

# 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

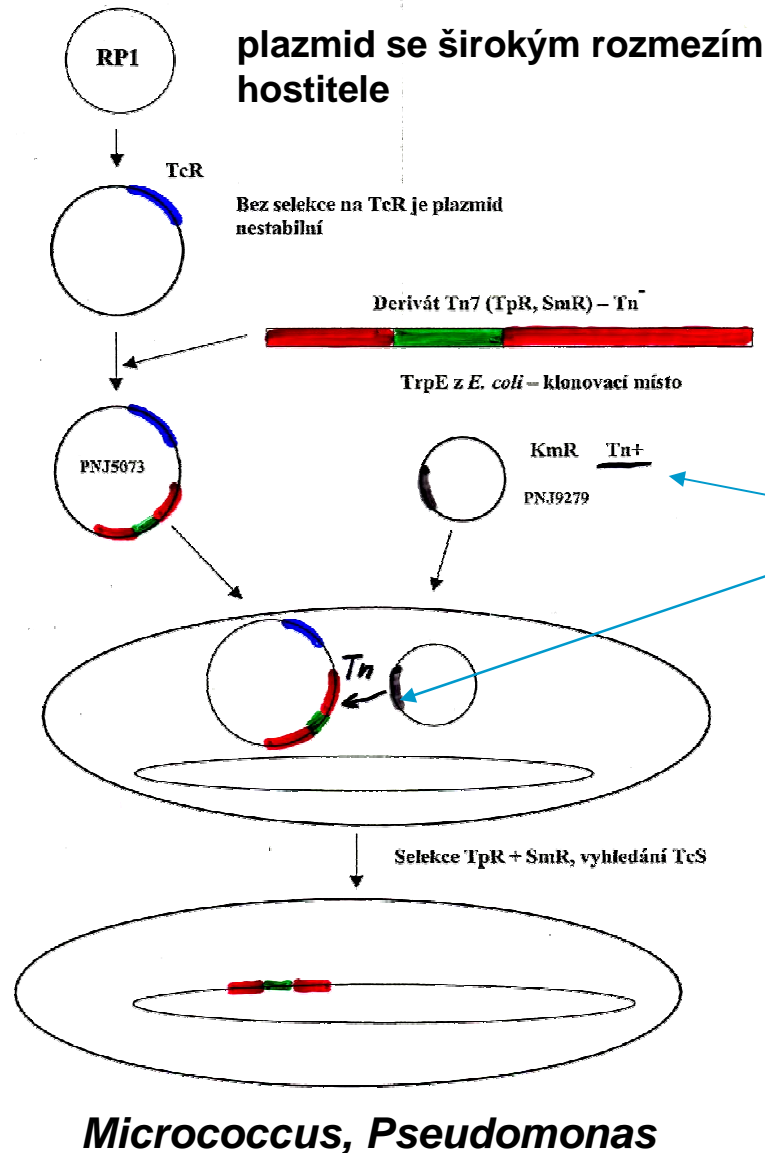
# Poznatky z klonování v G- (jiných než E.coli) a G+ bakteriích

- 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

- 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**

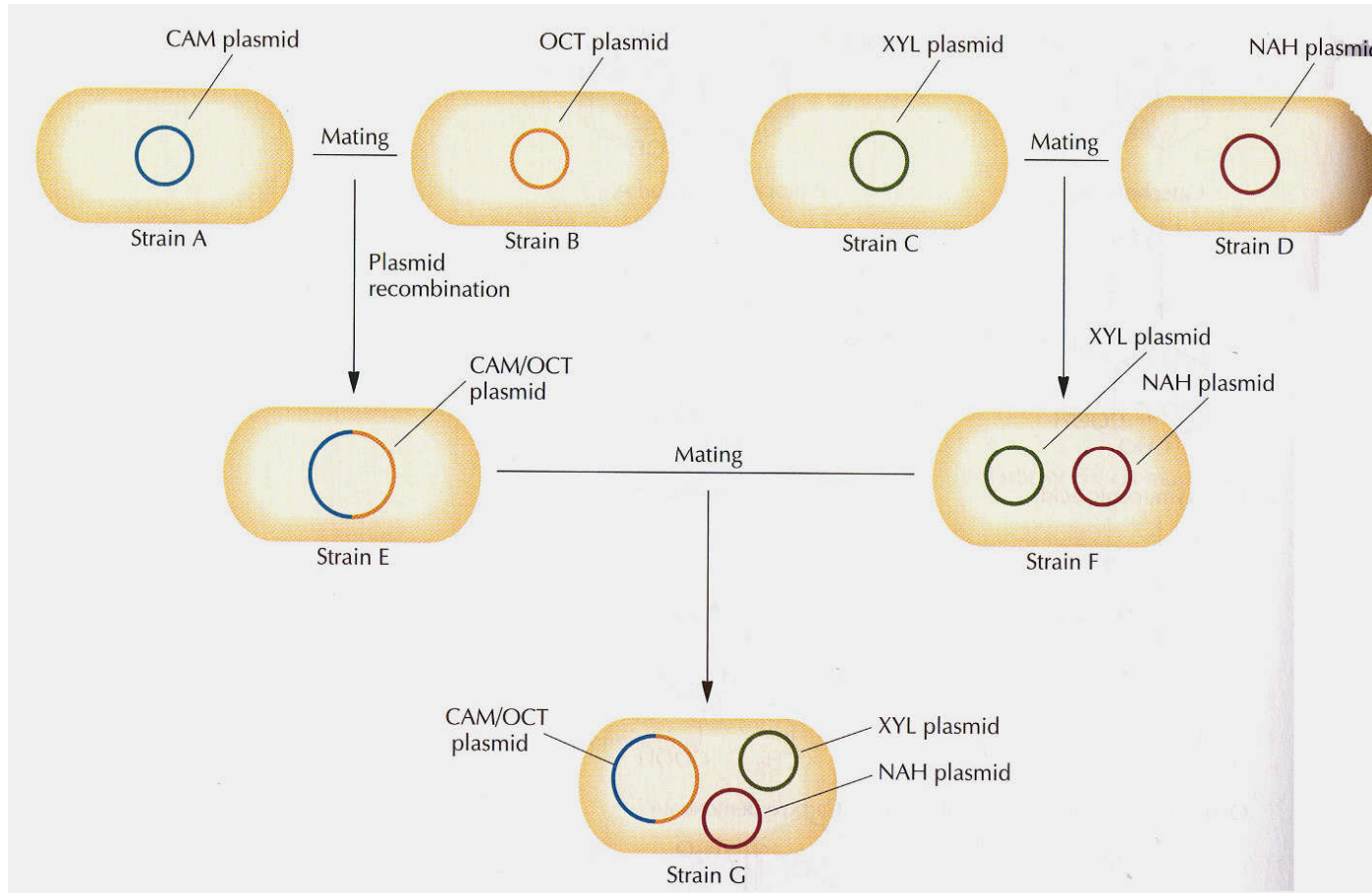
Stabilní začlenění do chromozomu, následné vnášení nových genů do genu trpE

**Produkční kmeny**

## Plazmidy *Pseudomonas* 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

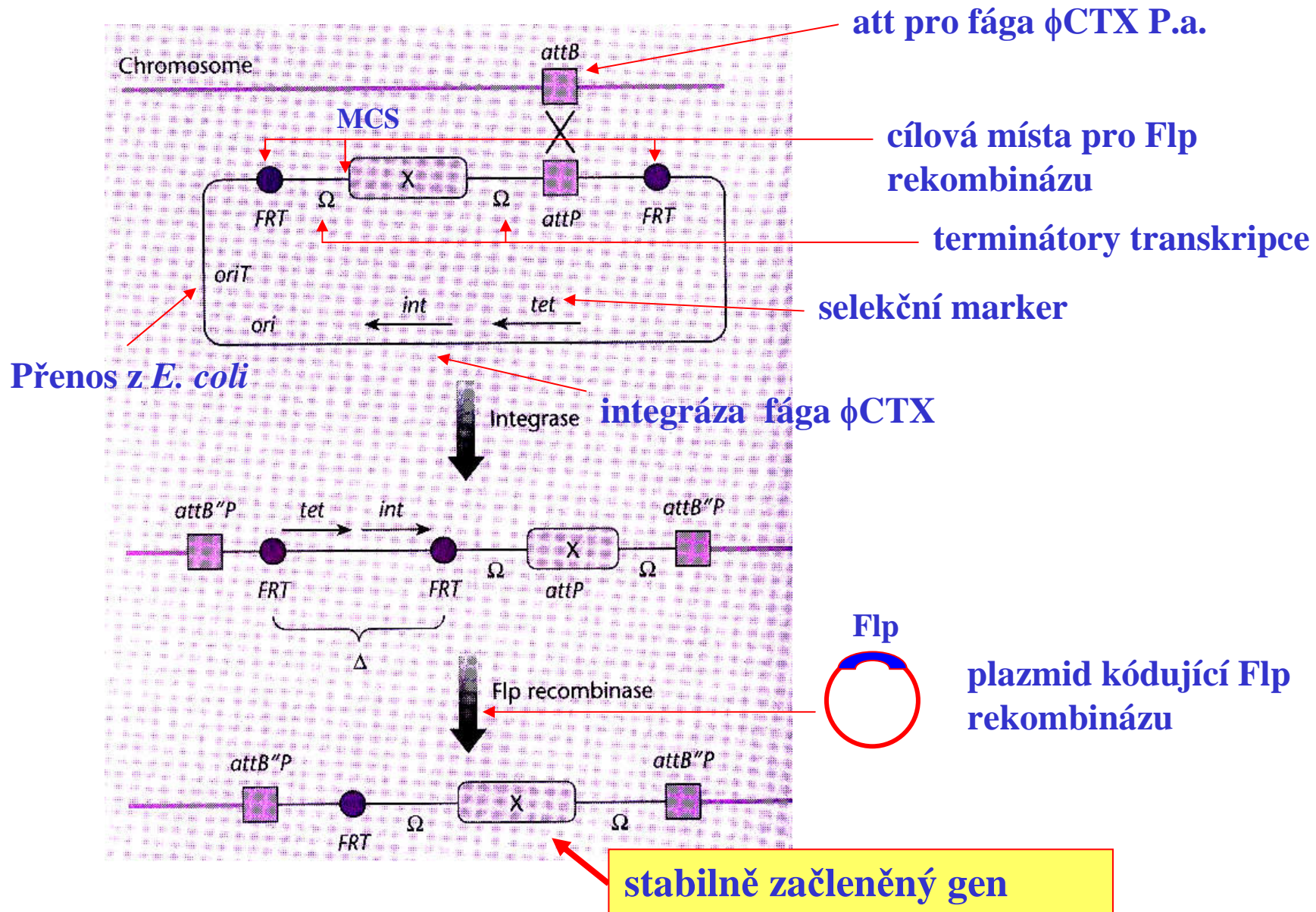


**CAM – kafr, OCT – octan, XYL – xylen, NAH - naftalen**

První patent udělený v USA GMO-mikroorganismu



# Použití integračních vektorů pro vnášení genů 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 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
- dextransáza, maltáza, pektátlyáza
- esteráza, alkalická fosfatáza
- proteázy (subtilizin)
- lysozym
- pektináza

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

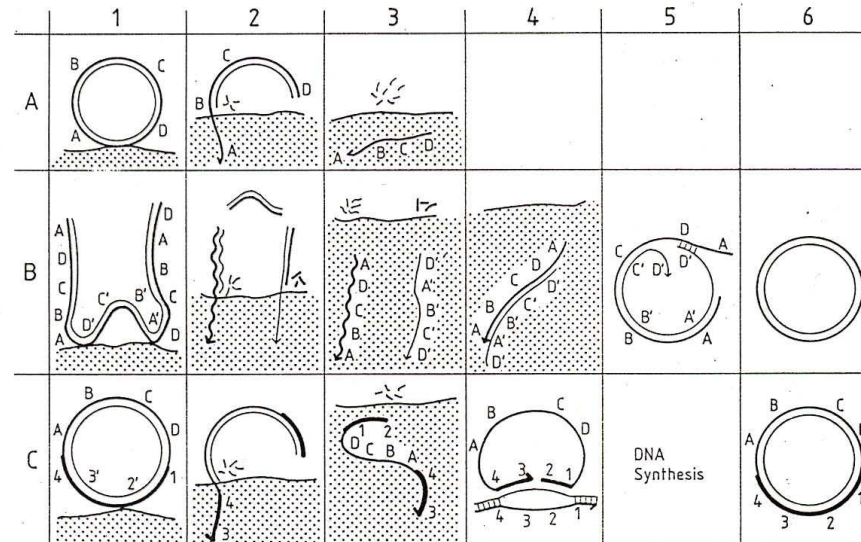
Cizorodé látky

- 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**

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/ $\mu\text{g}$ 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 $\text{Rec}^+$
	Unfractionated plasmid	$3.8 \times 10^6$	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	$2 \times 10^4$	Gives up to 80% transformants.	
	CCC monomer	$3 \times 10^6$	Does not require competent cells.	
	CCC dimer	$2 \times 10^6$	Can transform with linear DNA and	
	CCC multimer	$2 \times 10^6$	can use phosphatase-treated vector	

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

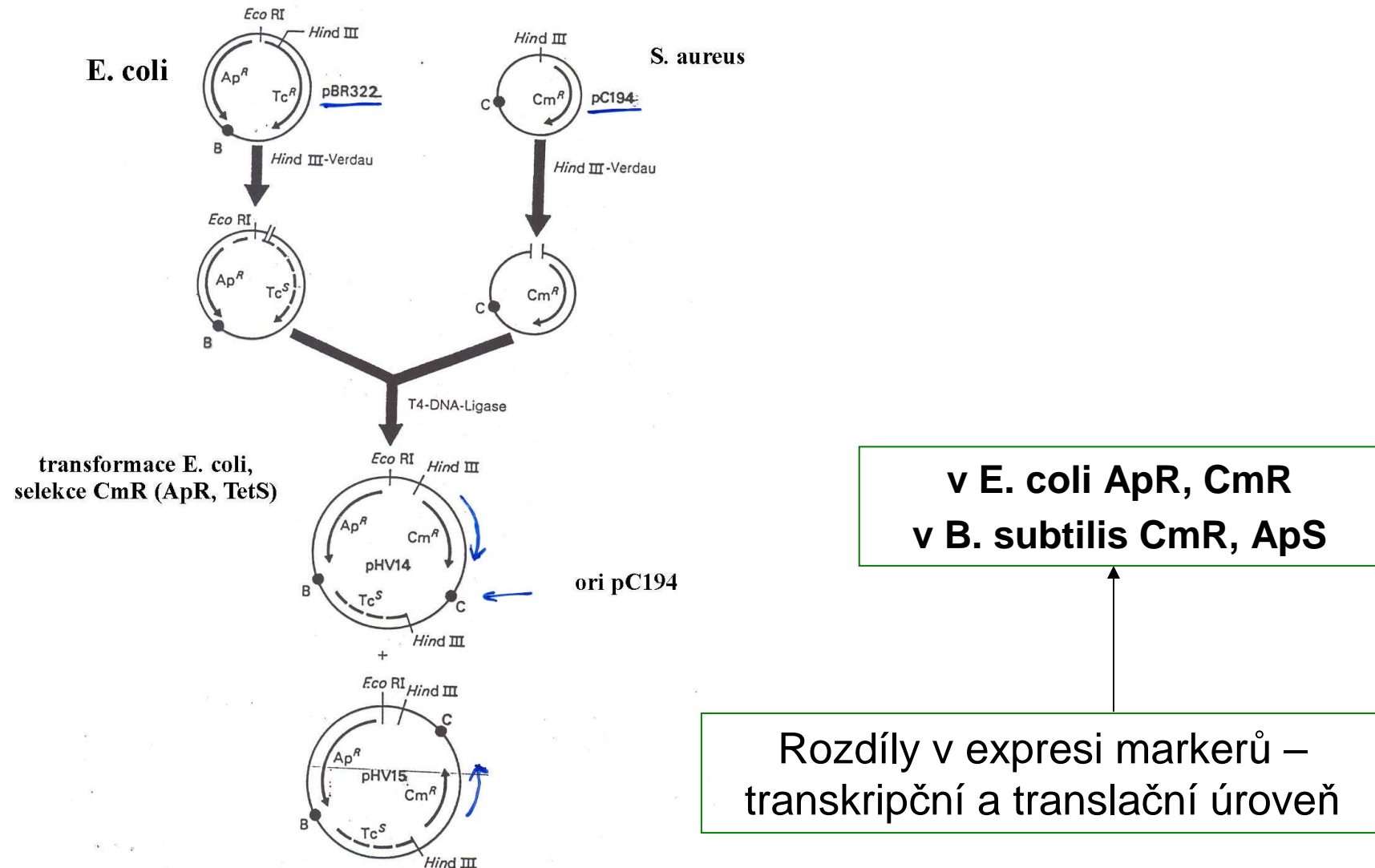
## Plazmidy *r. Bacillus*:

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

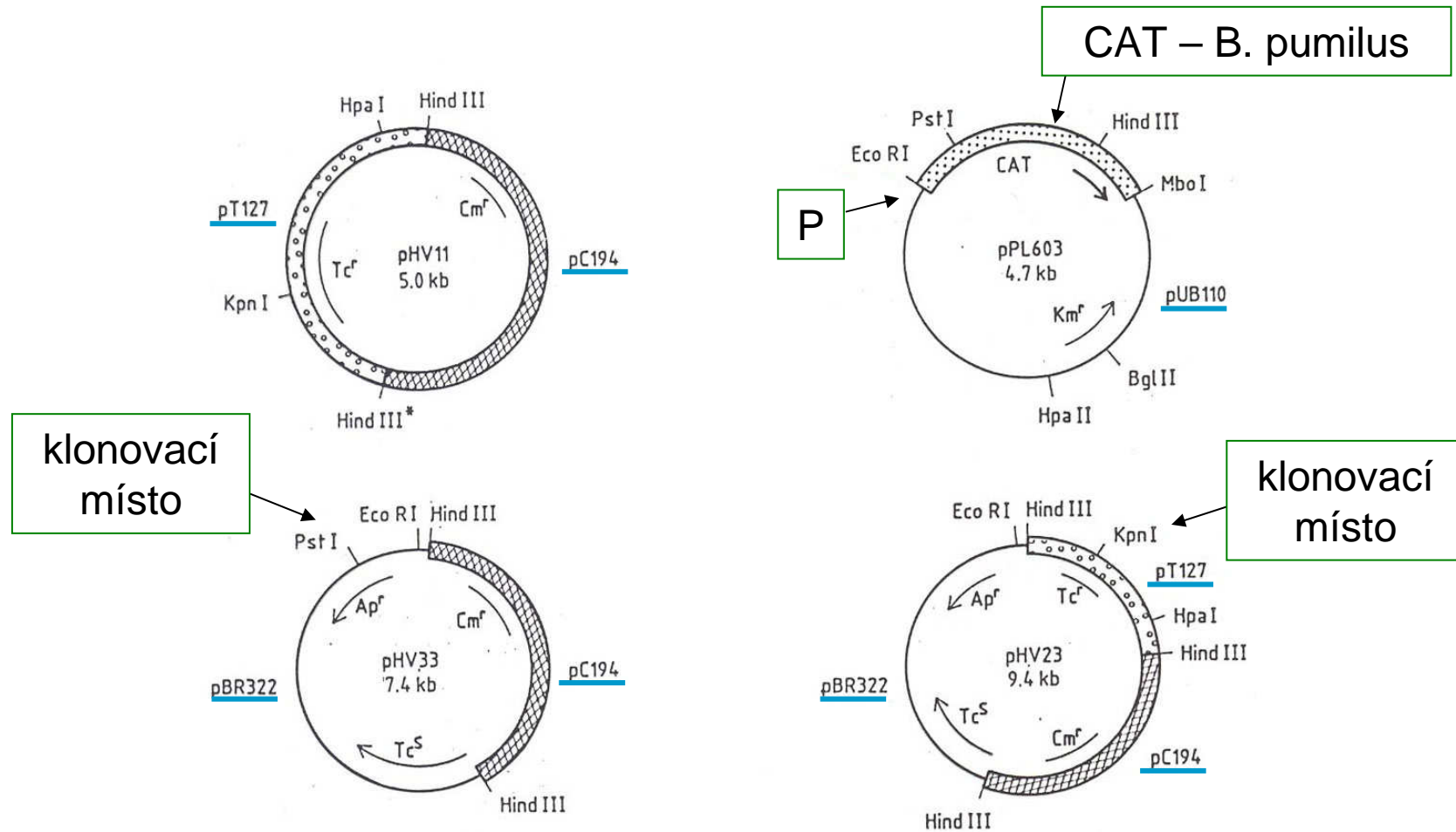
<b>Plazmidy <i>S.aureus</i> vhodné pro transformaci <i>B. subtilis</i></b>			
Plasmid	Fenotyp hostitelské buňky	Velikost	
pC194	Chloramphenicol-Resistenz	$1,8 \cdot 10^6$	<b>Počet kopií 20-50</b>
pE194	Erythromycin-Resistenz	$2,3 \cdot 10^6$	
pSA0501	Streptomycin-Resistenz	$2,7 \cdot 10^6$	
pUB110	Kanamycin-Resistenz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

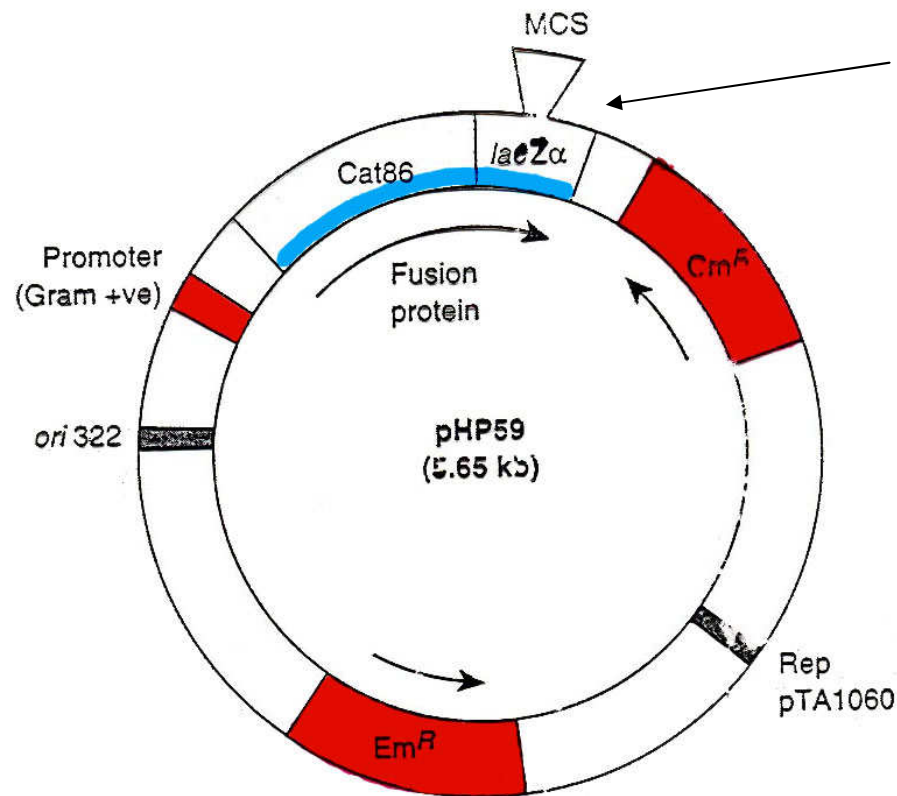


**Table 12.4 *B. subtilis* – *E. coli* kyvadlové (shuttle) plasmidy**

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*



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*)

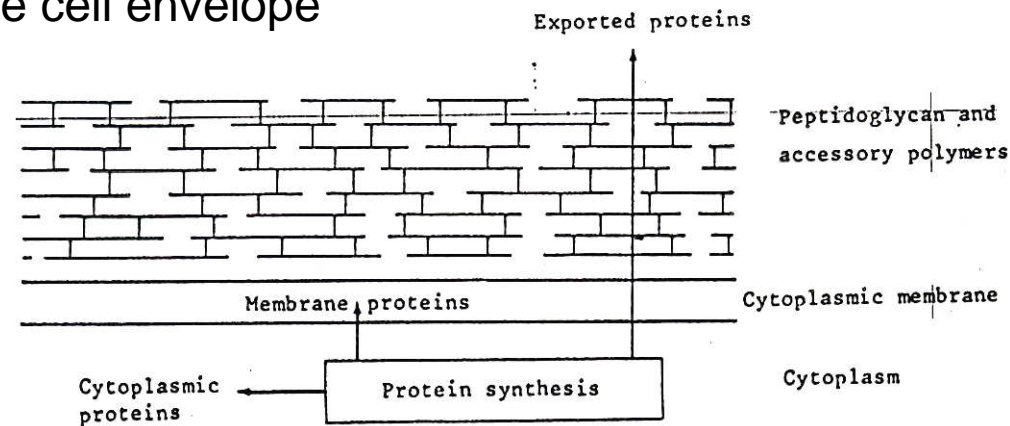
## Degradace proteinů vlivem silné proteolytické aktivity

- 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

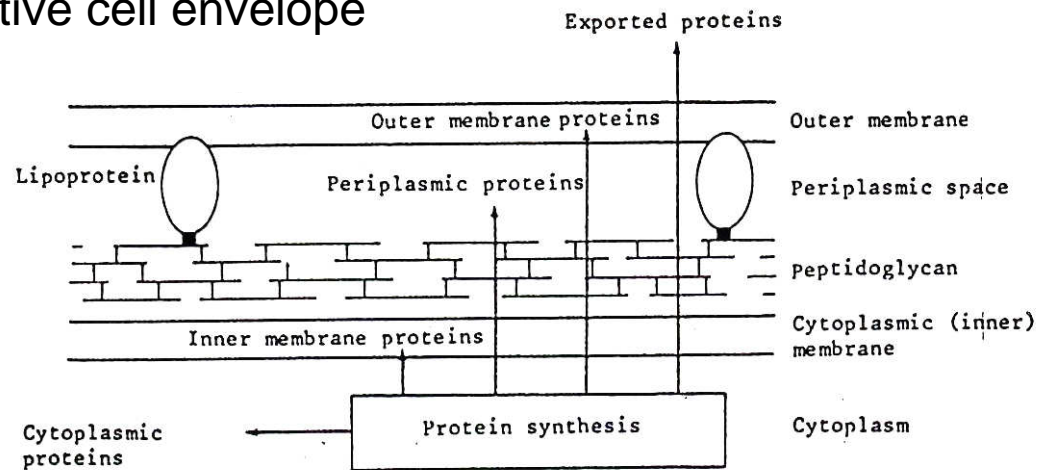
## a) Gram-positive cell envelope

G+



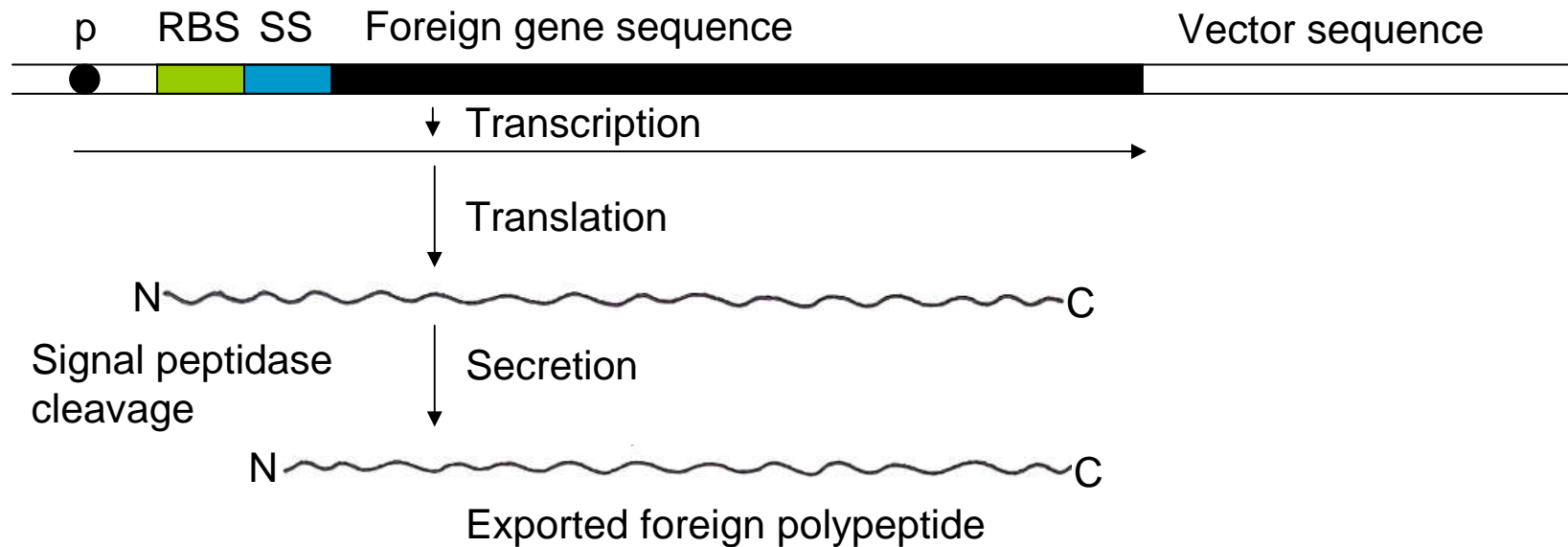
## b) Gram-negative cell envelope

G-



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

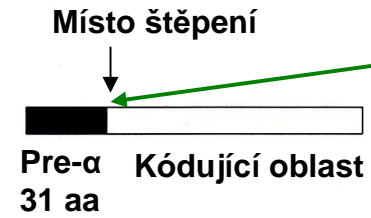
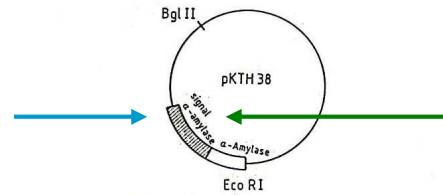
**SS = signální sekvence alfa-amyláza z *B. amyloliquefaciens***



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

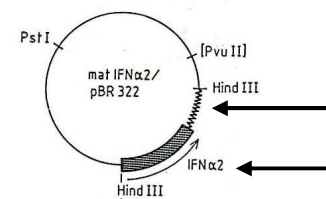
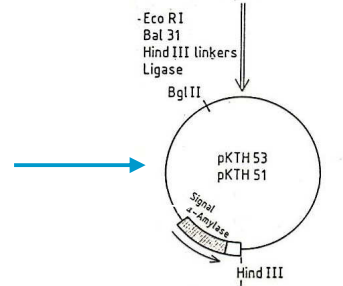
# Konstrukce plazmidového vektoru pro sekreci interferonu

Signální sekvence alfa-amylázy včetně promotoru



Odštěpení signální sekvence alfa-amylázy probíhá přesně za 31 aa

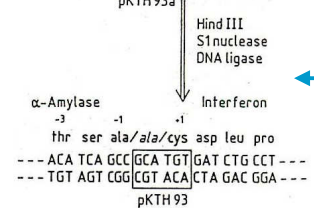
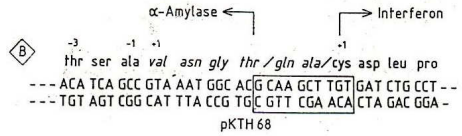
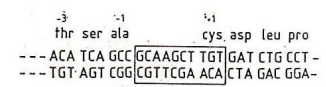
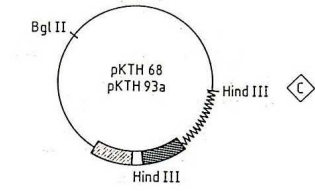
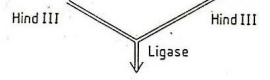
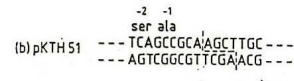
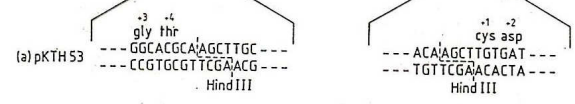
Zkrácení kódující oblasti alfa-amylázy



Plazmid nesoucí gen pro zralý IFNα2

Nekódující sekvence

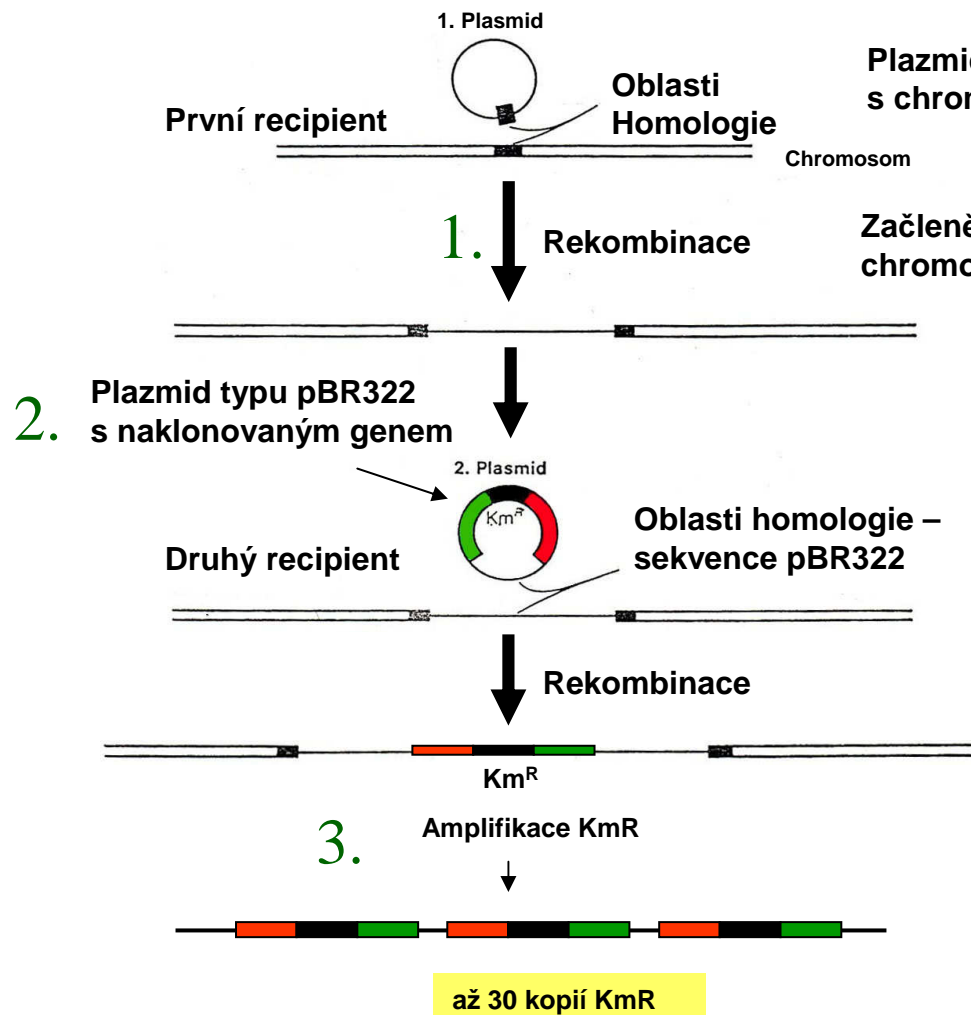
Kódující sekvence



Optimalizace spojení kódujících sekvencí



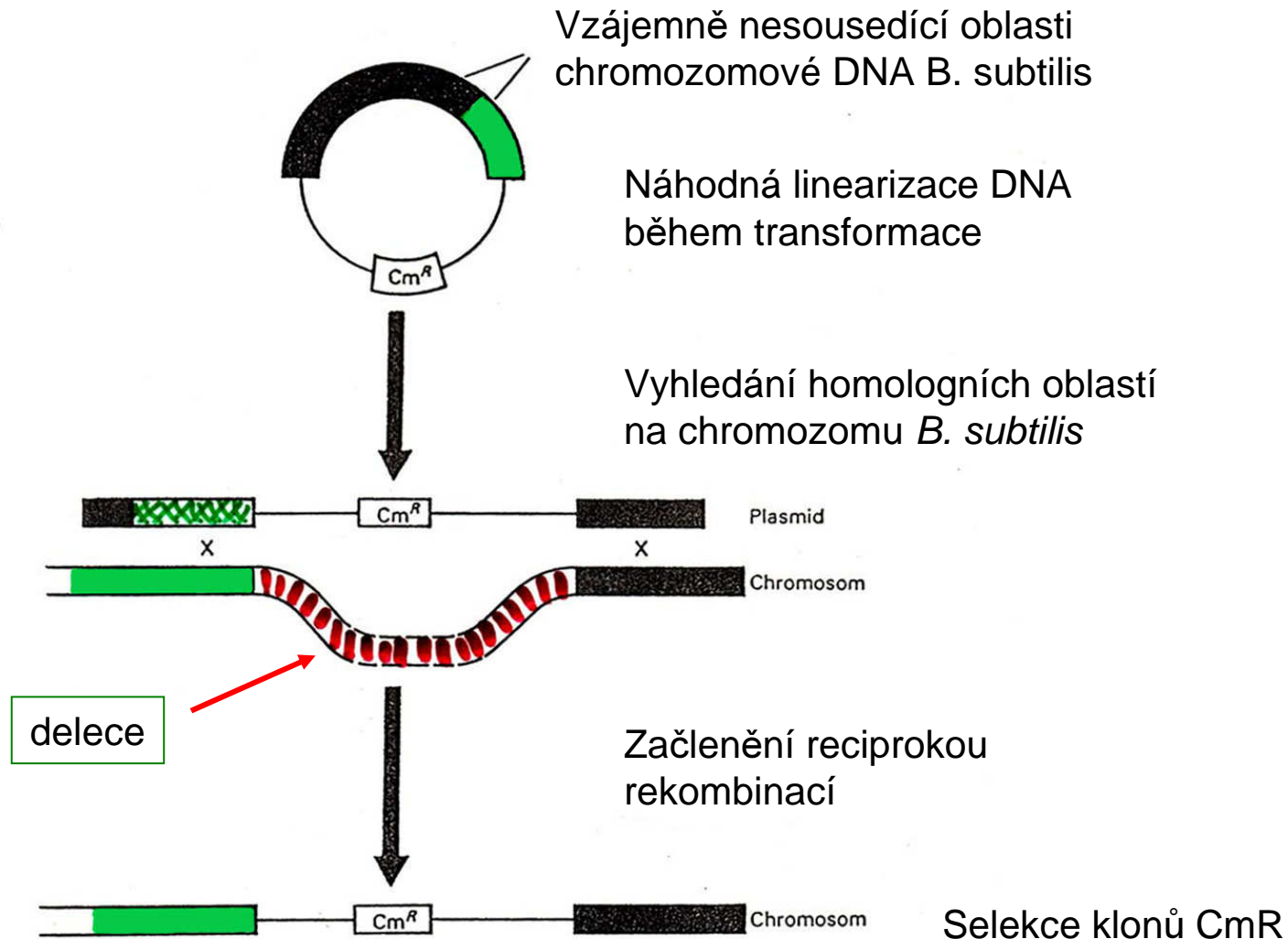
# Vnášení heterologních plazmidů do *B. subtilis* s využitím „lešení“ („scaffolding“)



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

# Vytváření delecí v chromozomu *B. subtilis*

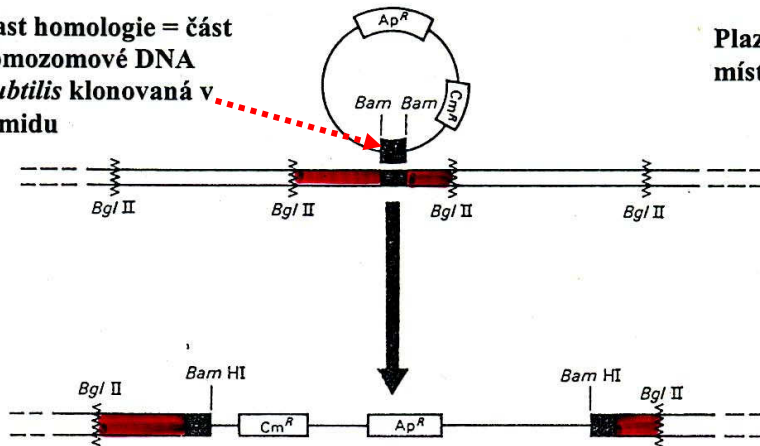
vektor, který se v *B. subtilis* nereplikuje



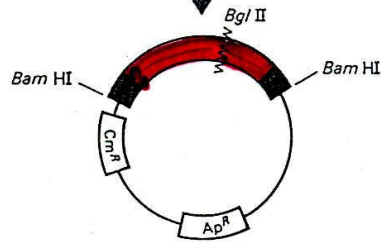
# Klonování sekvencí chromozomu susedících s místy začlenění plazmidového vektoru

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

Plazmid neobsahuje restriční místa *Bgl*III



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



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

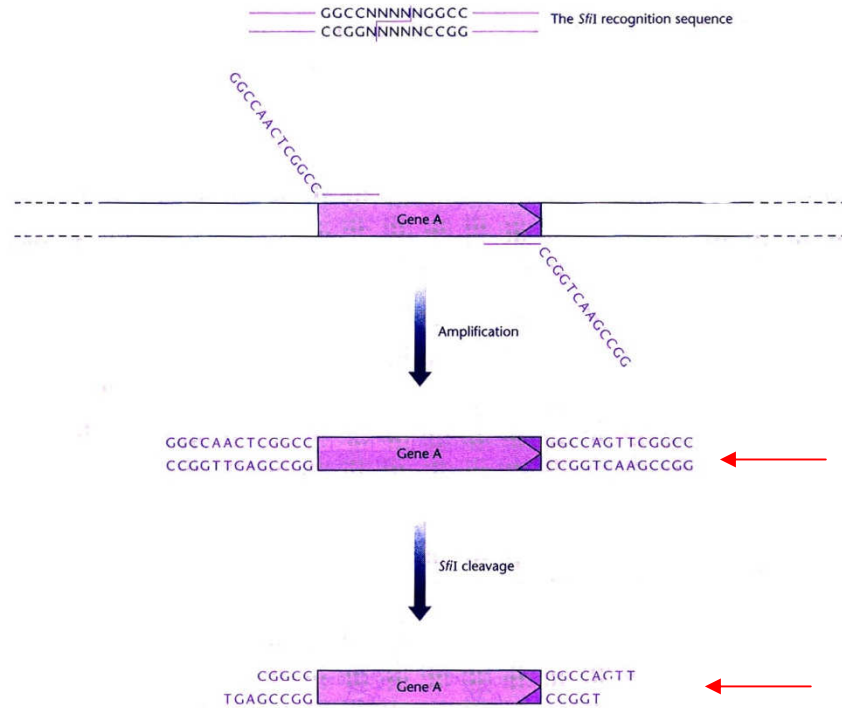
Přenos chromozomových genů z *B. subtilis* do *E. coli*

„vyprošťování“ genů

# Klonování klastrů genů v požadovaném pořadí

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

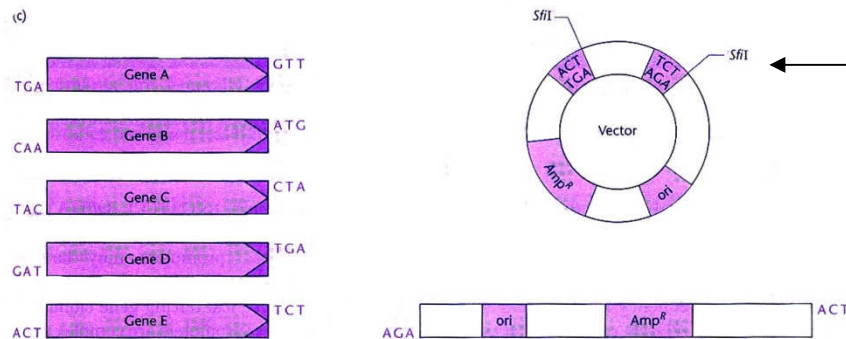
Amplifikace genu A pomocí PCR  
s primery nesoucími v extenzích  
místa *Sfi*I s vhodně navrženou vnitřní  
sekvencí



PCR produkt s extenzemi *Sfi*I

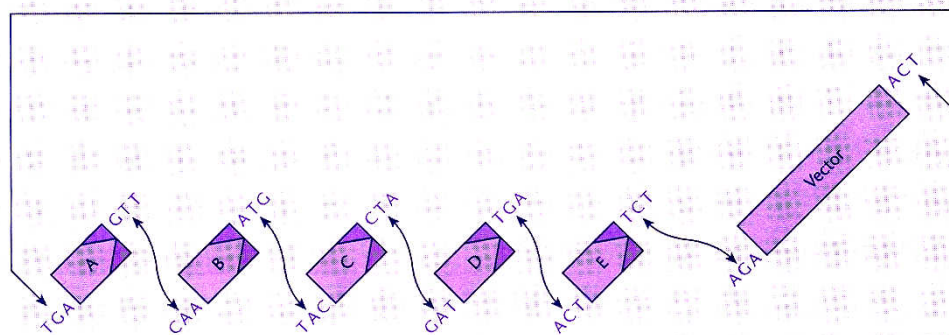
Vnitřní NNNNN má odlišnou podobu u  
každého z amplifikovaných genů

PCR produkt po štěpení *Sfi*I



Klonovací vektor

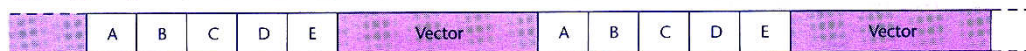
# Klonování klastrů genů v požadovaném pořadí – pokrač.



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

## štěpení rekombinantních vektorů a jejich ligace

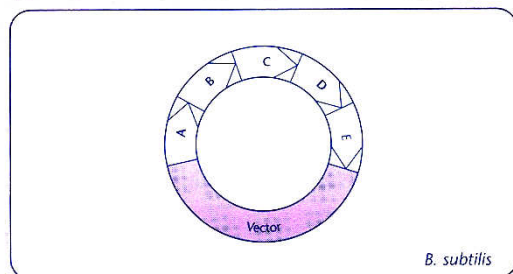
Formation of multimers on ligation



přenos lineárních molekul do buněk *B. subtilis* transformací

v buňkách se rekombinantní vektor cirkularizuje

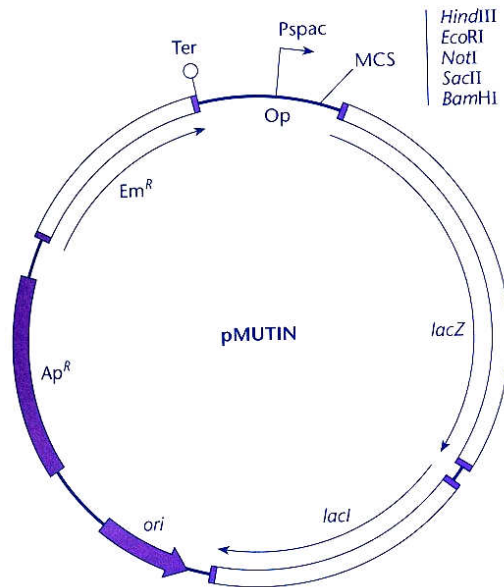
*B. subtilis* lze transformovat lineárními DNA za předpokladu, že obsahují duplikace



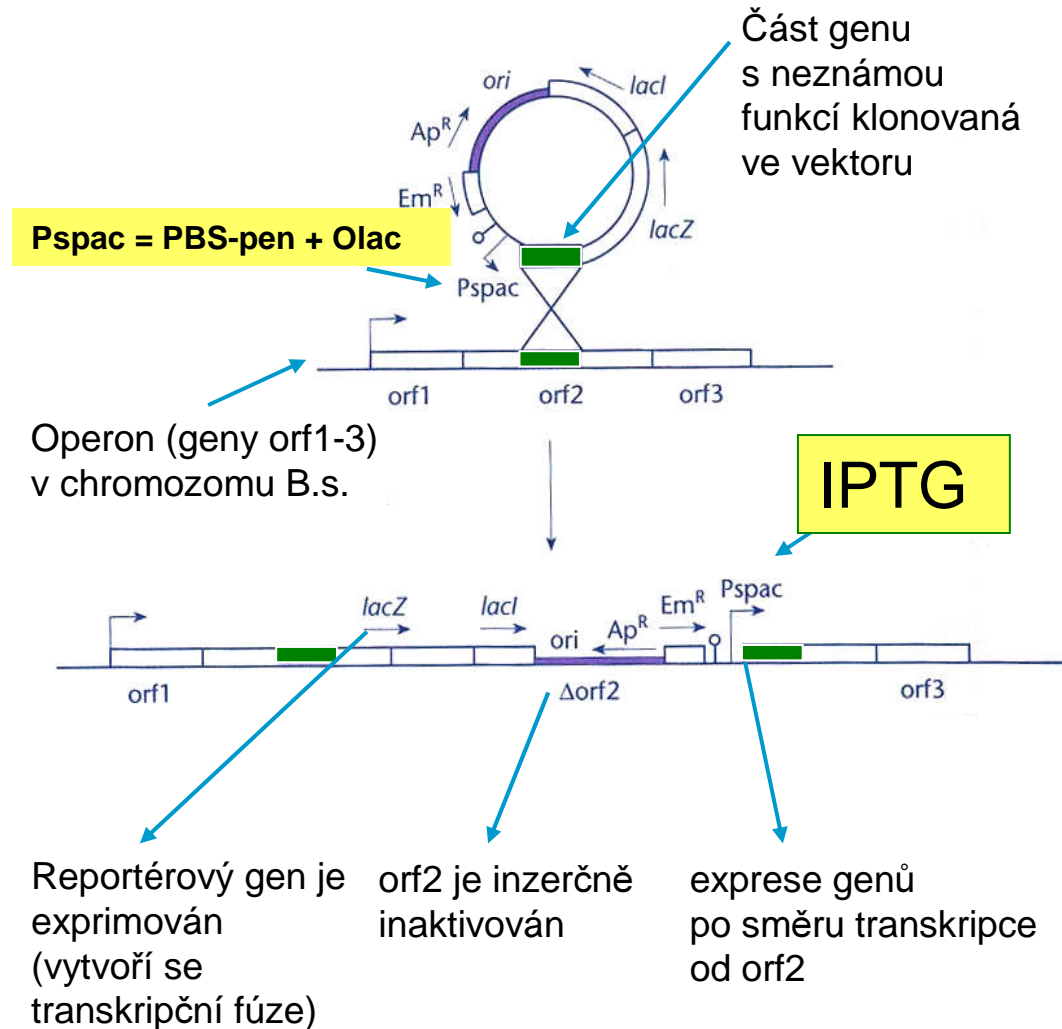
**Příklad: příprava kmene *B. subtilis* pro tvorbu hydrokortizonu postupným spojením 8 genů**

# 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





## 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 umožňující jeho expresi v *B. subtilis***

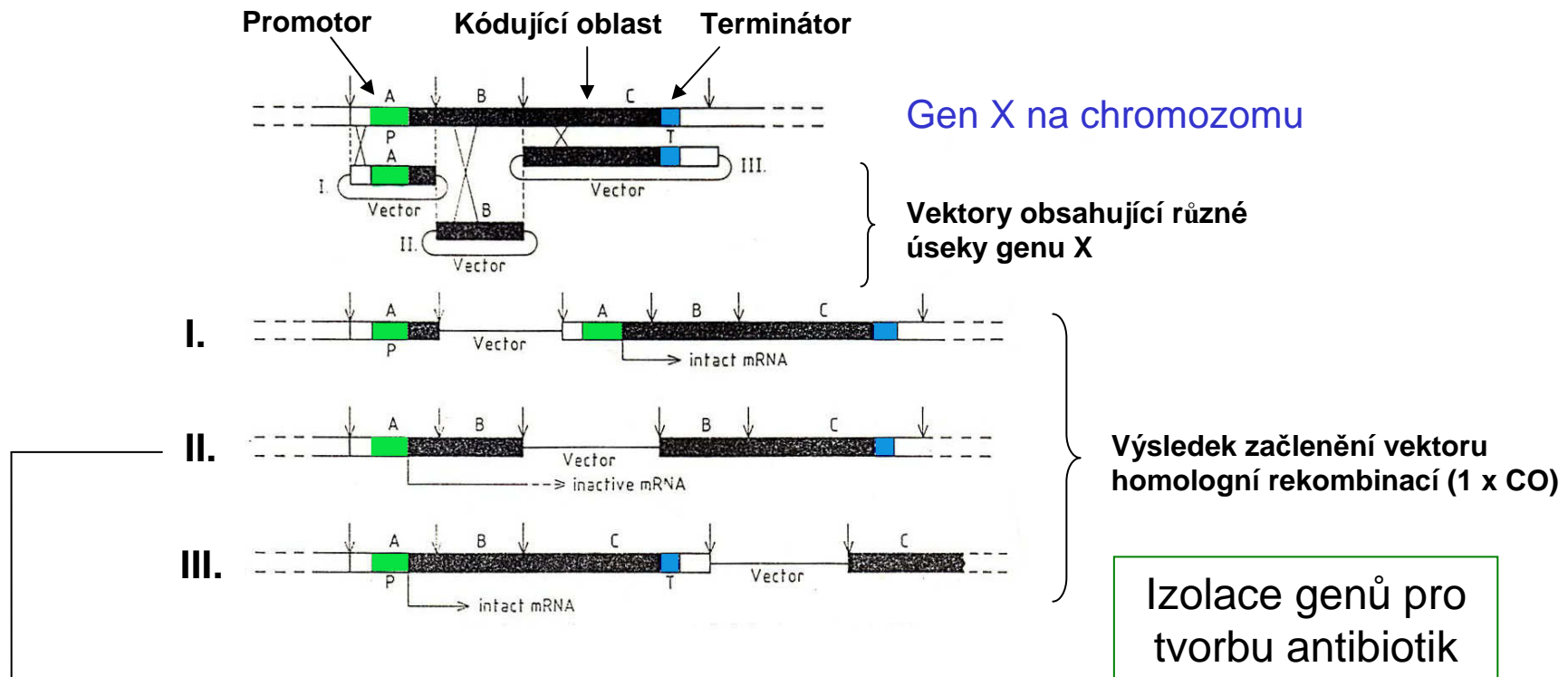
# Klonování ve streptomycetách

- 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:**  $\beta$ -glukoronidáza,  $\beta$ -galaktozidáza, trehaláza

## Konjugativní přenos plazmidových vektorů z *Escherichia coli* do metanogenních archeí *Methanococcus maripaludis*

Transformation of *M. maripaludis* by *E. coli* displayed all of the hallmarks of conjugation: *oriT* was required in *cis* on the plasmid to be transferred, mobilization functions were required in the donor cell, the plasmid had to be inside the donor cells, donor cells had to be viable, cell-to-cell contact was required, and DNase I had no effect on the transformation. This shows that conjugation between *Bacteria* and *Archaea* can occur, thereby expanding the phylogenetic range of recipients that can be transformed using the RP4 conjugal-transfer system. Although the process described here is less efficient than standard PEG-mediated transformation of *M. maripaludis*, it is less laborious and may be useful for routine transformation of this methanogen. This approach may also prove fruitful for establishing genetic systems in other methanogens and *Archaea*.

## Využití chaperonů archeí pro přípravu funkčních proteinů

An expression cassette which can express a soluble form of a desired protein in a bacterial cell, wherein the cassette comprises a sequence in which a gene encoding a molecular chaperon is operably linked to a first promoter and a site to which a gene encoding the desired protein can be inserted is provided. Also, a method for expressing a desired protein in a soluble form is provided by the use of the expression cassette or co-transformation with a plasmid which can express a molecular chaperon and a plasmid which can express the desired protein.



