = CmR, EryR

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*)

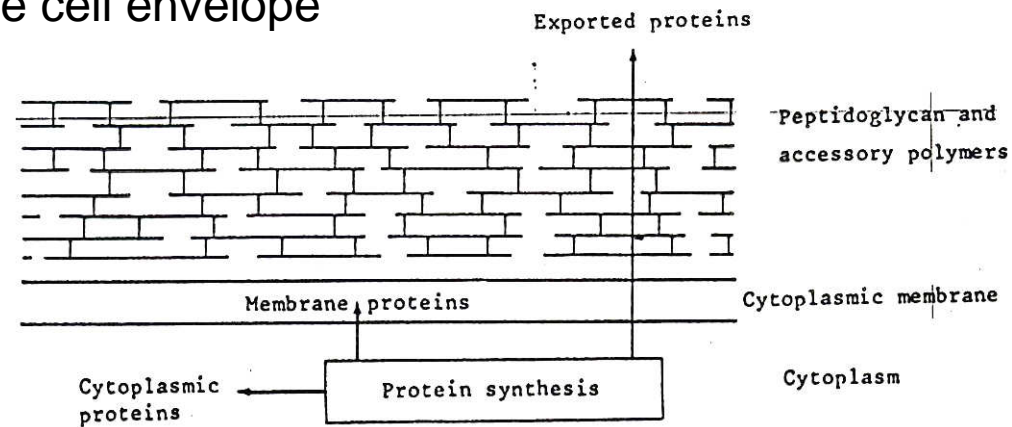
Degradace proteinů vlivem silné proteolytické aktivity

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

Lokalizace proteinů u G+ a G- bakterií

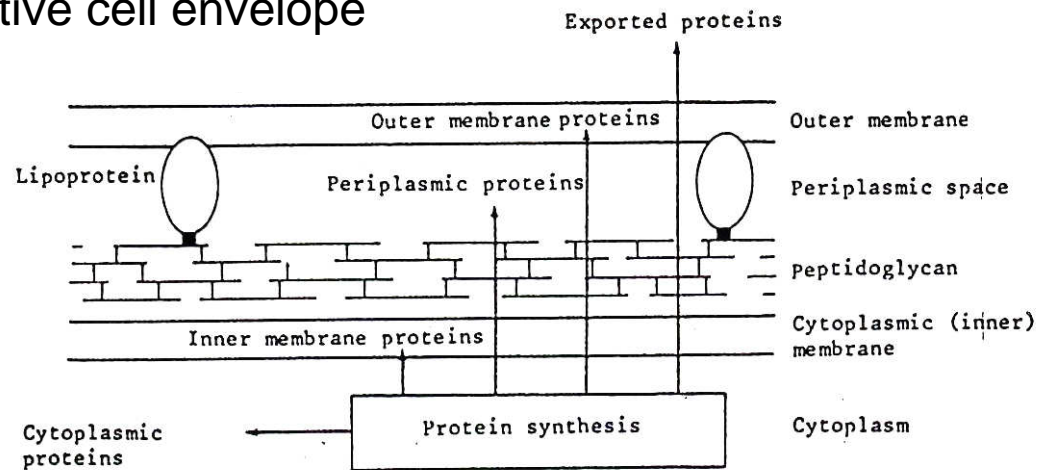
a) Gram-positive cell envelope

G+



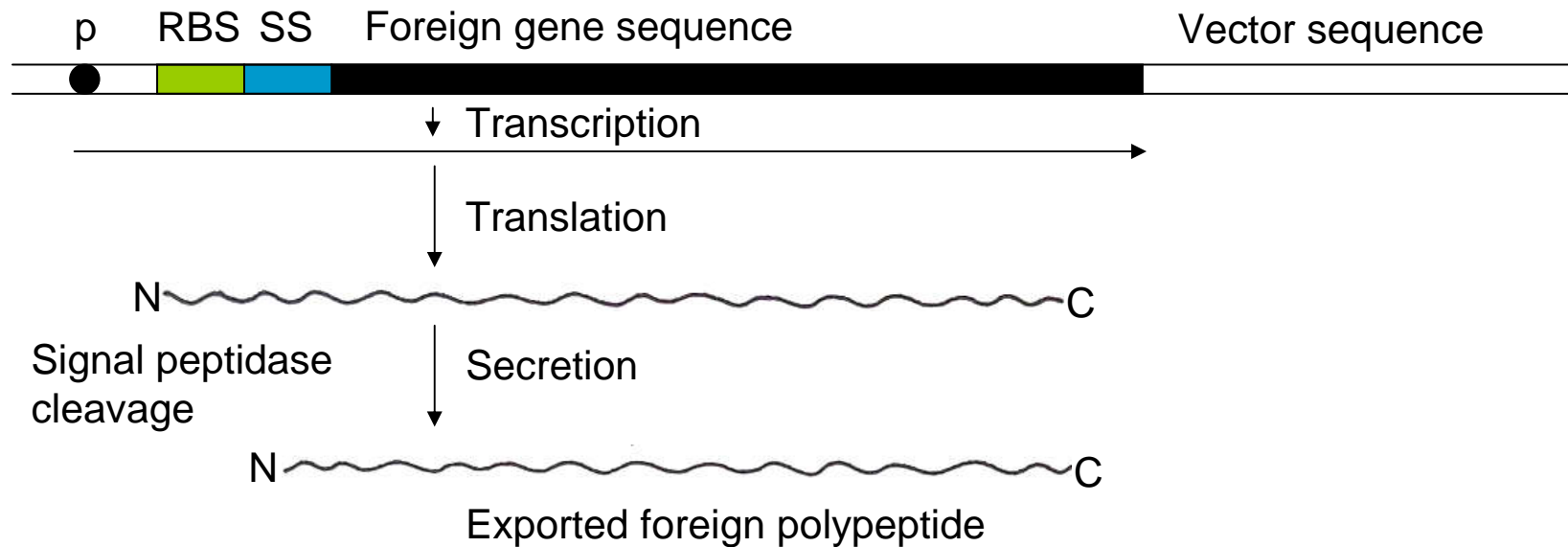
b) Gram-negative cell envelope

G-



Expres cizorodých genů v *B. subtilis* s využitím sekrečního vektoru

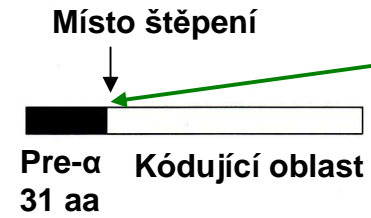
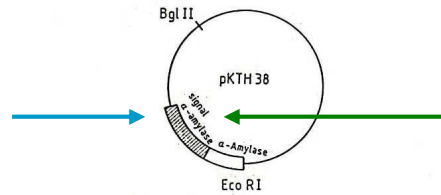
SS = signální sekvence alfa-amyláza z *B. amyloliquefaciens*



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

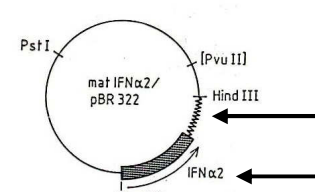
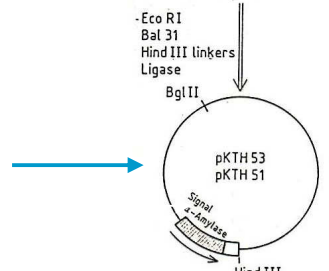
Konstrukce plazmidového vektoru pro sekreci interferonu

Signální sekvence alfa-amylázy včetně promotoru



Odštěpení signální sekvence alfa-amylázy probíhá přesně za 31 aa

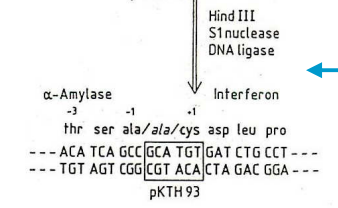
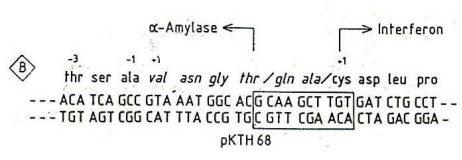
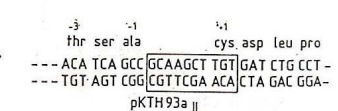
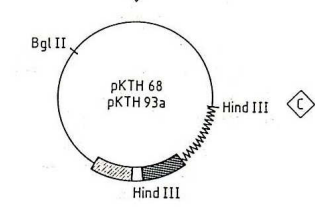
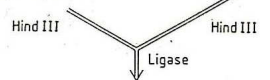
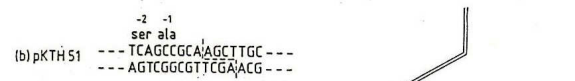
Zkrácení kódující oblasti alfa-amylázy



Plazmid nesoucí gen pro zralý IFNα2

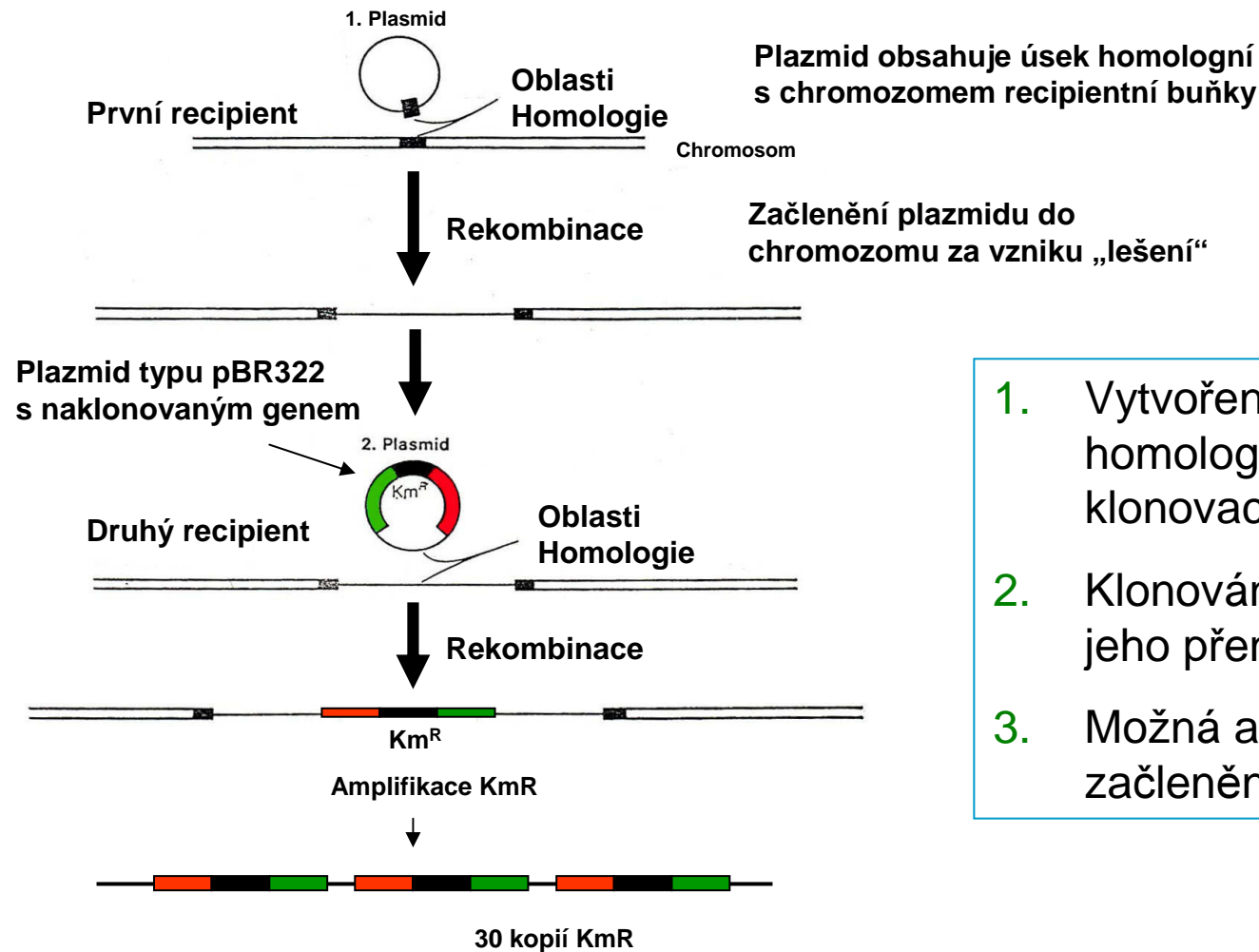
Nekódující sekvence

Kódující sekvence



Optimalizace spojení kódujících sekvencí

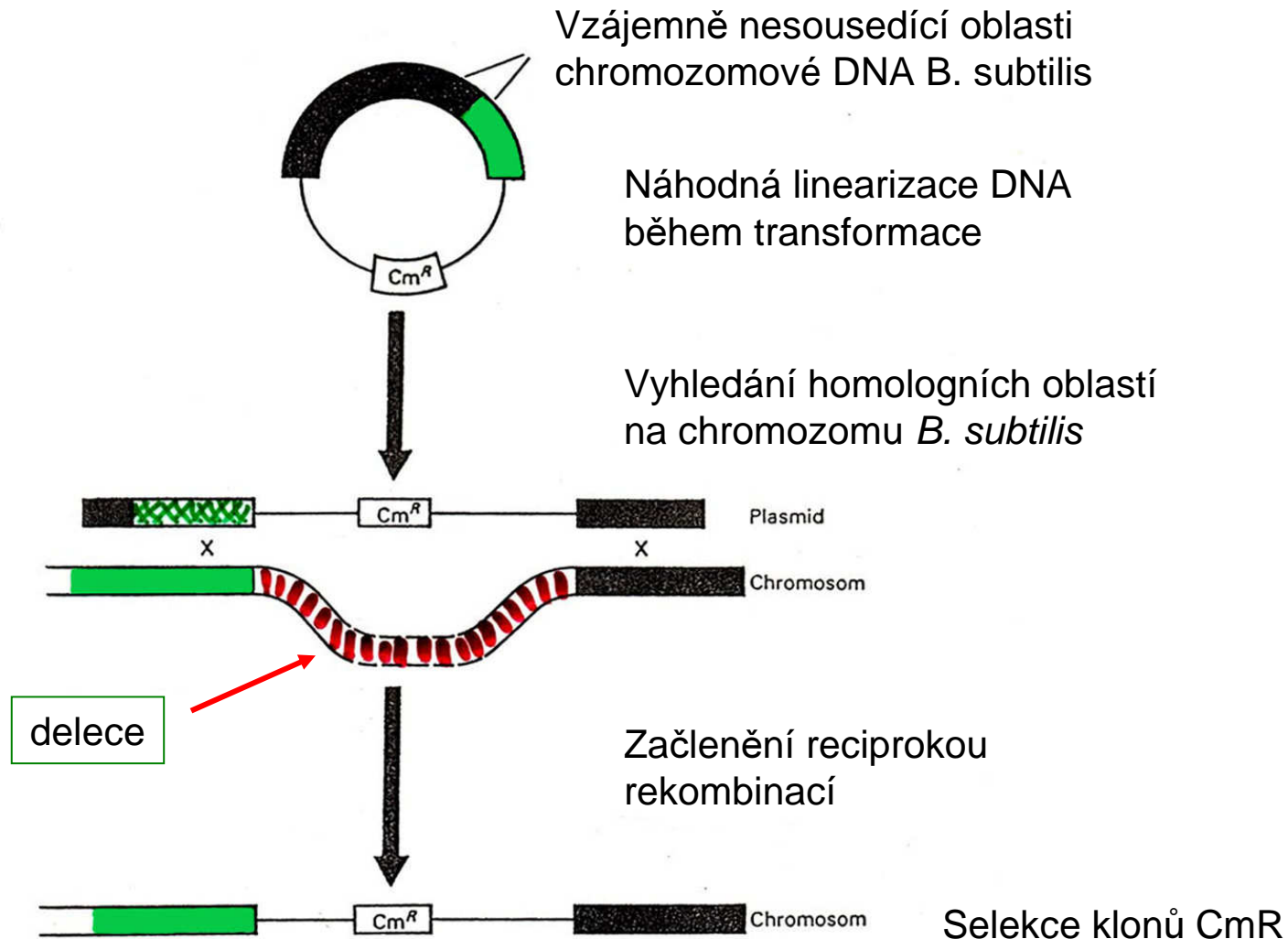
Vnášení heterologních plazmidů do *B. subtilis* s využitím „lešení“ („scaffolding“)



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

Vytváření delecí v chromozomu *B. subtilis*

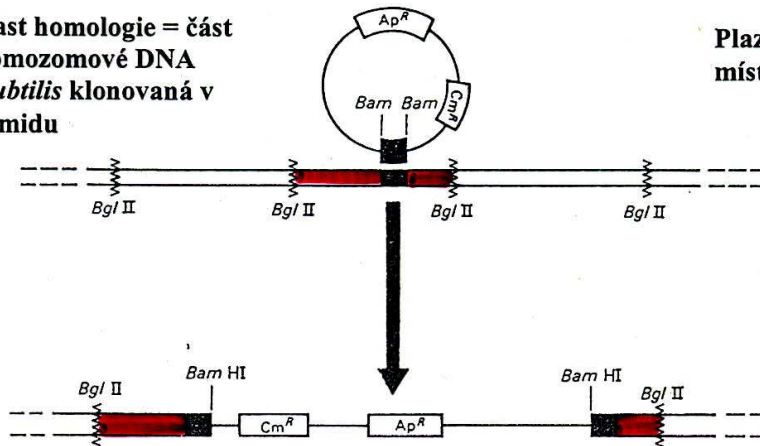
Vektor, který se v *B. subtilis* nereplikuje



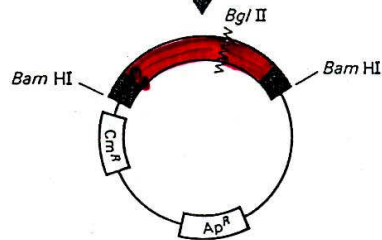
Klonování sekvencí chromozomu susedících s místy začlenění plazmidového vektoru

Oblast homologie = část chromozomové DNA *B. subtilis* klonovaná v plazmidu

Plazmid neobsahuje restriční místa *Bgl*II



Izolace DNA, štěpení *Bgl*II, Cirkularizace DNA-ligázou

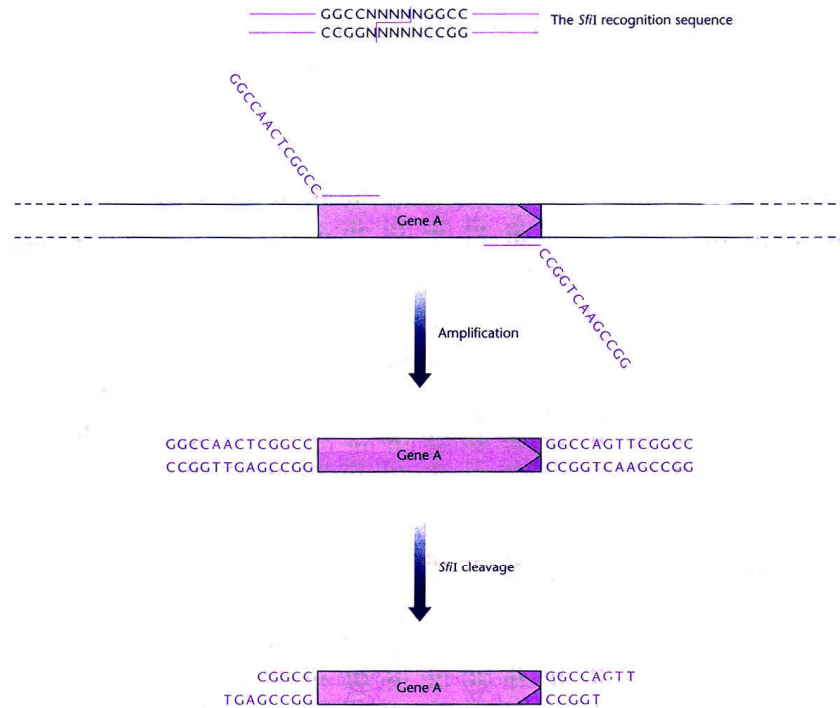


Přenos do *E. coli*,
Selekce na ApR,
Analýza chromozomových oblastí

Přenos chromozomových genů z *B. subtilis* do *E. coli*

„vyprošťování“ genů

Klonování klastrů genů v požadovaném pořadí

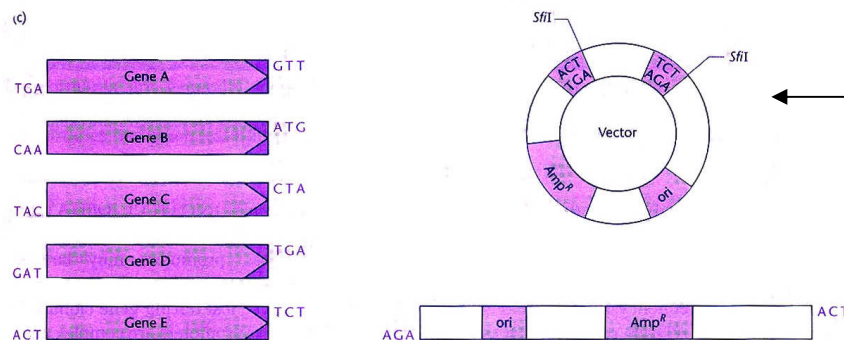


Rozpoznávací sekvence *Sfi*I –
vnitřní část (NNNN) je variabilní

Amplifikace genu A pomocí PCR
s primery nesoucími v extenzích
místa *Sfi*I

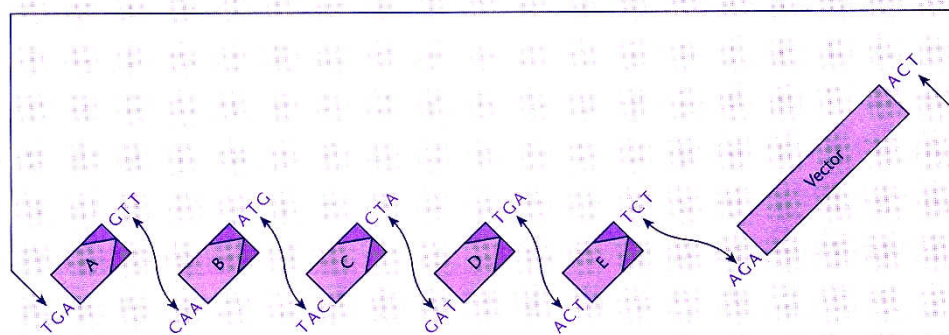
PCR produkt s extenzemi *Sfi*I

PCR produkt po štěpení *Sfi*I

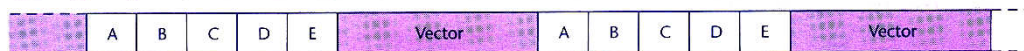


Klonovací vektor

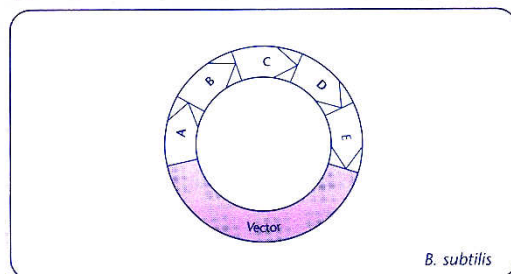
Klonování klastrů genů v požadovaném pořadí – pokrač.



Formation of multimers on ligation



Circularization of monomer after transformation

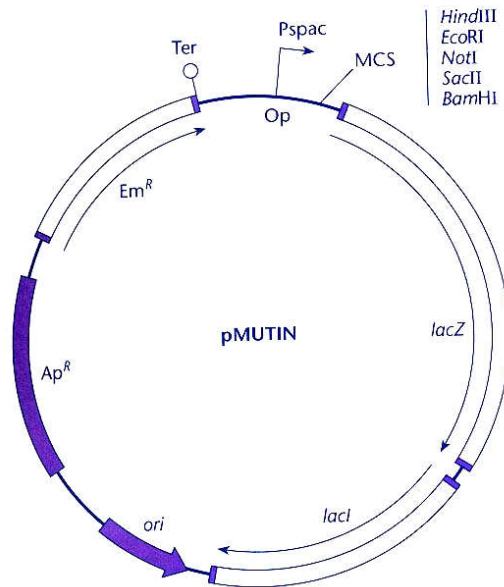


Vzájemné spojení genů vybavených *Sfi*I místy a jejich začlenění do vektoru

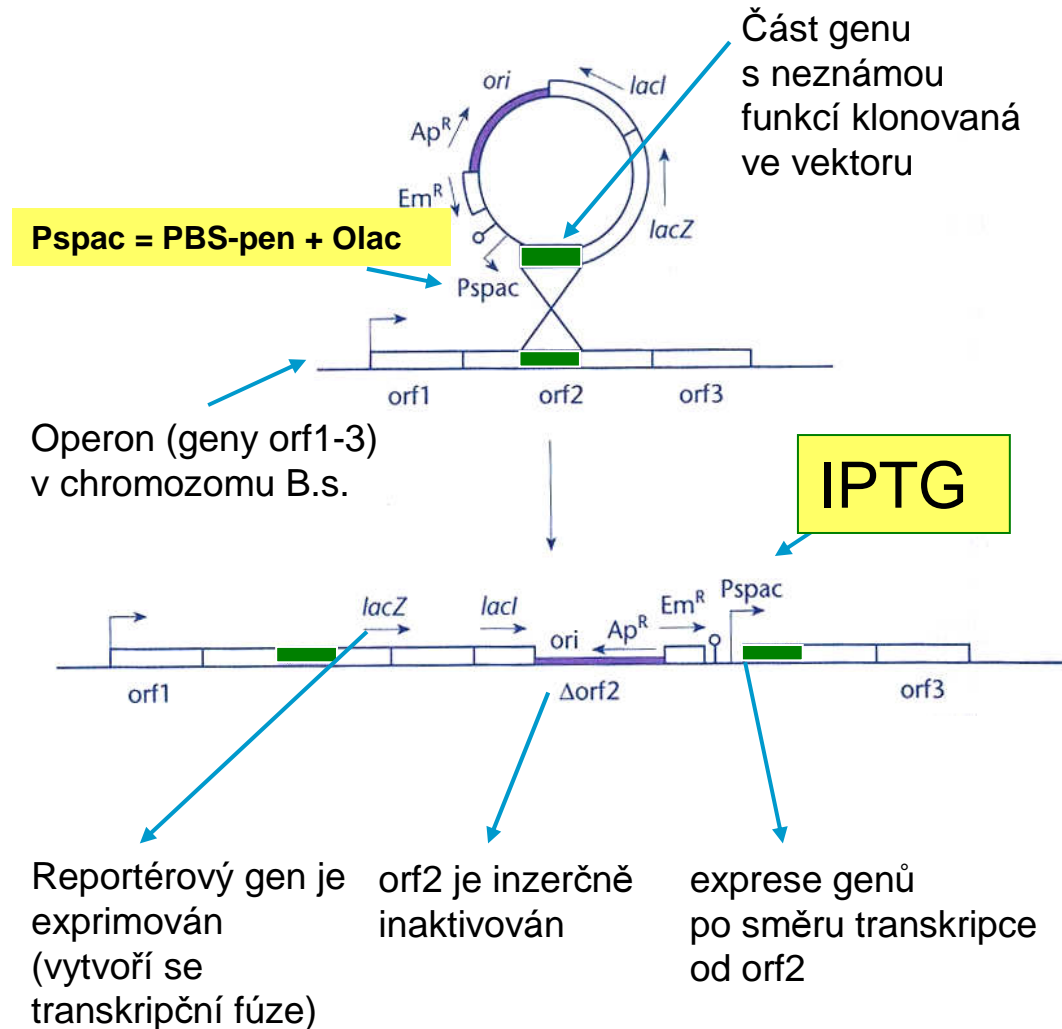
Příklad: příprava kmene *B. subtilis* pro tvorbu hydrokortizonu postupným spojením 8 genů

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



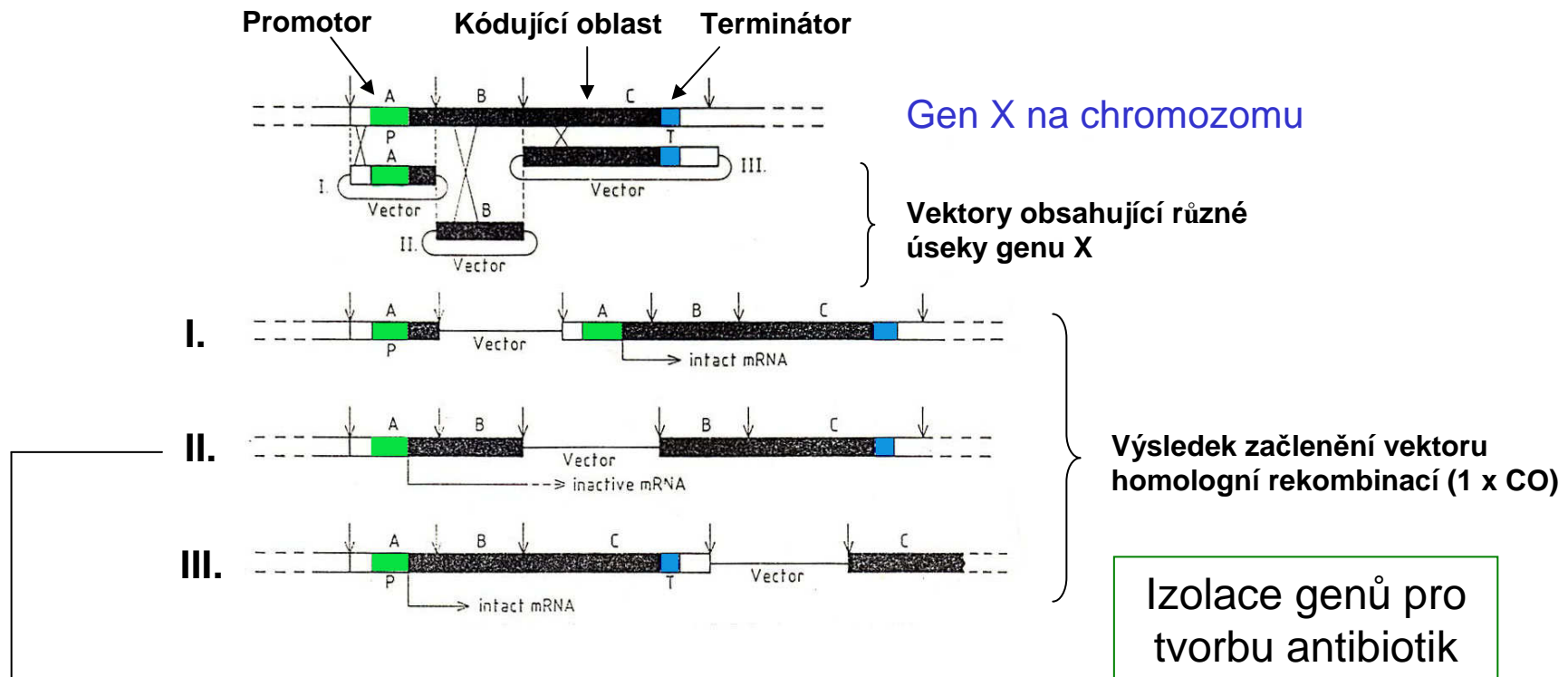
Klonování ve streptomycetách

- producenti antibiotik (60%) a extracelulárních proteinů (enzymy a inhibitory enzymů)
- 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. ΦC31) – 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

Princip mutačního klonování u streptomycet



Postup mutačního klonování pro izolaci genů

1. Klonování chromozomového genu X (*antR*) do fágového vektoru (konstrukce genové knihovny)
2. Infekce buněk původního kmene exprimujícího gen X (*AntR*), selekce transduktantů na rezistenci k viomycinu (gen *vph* nesený na fágovém vektoru). Výsledkem začlenění vektoru homologní rekombinací je duplikace homologní sekvence, která vede k jedné ze 3 možností:
 - Vektor nese promotor (I) nebo terminátor (III), funkce genu zůstává zachována
 - Vektor nese kódující oblast genu (II), inzercí vektoru dojde k jeho inzerční inaktivaci (mutaci) → vyhledání klonů nesoucích mutací hledaného genu

Klonování genů v archeích

- extremofilní organismy (T, pH, konc. solí)
- jedinečné fyziologické vlastnosti (např. striktně anaerobní a metanogenní)

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: β -glukoronidáza, β -galaktozidáza, trehaláza