

Molekulární biotechnologie č.11

Produkce nízkomolekulárních látek GM mikroorganismy

Využití transgenních organismů

- Transgenní organismus: Organismus, jehož genom byl geneticky modifikován cizorodou DNA.
- Transgenní mikroorganismy
- Transgenní rostliny
- Transgenní živočichové

Dále byla zkonstruována

- řada geneticky modifikovaných mikroorganismů, u nichž byly pozměněny metabolické dráhy pro tvorbu
- enzymů,
- antibiotik,
- aminokyselin,
- vitaminů aj.
- Výsledné produkty se vyznačují novými vlastnostmi.

Transgenní mikroorganismy

- umožňují přípravu proteinů
- které se přirozeně vytvářejí v jiných, nepříbuzných organismech (např. lidský inzulin, lidský růstový hormon).

Farmaceutické proteiny

- Dříve produkovány v omezeném množství
- Bylo klonováno více než 300 genů (cDNA) kódujících různé proteiny využitelné jako lidské terapeutické agens

Lidské proteiny produkované GM mikroorganismy (Glick a spol. 2003)

Table 7.1 Human proteins that have been produced by recombinant DNA technology.

Protein	Use
α_1 -Antitrypsin	Treat emphysema
Adrenocorticotrophic hormone	Treat rheumatic diseases
B-cell growth factors	Treat immune disorders
Calcitonin	Treat osteomalacia
Colony stimulating factors	Treat blood disorders
Chorionic gonadotropin	Treat anovulation
Endorphins and enkephalins	Analgesic agent
Epidermal growth factor	Promote wound healing
Erythropoietin	Treat anemia
Factor VIII	Coagulation factor; treat hemophilia
Factor IX	Coagulation factor; treat hemophilia
Growth hormone	Promote growth
Growth hormone releasing factor	Promote growth
Insulin	Treat diabetes
Interferons (α , β , γ)	Antiviral, antitumor, anticancer agent
Interleukins	Cancer therapy; treat immune disorders
Lymphotoxin	Antitumor agent
Macrophage activating factor	Antitumor agent
Nerve growth factor	Promote nerve damage repair
Platelet-derived growth factor	Treat atherosclerosis
Relaxin	Facilitate childbirth
Serum albumin	Supplement plasma
Somatomedin C	Promote growth
Tissue plasminogen activator	Thrombolytic agent
Tumor necrosis factor	Antitumor agent
Urogastrone	Antiulcerative agent
Urokinase	Thrombolytic agent

Lidské interferony

- $\text{INF}\alpha$, $\text{INF}\beta$ jsou syntetizovány v buňkách infikovaných viry
- $\text{INF}\gamma$ je syntetizován v reakci na růstový stimulační agens
- Připravují se interferony s kombinovanými vlastnostmi (hybridní geny)
- A exprimovány v *E.coli*

Hybridní interferonové geny (Glick a spol.2003)

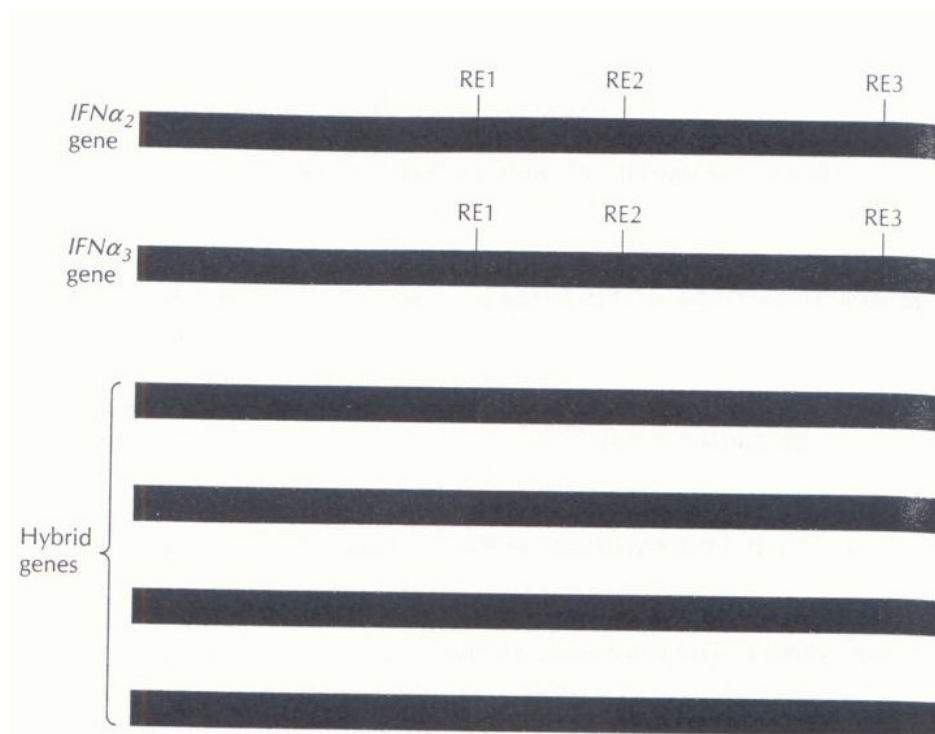


Figure 7.1 Structure of the interferon- α_2 and - α_3 genes ($IFN\alpha_2$, $IFN\alpha_3$) and four hybrid genes. Comparison of the sequences of the $IFN\alpha_2$ and $IFN\alpha_3$ genes shows shared restriction enzyme sites (RE1, RE2, RE3). Digestion of the genes at the indicated restriction sites and ligation of the resultant fragments generates a number of different hybrid interferon genes, of which four possibilities are shown.

Lidský růstový hormon

- Somatotropin
- Podává se denně mnoho roků (pokud trvá růst dítěte)
- Produkováný v *E.coli* jako jeden z prvních rekombinantních proteinů (firma Genentech)

Interleukiny

- Se používají při terapii rakoviny
- k léčbě poruch imunity

Nejvhodnějším mikroorganismem

- Pro produkci interleukinu-3 je *Bacillus licheniformis*
- produkuje 15 kD protein v dostatečném množství

Hladiny interleukinu-3 v různých GM organismech (Glick a spol.2003)

Table 7.2 Levels of interleukin-3 synthesis achieved in different host systems.

Host system	Promoter ^a	Expression level (units)	Protein form
<i>B. licheniformis</i>	Amylase	300	15 kD, mature
<i>E. coli</i>	<i>lacZ</i>	500	20 kD, fusion
<i>E. coli</i>	<i>lacZ</i>	20	15 kD, mature
Human cells	Metallothionein	2	20–40 kD
<i>K. lactis</i>	Lactase	20	20–100 kD
<i>S. cerevisiae</i>	Mating factor α	20	20–100 kD

^a In each case the strongest available promoter for that system was used.

Adapted from van Leen et al. 1991. *Bio/Technology* 9:47–52.

Další využití GM mikroorganismů

- Při produkci terapeutických enzymů:

- DNaseI

- Alginát lyáza

alginát je polysacharid produkovaný půdními a mořskými mikroorganismy a mukósními kmeny *Ps. aeruginosa* (pacienti s cystickou fibrózou)

- Glykozidázy (využití při transfuzích)

- Při produkci dalších enzymů

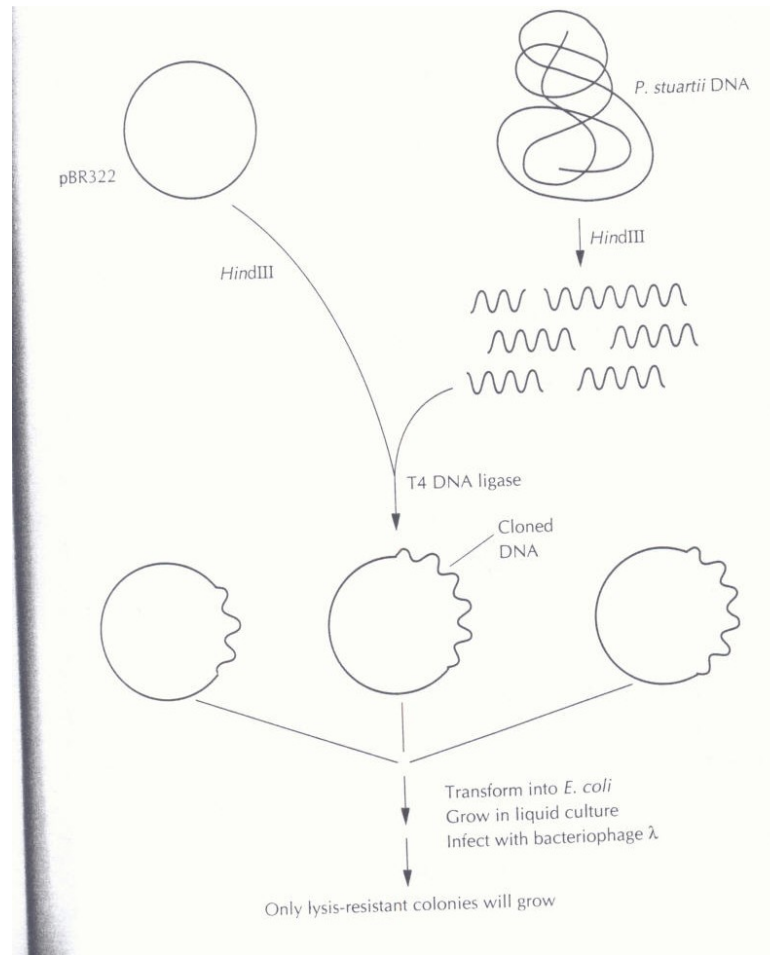
- Restriktázy

- Lipázy

Selekce genů kódujících restriktázy

- Restriktázy jsou produkovány bakteriálními buňkami
- Geny jsou izolovány a klonovány v *E.coli*
- Na trhu je k dispozici stovky různých restriktáz

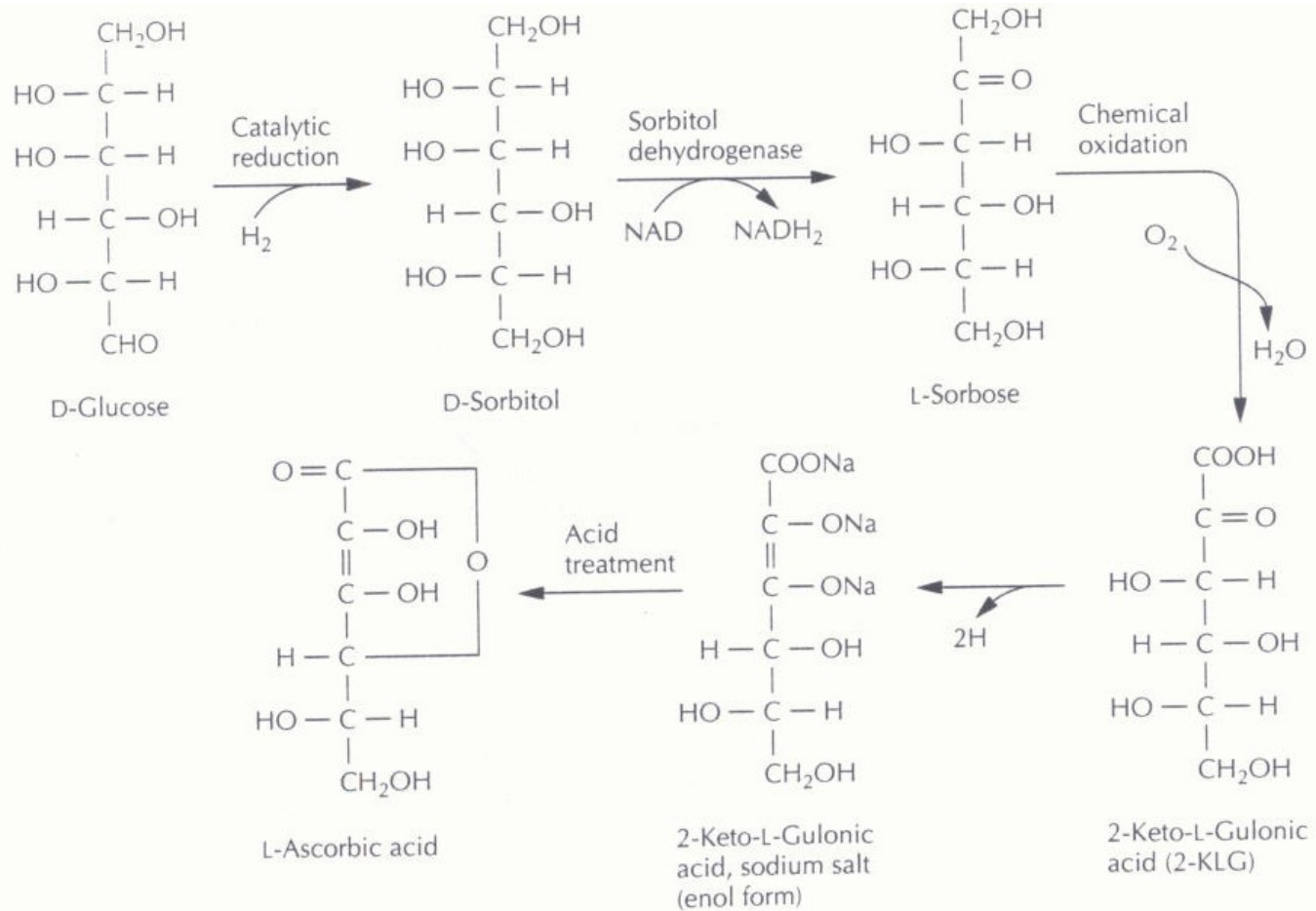
Figure 7.2 Method for cloning and selecting the gene for the restriction enzyme *Pst*I. The *P. stuartii* chromosomal DNA is digested with *Hind*III and ligated into the *Hind*III site of plasmid pBR322. Transformants are grown in liquid medium before being infected with bacteriophage λ . The resistance of some transformants to lysis by λ is due to the presence and expression of a cloned *Pst*I gene.



Syntéza nízkomolekulárních látek s využitím mikroorganismů

- Kyselina askorbová
- Prekursorem je kys. 2-keto L-gulonová (2-KLG)
- Kys. 2-KLG může být syntetizována různými drahami různými baktériemi (*Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Erwinia* nebo *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*)
- Produkce 2-KLG bylo docíleno GM *Erwinia herbicola* nesoucí gen z *Corynebacterium*)

Figure 7.3 Commercial synthesis of L-ascorbic acid. Except for the microbial conversion of D-sorbitol to L-sorbose, all of the other steps are chemical reactions. The microbial conversion is carried out by *Acetobacter suboxydans*, which produces the enzyme sorbitol dehydrogenase.



Syntéza kys.keto gulonové (Glick a spol.2003)

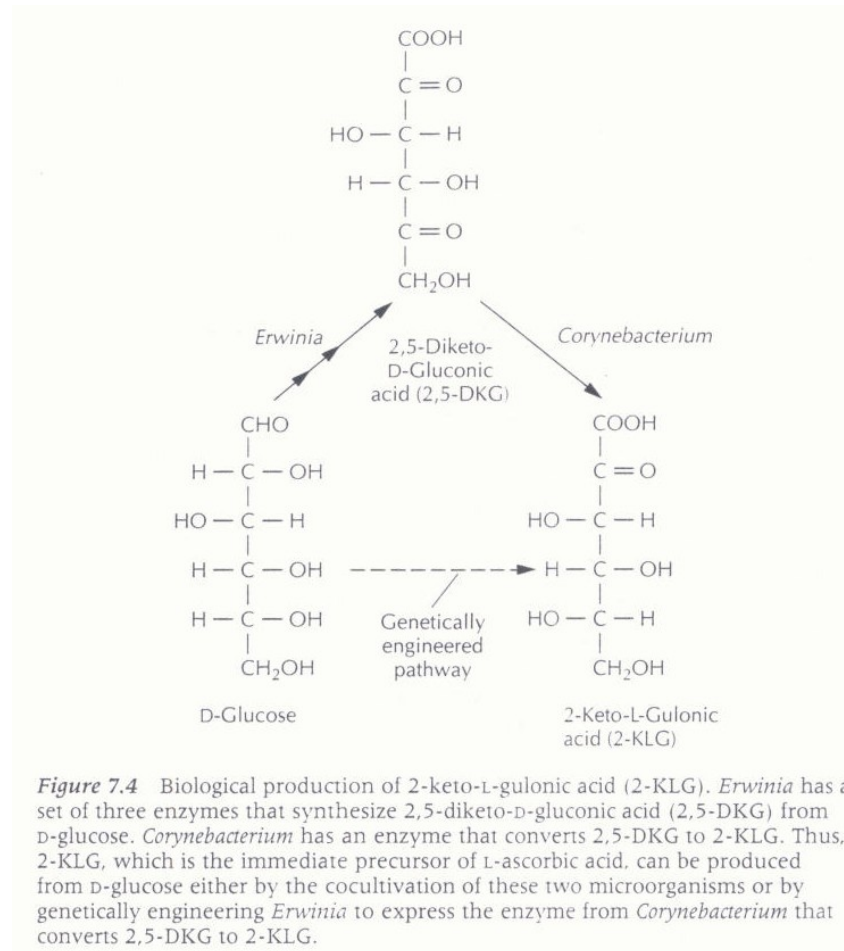
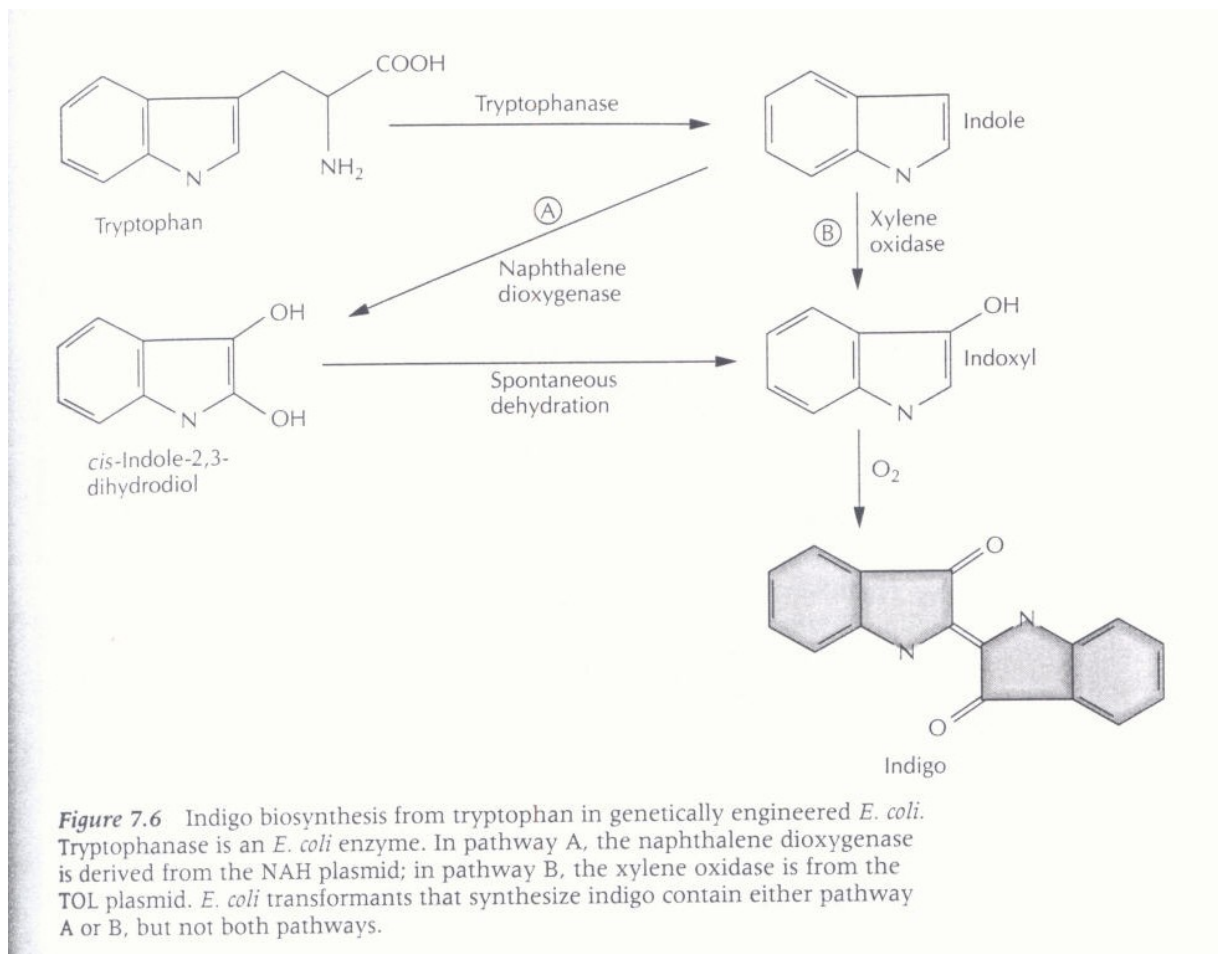


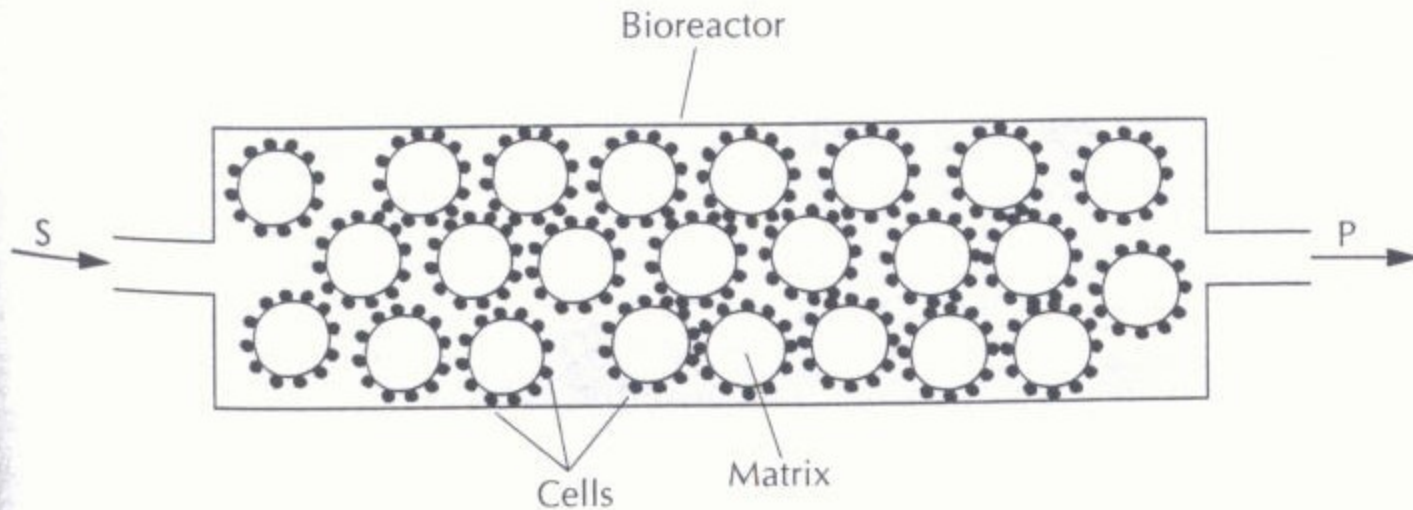
Figure 7.4 Biological production of 2-keto-L-gulonic acid (2-KLG). *Erwinia* has a set of three enzymes that synthesize 2,5-diketo-D-gluconic acid (2,5-DKG) from D-glucose. *Corynebacterium* has an enzyme that converts 2,5-DKG to 2-KLG. Thus, 2-KLG, which is the immediate precursor of L-ascorbic acid, can be produced from D-glucose either by the cocultivation of these two microorganisms or by genetically engineering *Erwinia* to express the enzyme from *Corynebacterium* that converts 2,5-DKG to 2-KLG.

Biosyntéza barvy indiga v GM *E.coli* (Glick a spol.2003)



Bioreaktor pro produkcii indiga

Figure 7.7 Schematic representation of a bioreactor that might be suitable for the production of indigo from recombinant *E. coli* cells. The cells are immobilized either chemically or physically to particles of a stable matrix. The substrate tryptophan (S) is added at one end and the product indigo (P) is removed continuously from the other end. The rate of flow through the column would be limited by the rate of conversion of substrate into product.



Syntéza aminokyselin

- Donorové mikroorganismy: *Corynebacterium* nebo *Brevibacterium*
- Konstruovány kyvadlové vektory *E.coli*-*Corynebacterium*
- Aminokyseliny významné v potravinářském průmyslu (antioxidanty, doplňky potravin a krmiv)
- v medicíně (infuzní roztoky, výroba polymerů)
- v kosmetice

Komerční aplikace aminokyselin

Table 7.3 Commercial applications of amino acids.

Amino acid	Application
Alanine	Flavor enhancer
Arginine	Therapy for liver diseases
Aspartic acid	Flavor enhancer; sweetener synthesis
Asparagine	Therapy
Cysteine	Bread production; therapy for bronchitis; antioxidant
Glutamic acid	Flavor enhancer
Glutamine	Therapy for ulcers
Glycine	Sweetener synthesis
Histidine	Therapy for ulcers; antioxidant
Isoleucine	Infusions
Leucine	Infusions
Lysine	Feed additive; food additive
Methionine	Feed additive
Phenylalanine	Infusions; sweetener synthesis
Proline	Infusions
Serine	Cosmetics
Threonine	Feed additive
Tryptophan	Infusions; antioxidant
Tyrosine	Infusions; precursor for L-DOPA
Valine	Infusions

Produkce tryptofanu GM

Corynebacterium glutamicum

Table 7.4 Production of tryptophan under standard growth conditions by certain strains of *C. glutamicum*.

Strain	Tryptophan (mg mL ⁻¹)
Mutant	0.00
Mutant with vector	0.34
Wild-type	0.48
Wild-type with vector	1.12

Adapted from Ozaki et al. 1989. U.S. Patent #4,874,698.

Produkce antibiotik

- Producenti jsou zástupci rodu *Streptomyces* (G⁺ půdní bakterie), houby, další G⁻ a G⁺ bakterie
- Využívá se klonování biosyntetických genů (kódují 10 až 30 enzymatických reakcí)
- Klonují se dlouhé fragmenty DNA

Antibiotika produkovaná různými GM kmeny *Streptomyces*

Table 7.5 Antibiotics produced by various *Streptomyces* strains and those transformed with plasmids pIJ2303 and pIJ2315.

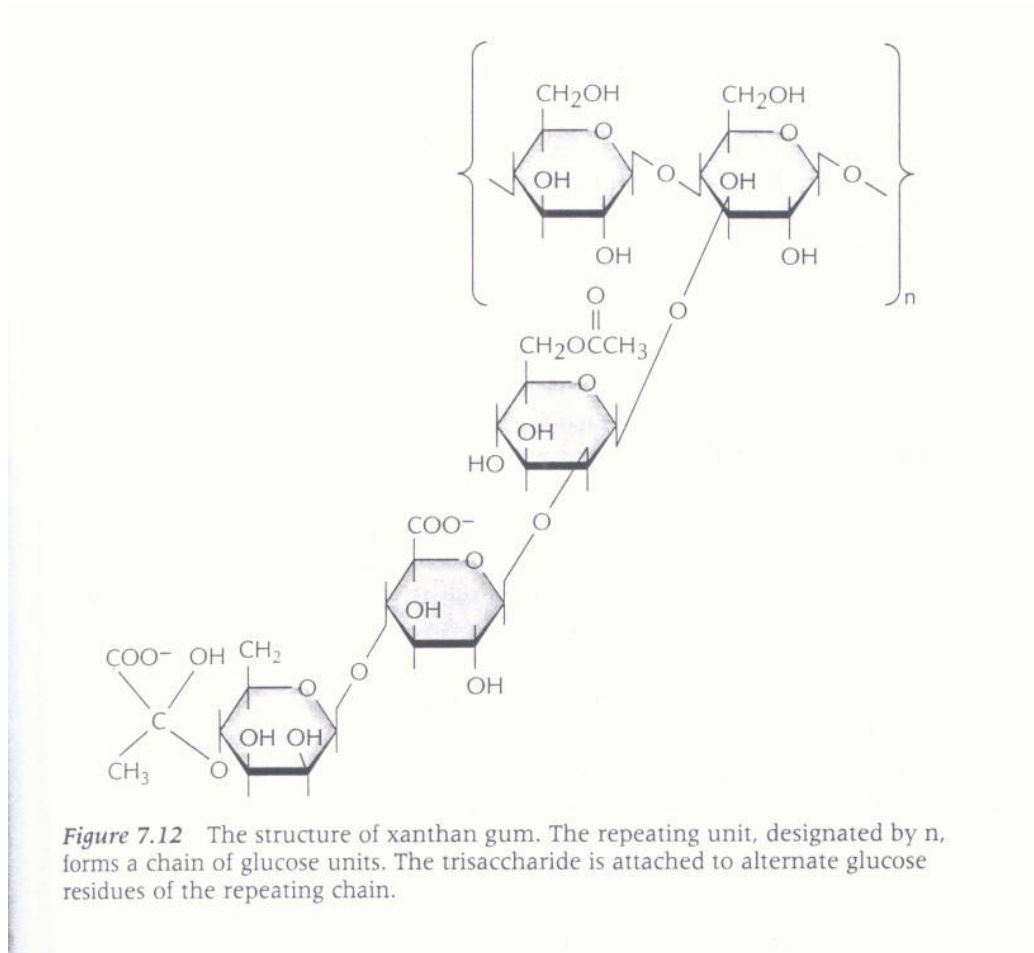
Strain	Color of culture		Antibiotic
	Acidic	Alkaline	
<i>S. coelicolor</i>	Red	Blue	Actinorhodine
<i>Streptomyces</i> sp.	Yellow	Brown	Medermycin
<i>Streptomyces</i> sp./pIJ2303	Red	Blue	Medermycin, actinorhodine
<i>Streptomyces</i> sp./pIJ2315	Red	Purple	Mederrhodine A, medermycin
<i>S. violaceoruber</i> B1140	Yellow	Brown	Not tested
<i>S. violaceoruber</i> B1140/pIJ2303	Red	Bue-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

Adapted from Hopwood et al. 1985. *Nature* 314:642–644.

Produkce biopolymerů

- **Xantamová guma** (exopolysacharid)
- Má vlastnosti podobné plastickým hmotám,
- Vysoce viskosní a stabilní za extrémních podmínek
- *Xanthomonas campestris*, G- aerobní půdní bakterie, využívá glukózu, sacharózu a škrob jako zdroj C (ne laktózu)

Struktura xantamové gummy



Produkce xantamové gumy GM *Xanthomonas campestris*, která využívá laktózu a syrovátku

Table 7.6 Production of xanthan gum by wild-type and transformed *X. campestris*.

Strain of <i>X. campestris</i>	Amount of xanthan gum produced ($\mu\text{g/mL}$) ^a		
	Glucose	Lactose	Whey
Wild type	3,530	245	224
Transformant	3,711	3,608	4,241

^a The amount of product is expressed as micrograms per milliliter of culture grown on a minimal medium with either 0.4% glucose or 0.4% lactose added, or on diluted whey (10%) which contains approximately 0.4% lactose. The transformant carries the *E. coli lacZY* genes on a plasmid.

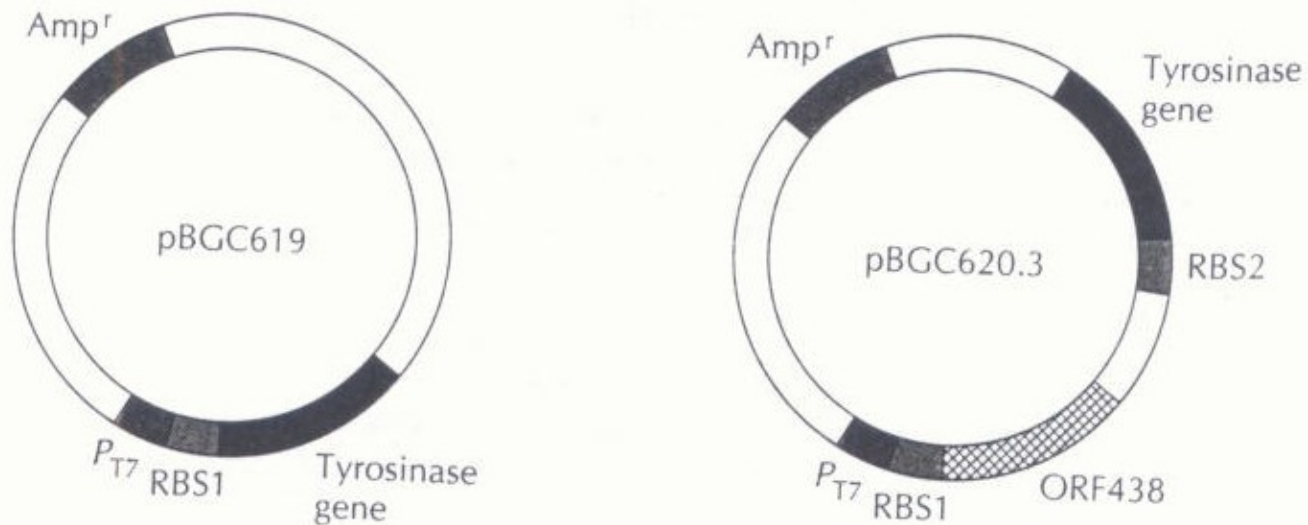
Adapted from Fu and Tseng, 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:919–923.

Produkce

- **Melaninu** – polymeru, který absorbuje světlo
- Je syntetizován bakteriemi, zvířaty, rostlinami, houbami
- Používá se v kosmetickém průmyslu a v plastech odolných vůči slunečnímu záření

Expresní plasmidy s klonovanými geny pro biosyntézu melaninu

Figure 7.13 Two *E. coli* expression plasmids carrying melanin biosynthesis genes. Plasmid pBGC619 contains the tyrosinase gene. Plasmid pBGC620.3 contains an open reading frame (ORF438) for melanin synthesis and the tyrosinase gene. Transcription of the cloned genes is under the control of the *E. coli* bacteriophage T7 promoter (P_{T7}). RBS1 and RBS2 denote two different ribosome binding sites. The plasmids both carry genes that confer resistance to ampicillin (Amp^r).



Produkce v GM mikroorganismech

- **Adhesivního proteinu**
- biopolymeru původně izolovaného z *Mytilus edulis* (*Slávka jedlá*, mlž z čeledi Slávkovitých)
- Odolný vůči vodě, silně adhesivní
- Gummy (biopolymer z různých rostlin)
- **Polyhydrxyalkanoáty** (biodegradabilní polymery s termoplastickými a elastickými vlastnostmi, produkované různými mikroorganismy např. *Alcaligenes eutrophus*)
- **Hyaluronová kyselina** (polymer glukosaminoglykan, používá se v medicíně, v kosmetickém průmyslu, gen izolován ze *Streptococcus pyogenes* a klonován v *Bacillus subtilis*)

Postranslační hydroxylace adhesivního proteinu *Mytilus edulis*

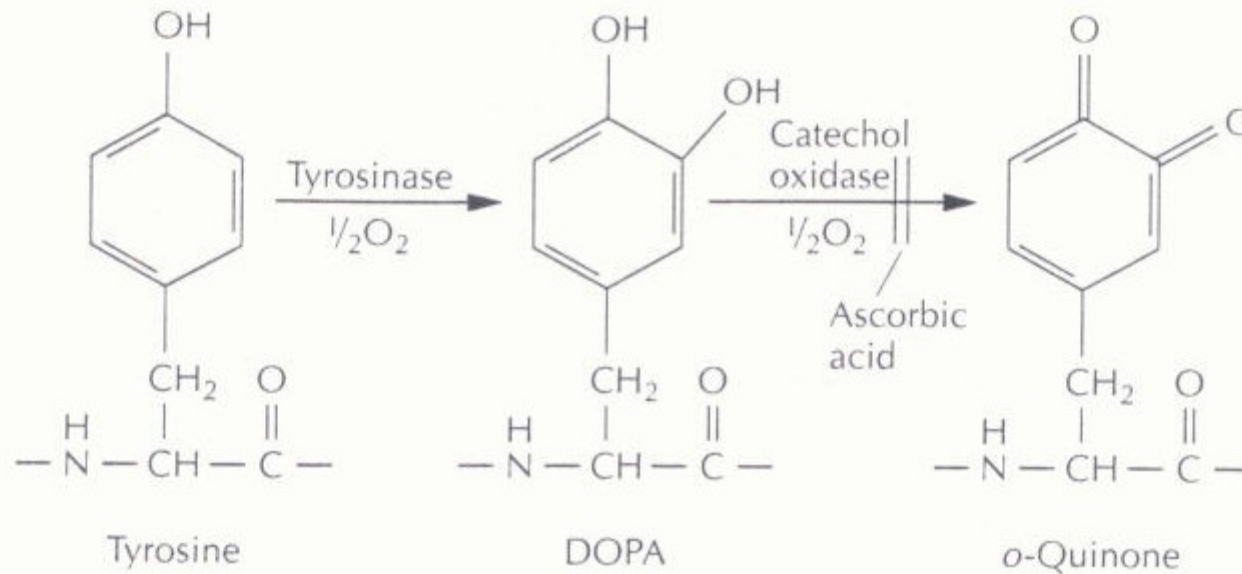


Figure 7.14 Pathway for posttranslational hydroxylation of some of the tyrosine residues in the *Mytilus edulis* adhesive protein. Tyrosine is converted to DOPA, by the action of the enzyme tyrosinase, and then can be oxidized to *o*-quinone by either catechol oxidase or tyrosinase. The oxidation of DOPA to *o*-quinone can be prevented by the addition of ascorbic acid.