

Metabolizma ve hücre mühendisliği

Rasyonel Yöntemler

GEÇEN DERS:

Escherichia coli'de mutasyon hızı:

5.4×10^{-10} mutasyon/bç/genom replikasyonu

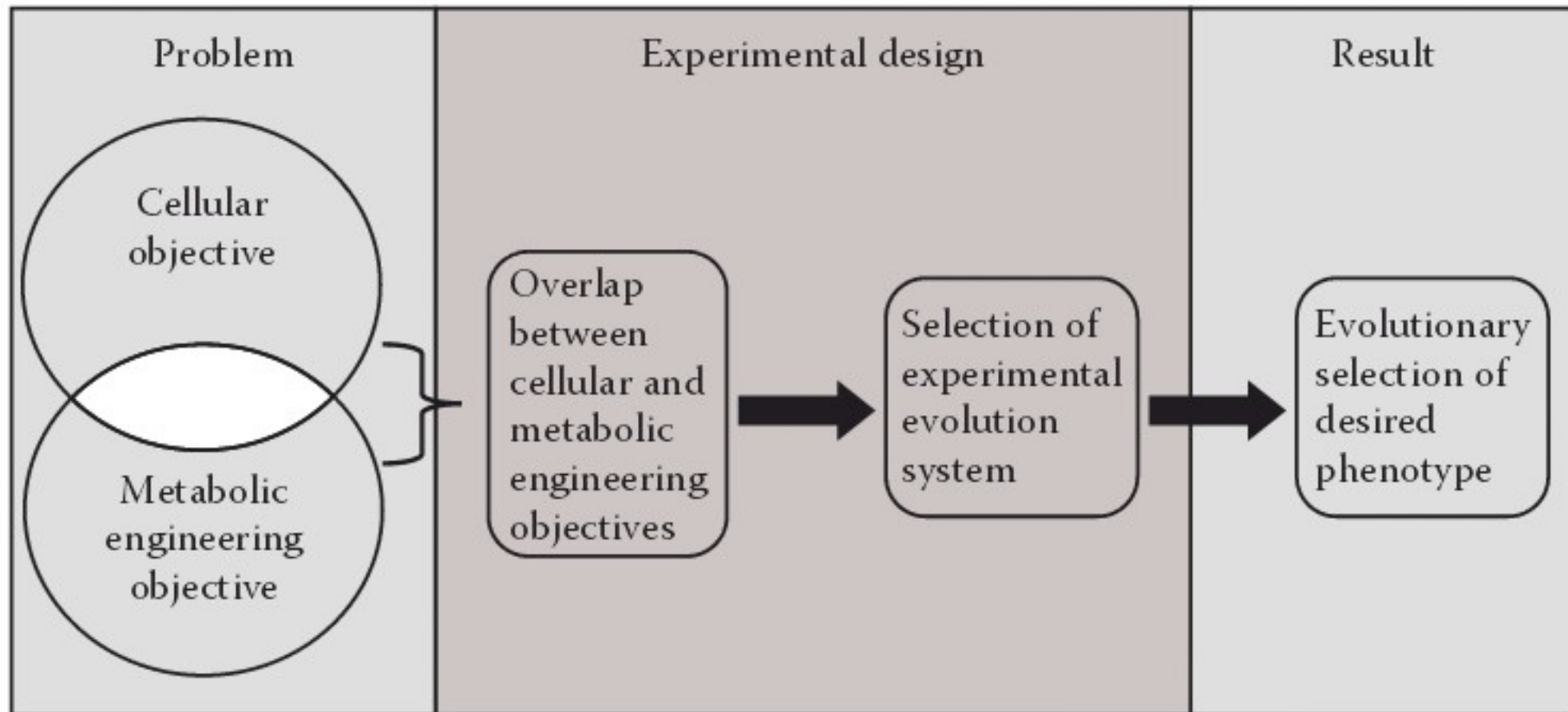
Genom boyutu: 4.6×10^6 baz çifti/genom

0.0025 mutasyon/genom/replikasyon

(Sinerim/Non-sinerim SNP'ler dahil)

Daha büyük boyutlu mutasyonlar:

- Rekombinasyon
- İnsersiyon/deleksiyon
- Genomik yeniden düzenlenme . . .



Mutasyon hızını belirlemede kullanacağımız gereçler :

- Replikasyon

- Tamir

- Transpozon aktivitesi

NASIL ?

STRES

Hücreler mutasyon hızlarını ayarlayabilir — Mutator cells

Örnek: *E. coli* ≥ 5 DNA-polimeraz
pol II \rightarrow hatasız!

pol III/IV/V \rightarrow replikasyon hataları

Metilasyona dayalı tamir \rightarrow x100 hasta!!!

Sonuçta, fenotipte gördüğümüz değişiklikler:

- Artmış üreme hızı
- İyileşmiş biyokütle verimi
- Generalists / Specialists

Her ortamın/koşulun
mikrobu :)

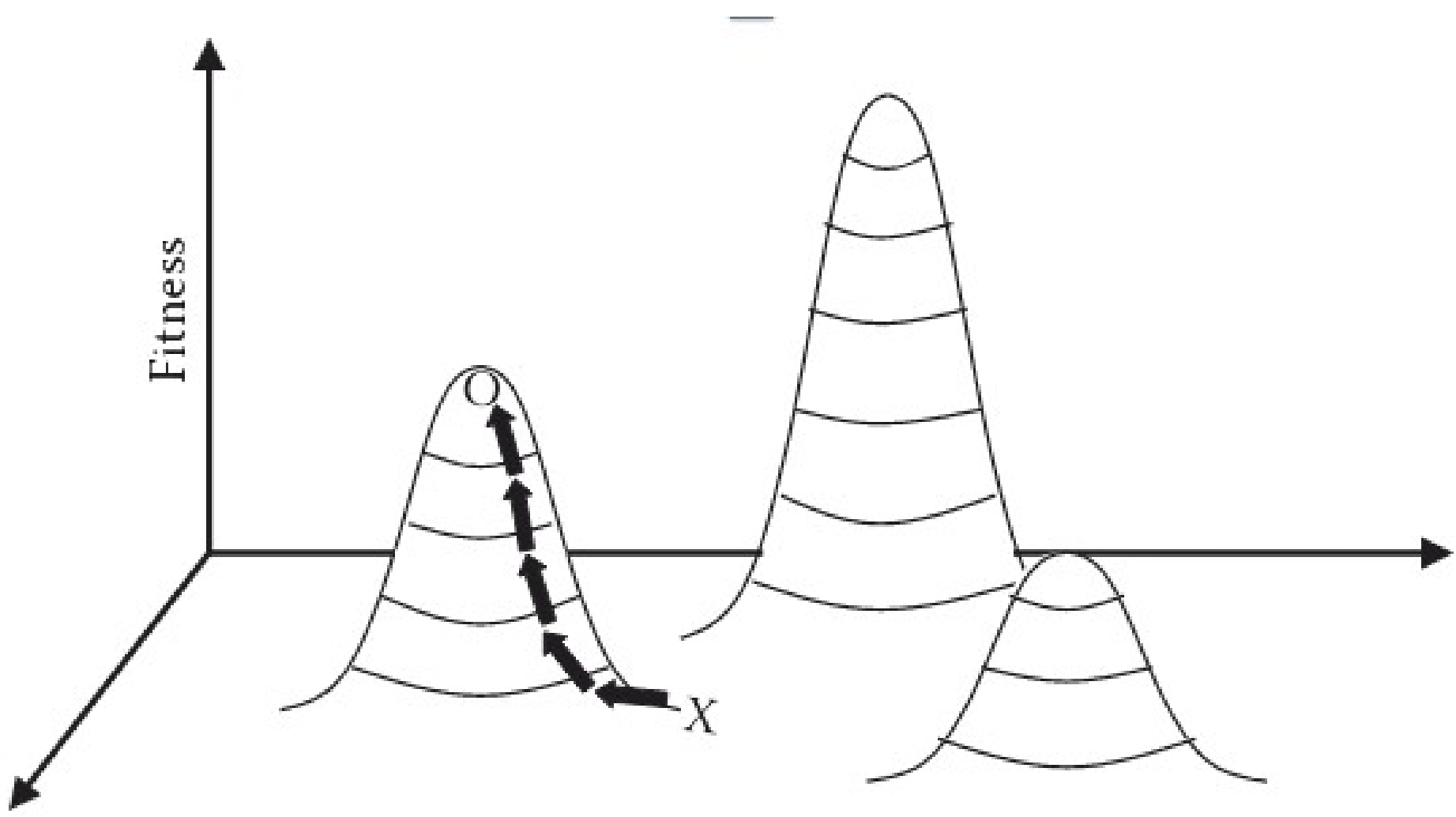
olmasını
istediğimiz

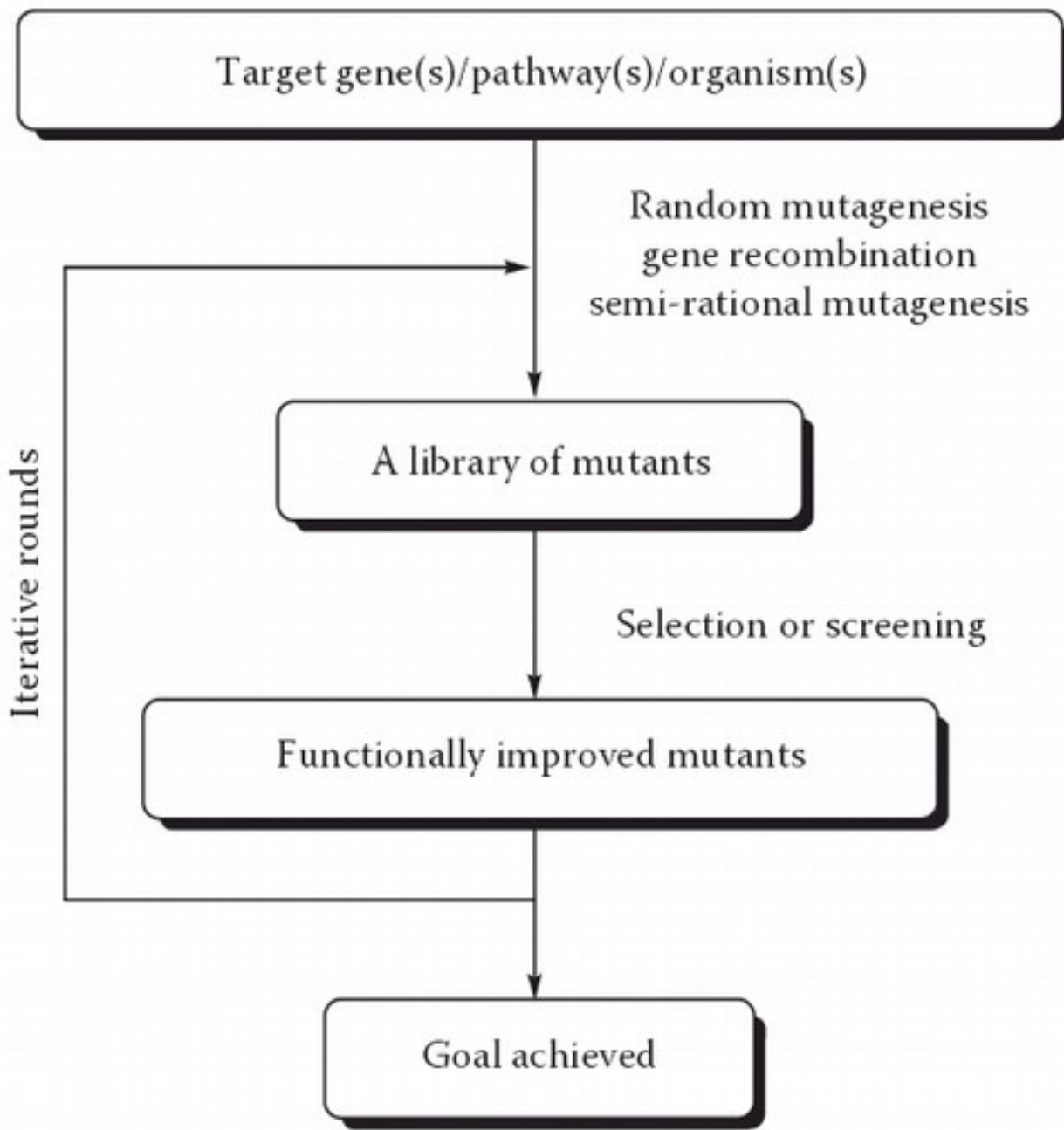
Belirli koşulda performansı iyi

gerçekte
olan

Muller's ratchet: kötü mutasyonlar
daha sık oluyor!







Stres toleransı

antibiyotikler toksik kimyasallar
ekstrem sıcaklıklar

besin limitasyonu

Evrimsel
Metabolizma
Mühendisliği

Substrat kullanımı

Bir çesit besin limitasyonu
- organizmanın belirli bir
besin maddesini kullanmaya
zorlanması

S. cerevisiae - Xylulose

Birden fazla hedef
aynı anda

Opt Knock

Gen deleksyonları yaparak
genom boyutunda metabolik
rekonstrüksiyon

W0000w!

Yeni seçilim kriterleri



metabolik olarak aktif ancak
bölünmeyen hücrelerin
seçimini

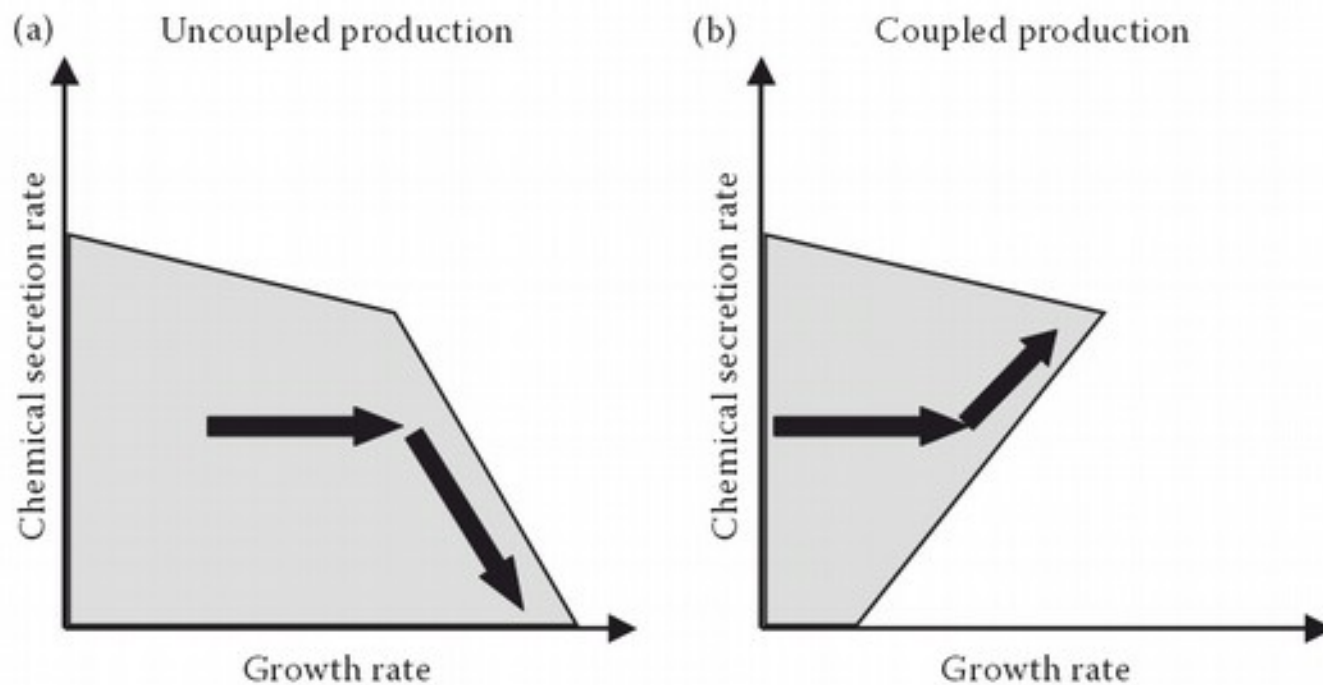
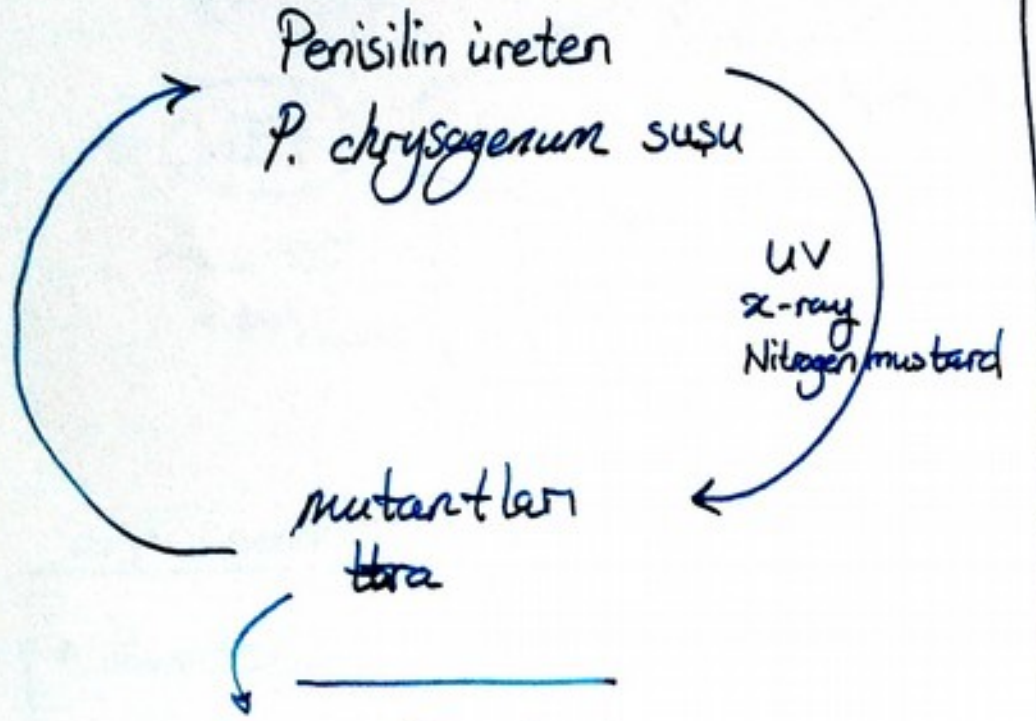


FIGURE 1.4 Schematic depiction of relationship between metabolite secretion and growth rate as growth rates increase during evolution. Shaded areas represent feasible metabolic phenotypes. (a) Uncoupled phenotypes utilize metabolic resources to increase growth rate causing a decrease in target metabolite secretion. (b) OptKnock designs stoichiometrically couple metabolite secretion to growth causing increased secretion as growth rate increases.

PENİSİLİN ÜRETİMİNİ ARTIRMAK



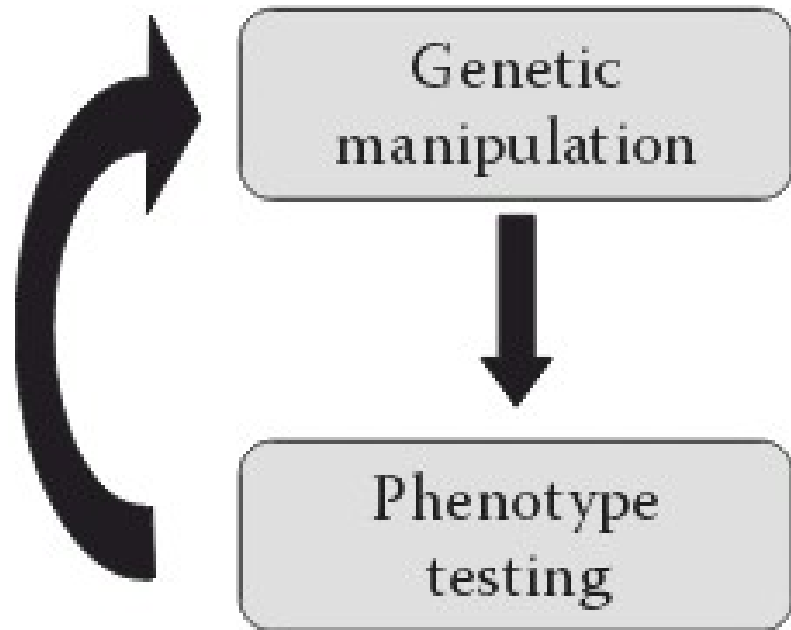
P. chrysogenum BW 1890

penisilin biyosentetik genleri 8-16
ardışık kopya \rightarrow 32-64x \uparrow üretim !

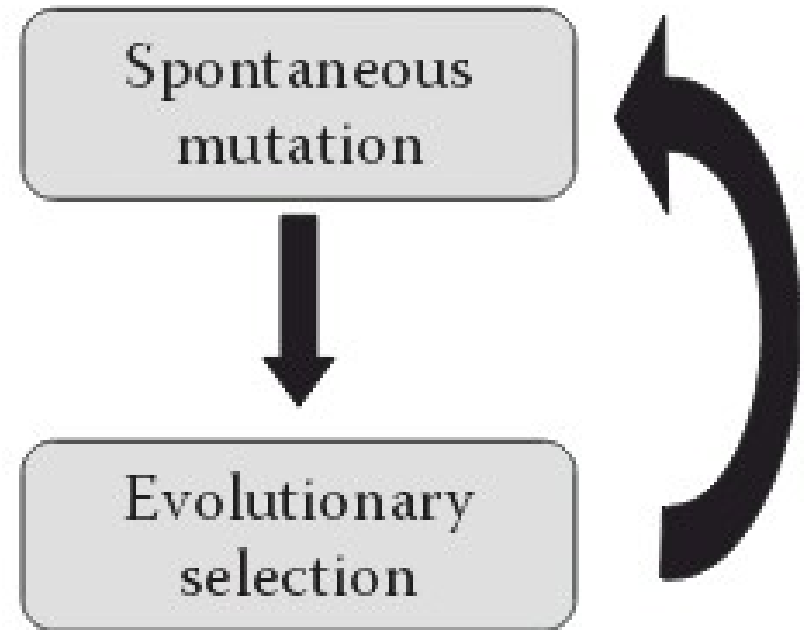
(? chromatid misalignment/recombination)

- Penisilin biyosentezinde yer alan genlerin "over" ekspresyonu
- Penisilin yapısal genlerini kuvvetli promotörlere
- "Genome-wide" analiz : penisilin metabolizması
- Yarışmaya giren metabolik yolların eliminasyonu
- Biyosentetik öncüllerin artırılması için gerekli enzimlerin heterolog üretimi
- Tüm penisilin sentez yolağının heterolog olarak oluşturulması

Metabolic engineering



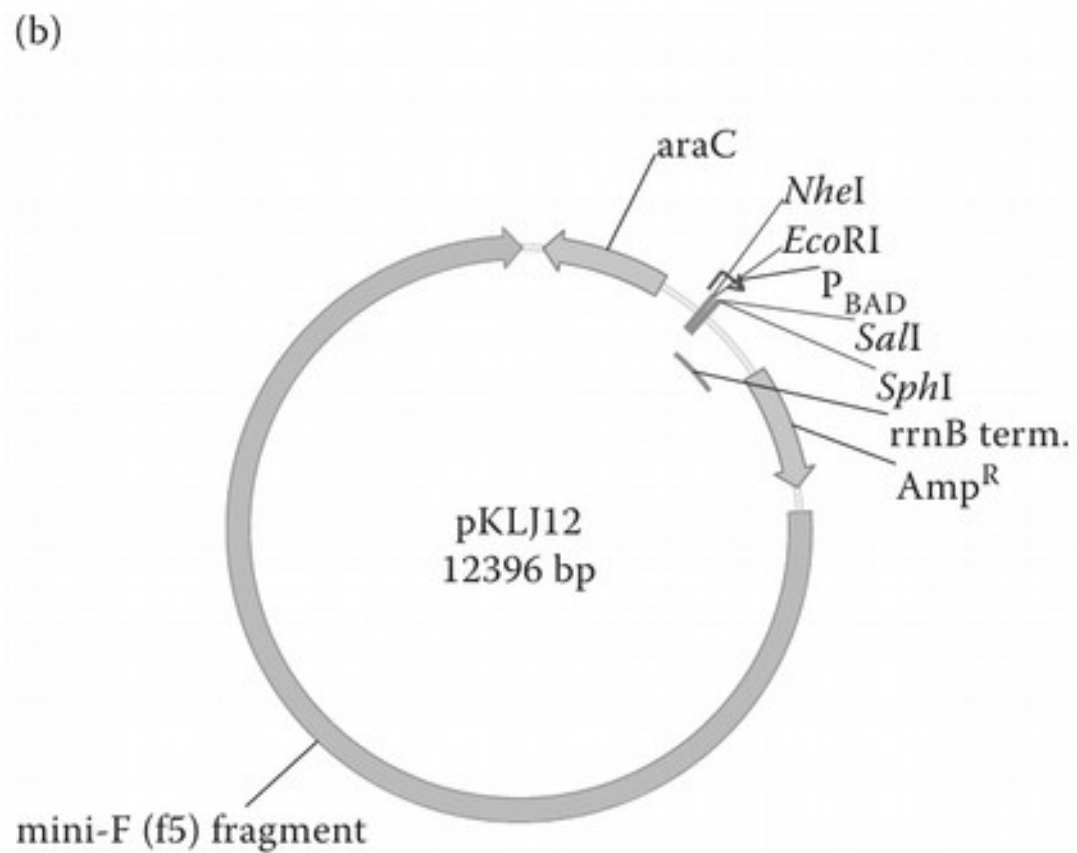
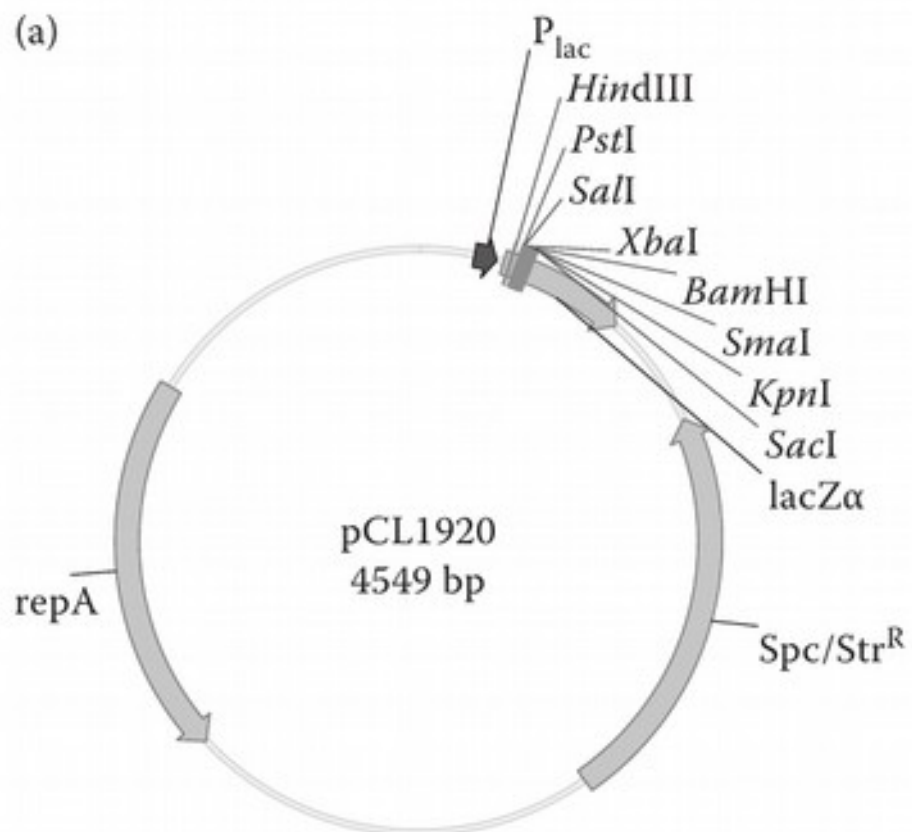
Evolution



DAHA RASYONEL YAKLAŞIMLAR (HEDEFE YÖNELİK)

Hücreyel metabolizmayı şekillendirmek için:

- Promotor mutagenesi -35, -10
- Kromozomal integrasyon
- Rekombinasyon
- Yapay "construct" lar
- RNA düzeyinde regülasyon



Low-Copy Plasmids

Multicopy Plasmids

Case 1: Polyphosphate²⁸

219 $\mu\text{mol Pi/g DCW}$ (1X)

164 $\mu\text{mol/L}$ (1.3X)

223 $\mu\text{mol Pi/g DCW}$ (1X)

127 $\mu\text{mol/L}$ (1X)

Case 2: Lycopene²⁸

tac promoter (0 mM IPTG)

8.5 mg/L (1.2X)

tac promoter (0.1 mM IPTG)

8.5 mg/L (7.1X)

araBAD promoter (13.3 mM

arabinose) 7.5 mg/L (0.7X)

tac promoter (0 mM IPTG)

6.9 mg/L (1X)

tac promoter (0.1 mM IPTG)

1.2 mg/L (1X)

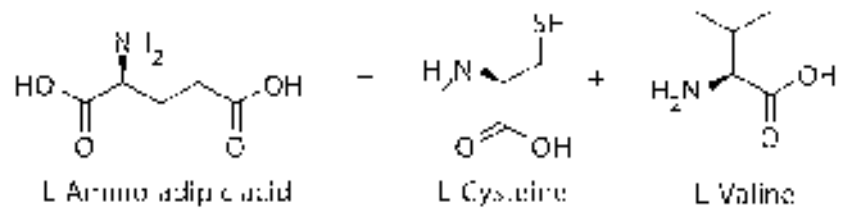
araBAD promoter (13.3 mM

arabinose) 10.3 mg/L (1X)

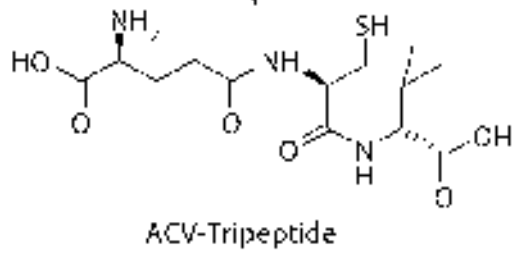
Case 3: Tetrahydrobiopterin (BH4)^{*,67}

~120 AU (1.6X)

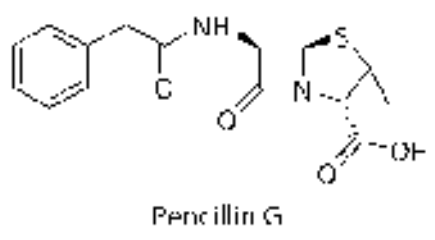
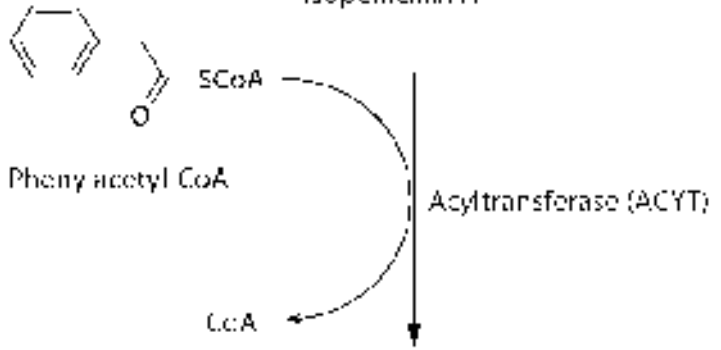
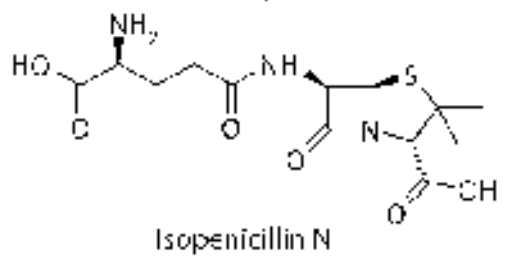
~75 AU (1X)

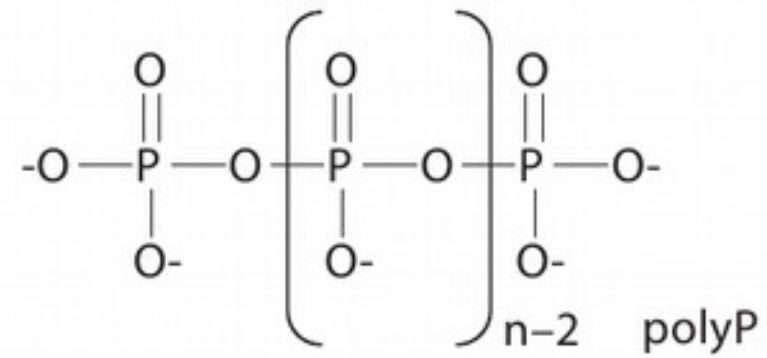
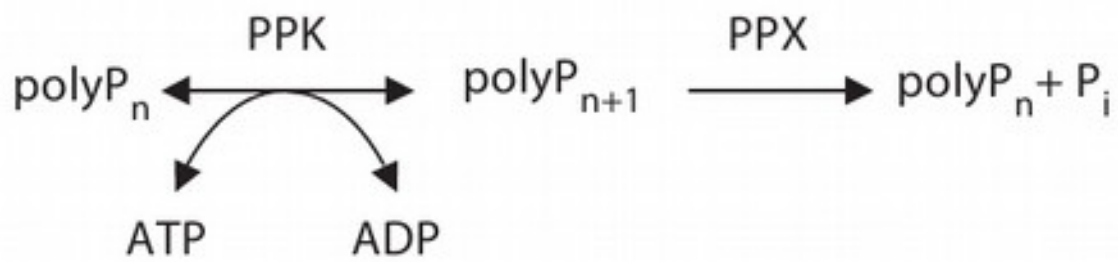


Aminoadipyl cysteinyl valine synthetase (ACVS)

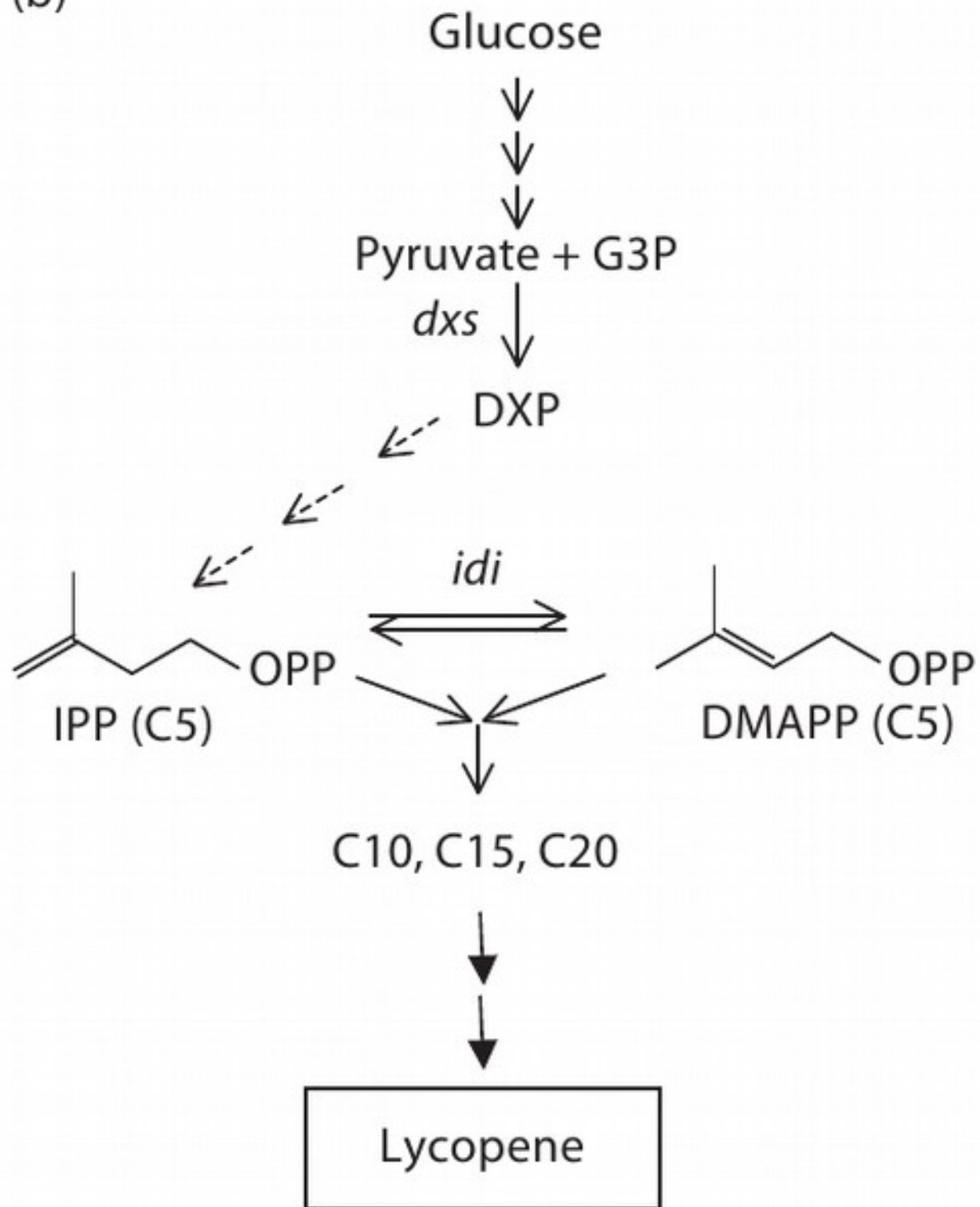


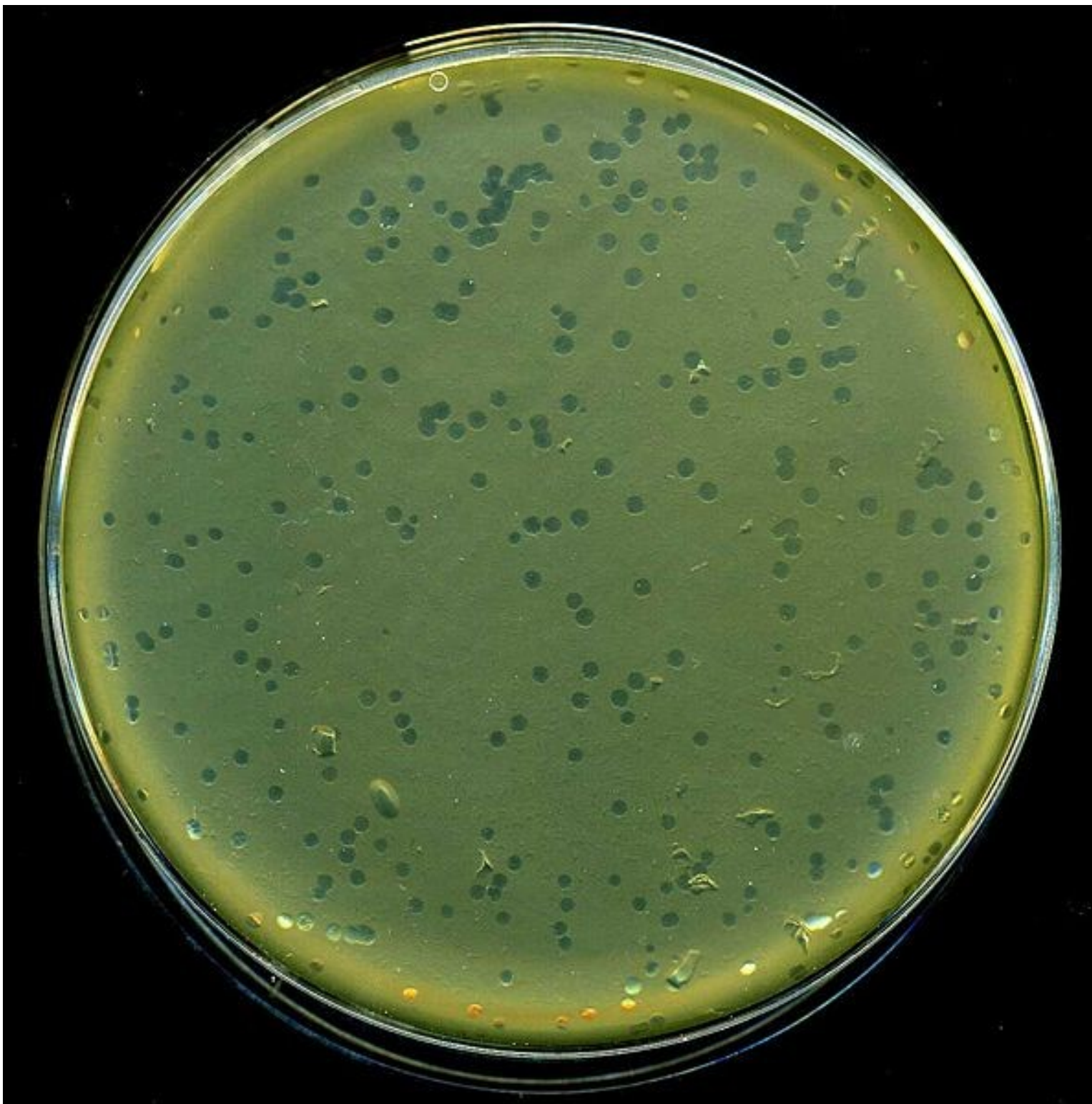
Isopenicillin N Synthetase (PNS)





(b)



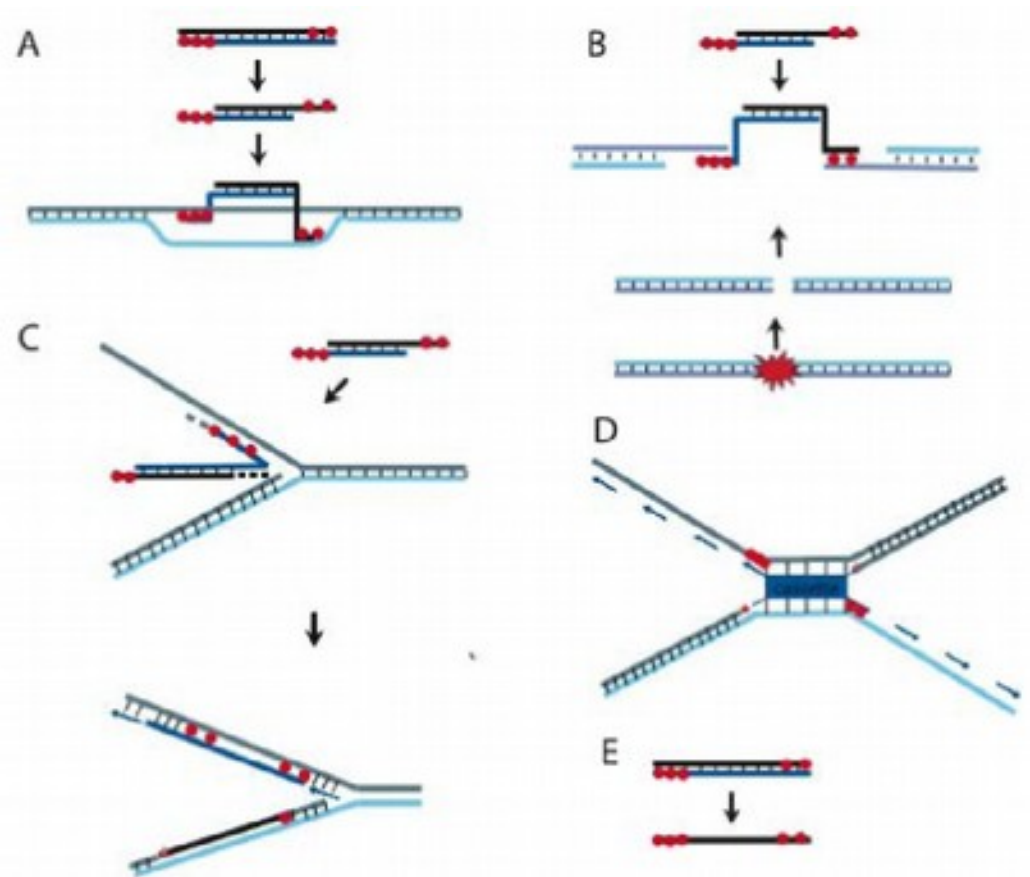
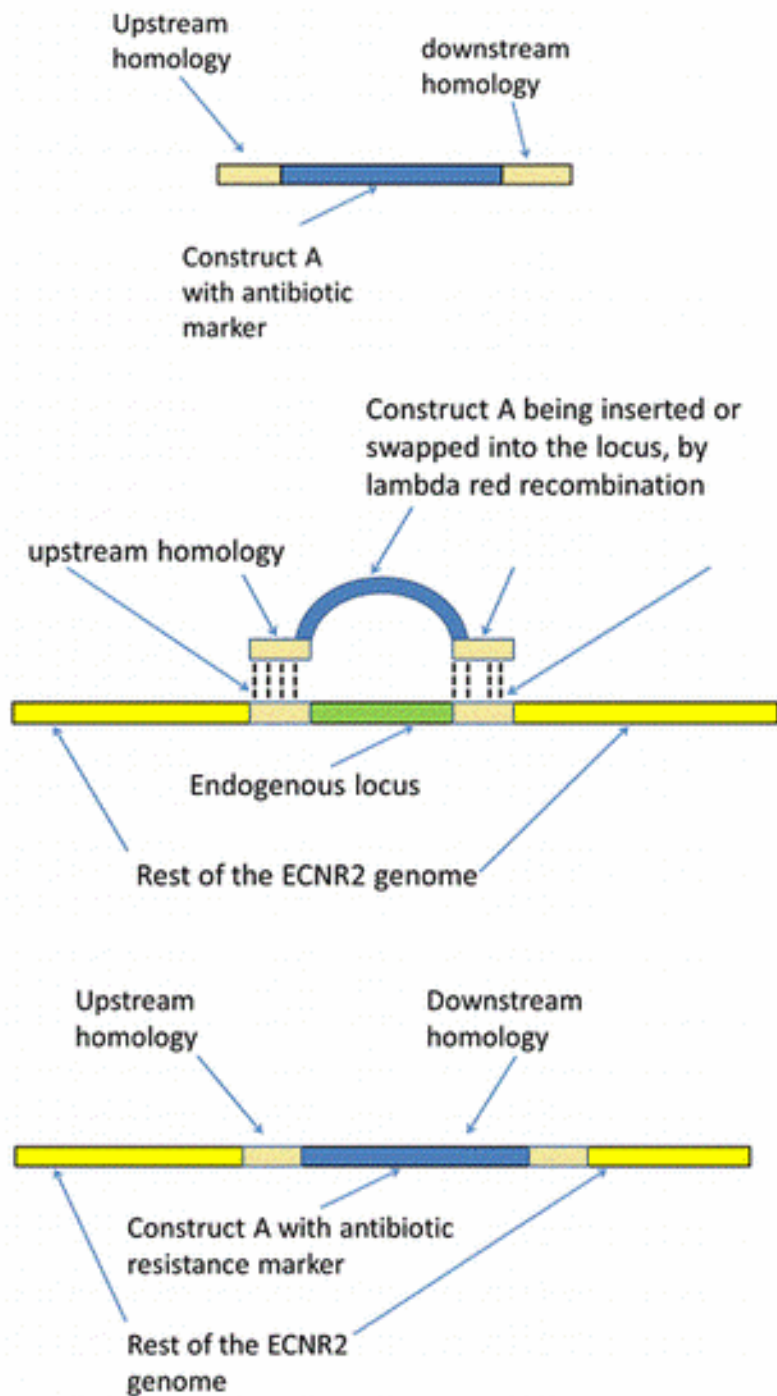


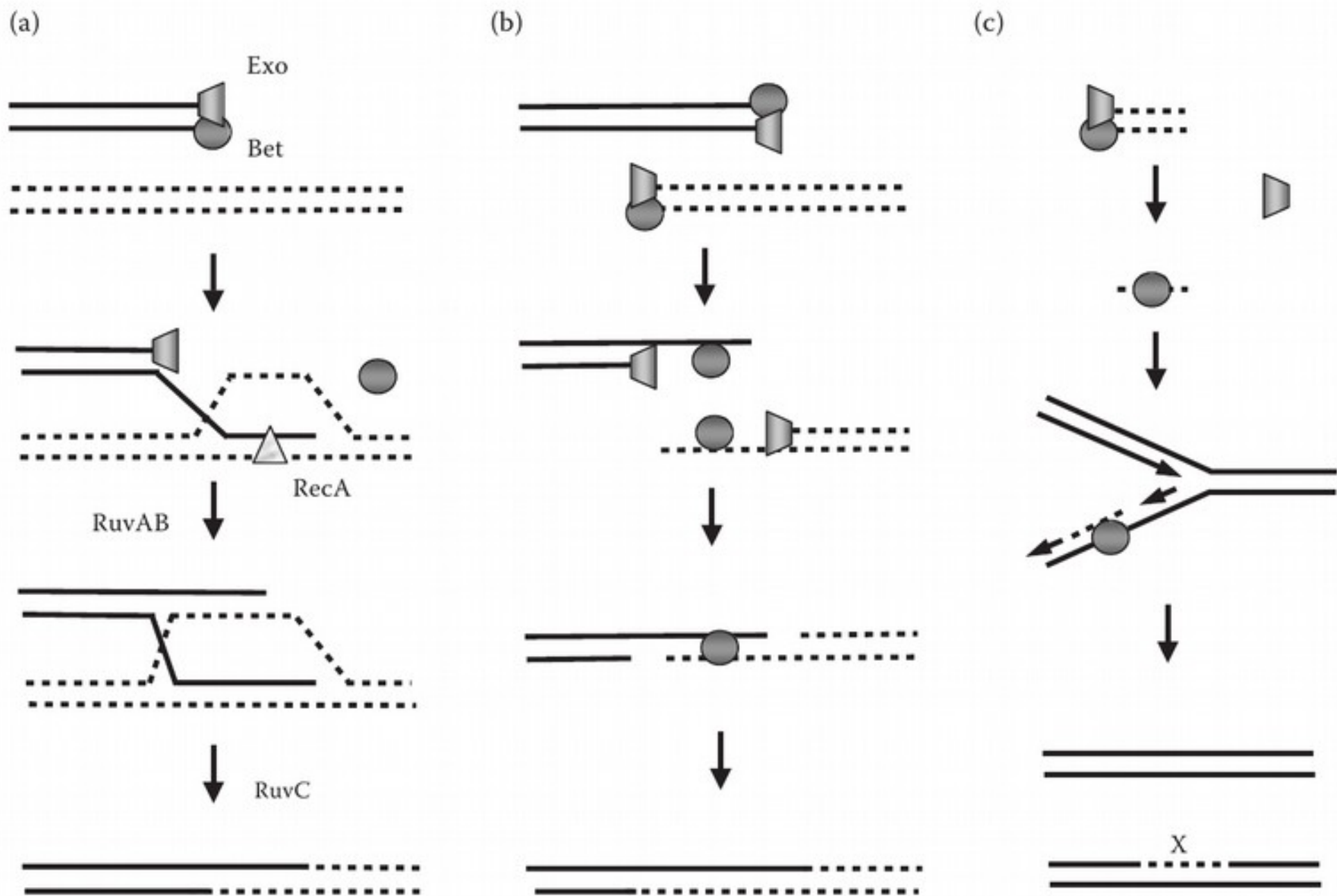
λ - Red Recombining

exo (red α) \rightarrow ekzonükleaz, trimerik formda
Exo 5' \rightarrow 3' ds ekzonükleaz aktivitesi
3' ssDNA kuyruk oluşturur

bet (red β) \rightarrow 12-18merik halkalar oluşturur
Bet ssDNA'ya bağlanır. Komplementer
ssDNA uçlarını yaklaştırır.

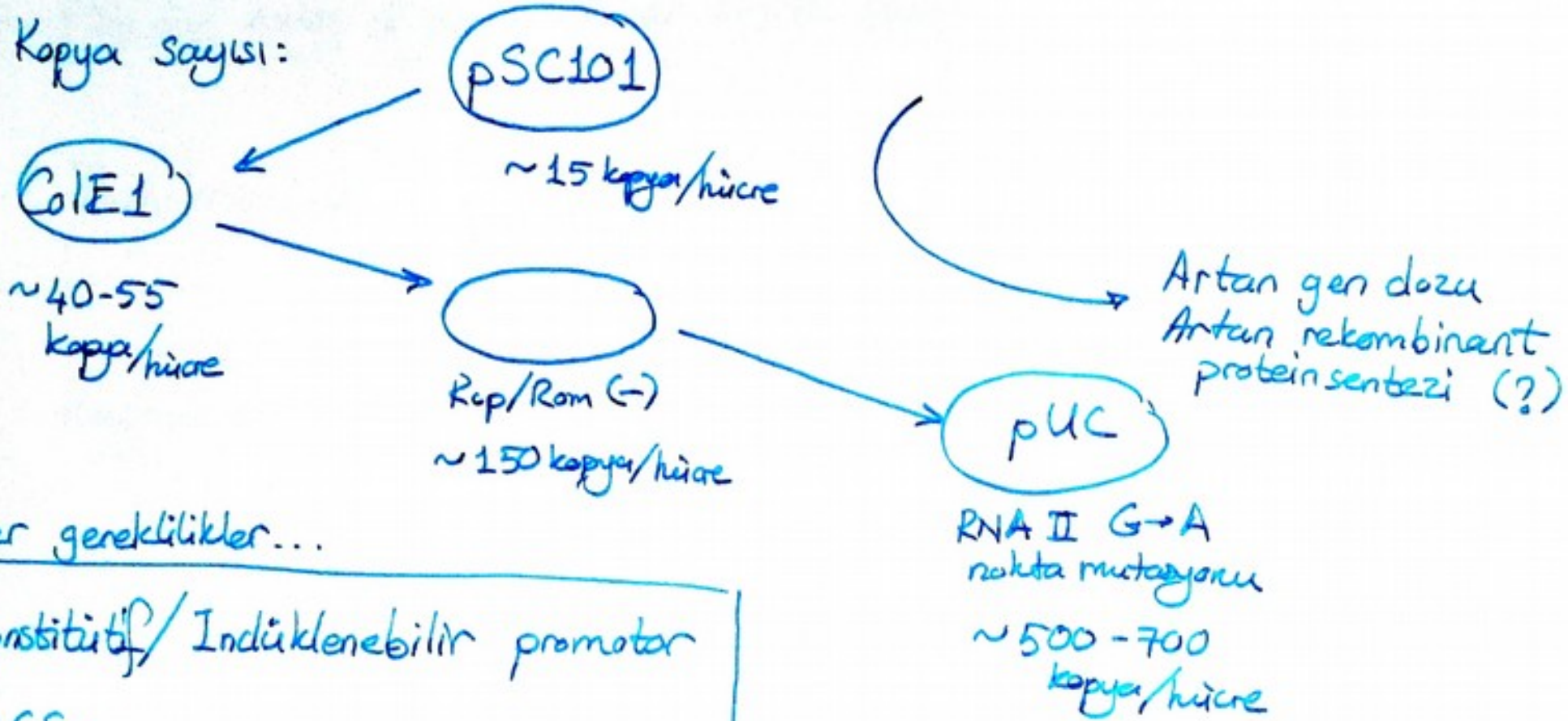
gam (red γ) \rightarrow RecBCD'ye bağlanarak inaktive eder!
Gam





PLAZMİD EKSPRESYON VEKTÖRLERİ

Kopya sayısı:



Diğer gereklilikler...

- * Konstitütif/İndüklenebilir promotor
- * MCS
- * "Selectable Marker"

Yüksek kopya sayılı plazmid ile:

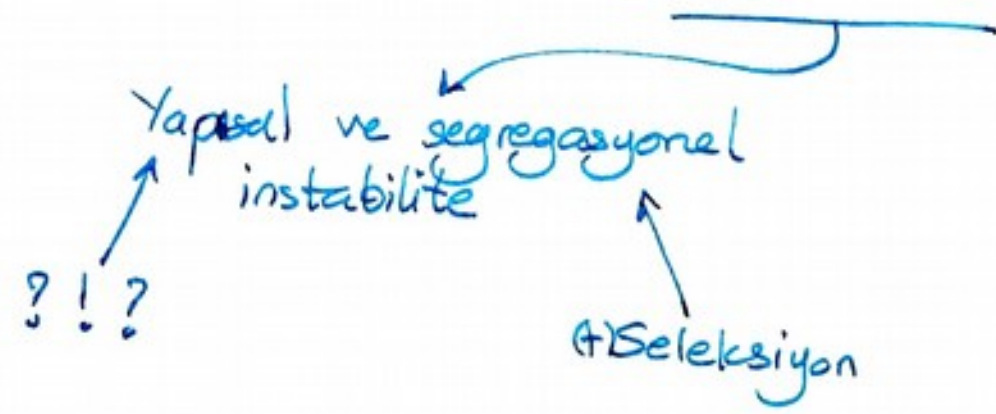
* Plazmid kopya sayısı - Gen kopya sayısı - mRNA sentez hızı

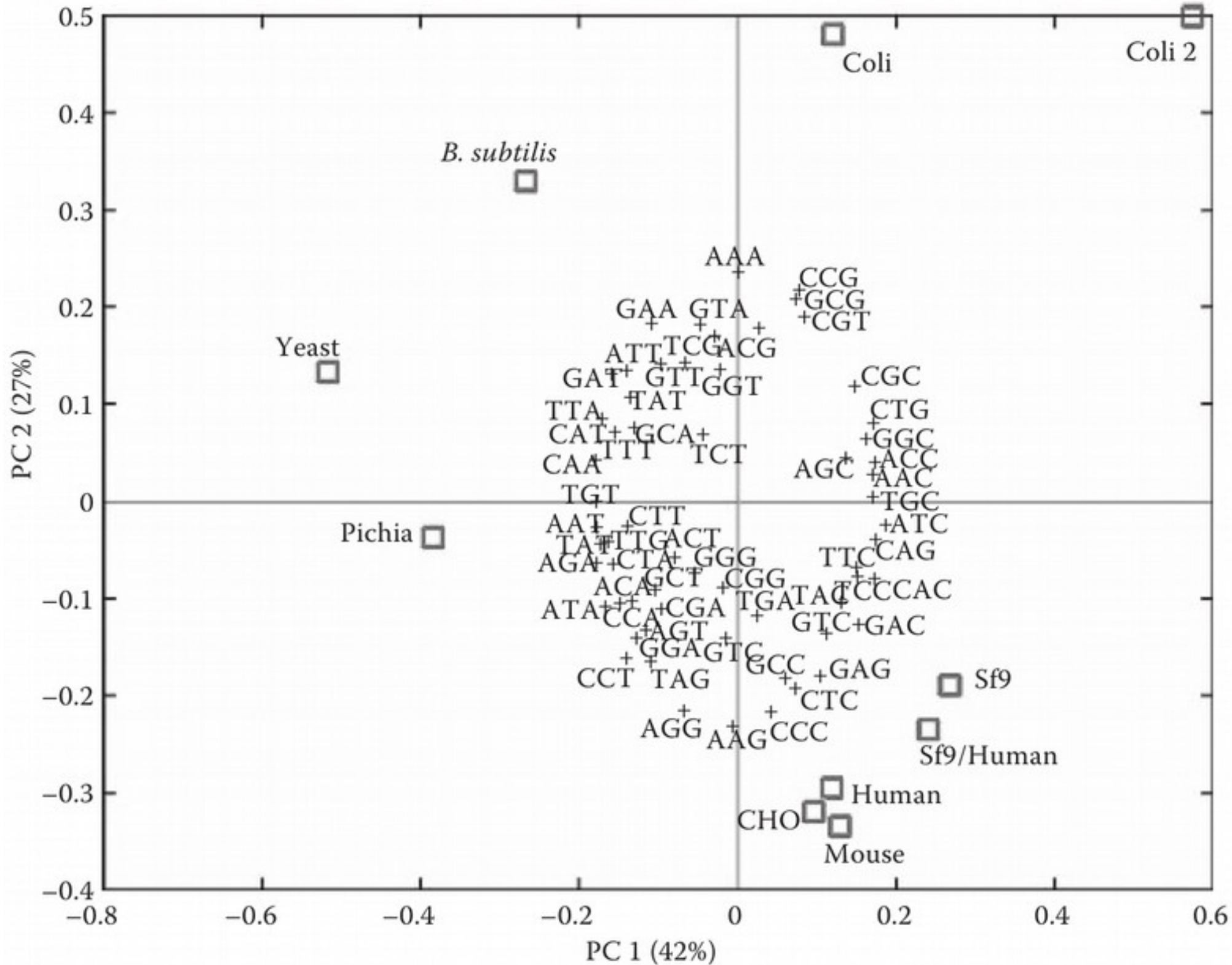
* Transkripsiyon \gg Translasyon
şişe boynu

* Kaynakların plazmid üretimine kullanılması

* Hızlı rekombinant protein ekspresyonu \rightarrow STRESS \rightarrow YANIT

Yüksek kopya sayısı
bir dezavantaja
dönüştürülebilir !!





"Markerless" mutant oluşturmak için

"Counter-Selection"



levansucrase
(*B. subtilis*)

Geçitli hücreyel bileşenleri
* sukroz ~~varlığında~~ varlığında
fruktozile eder

Gr(-) bakteriler
için tabak !

"Markerless" mutant oluşturmak için

Fantastik rekombinazlar

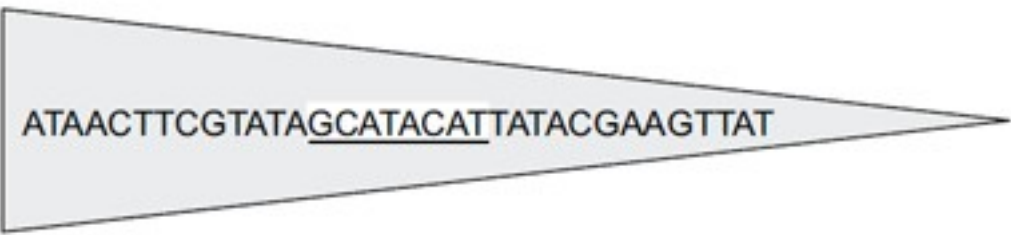
Flp rekombinaz

2 μ plazmid (*Saccharomyces cerevisiae*)

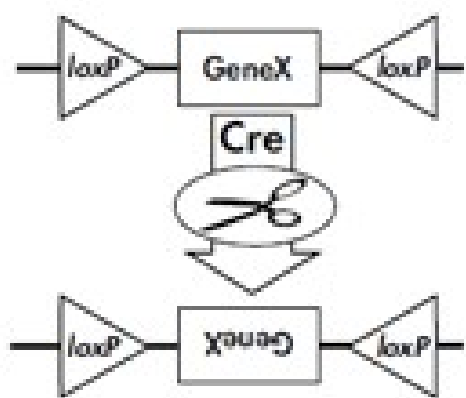
Cre rekombinaz

bakteriyofaj P1 genomu

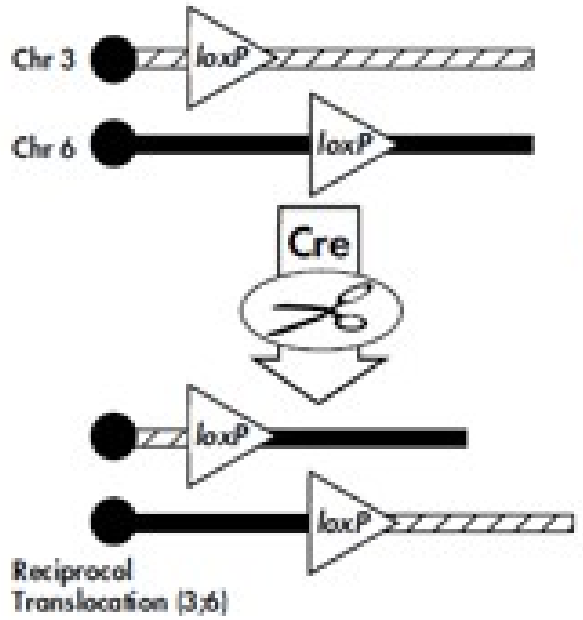
Sihirli insersiyonlar, delesyonlar,
duplikasyonlar, translokasyonlar
yaratın...



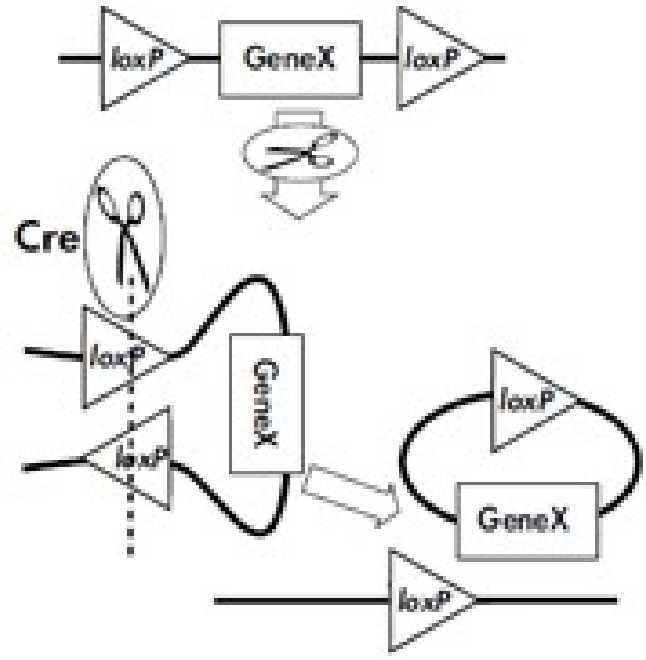
A
Inversion



B
Translocation

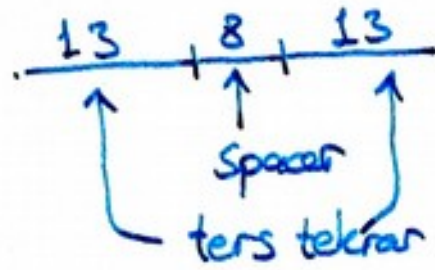


C
Deletion



Flp ve Cre serin rekombinazlardır.

Tanımaları bölgeleri FRT ve loxP motifleri

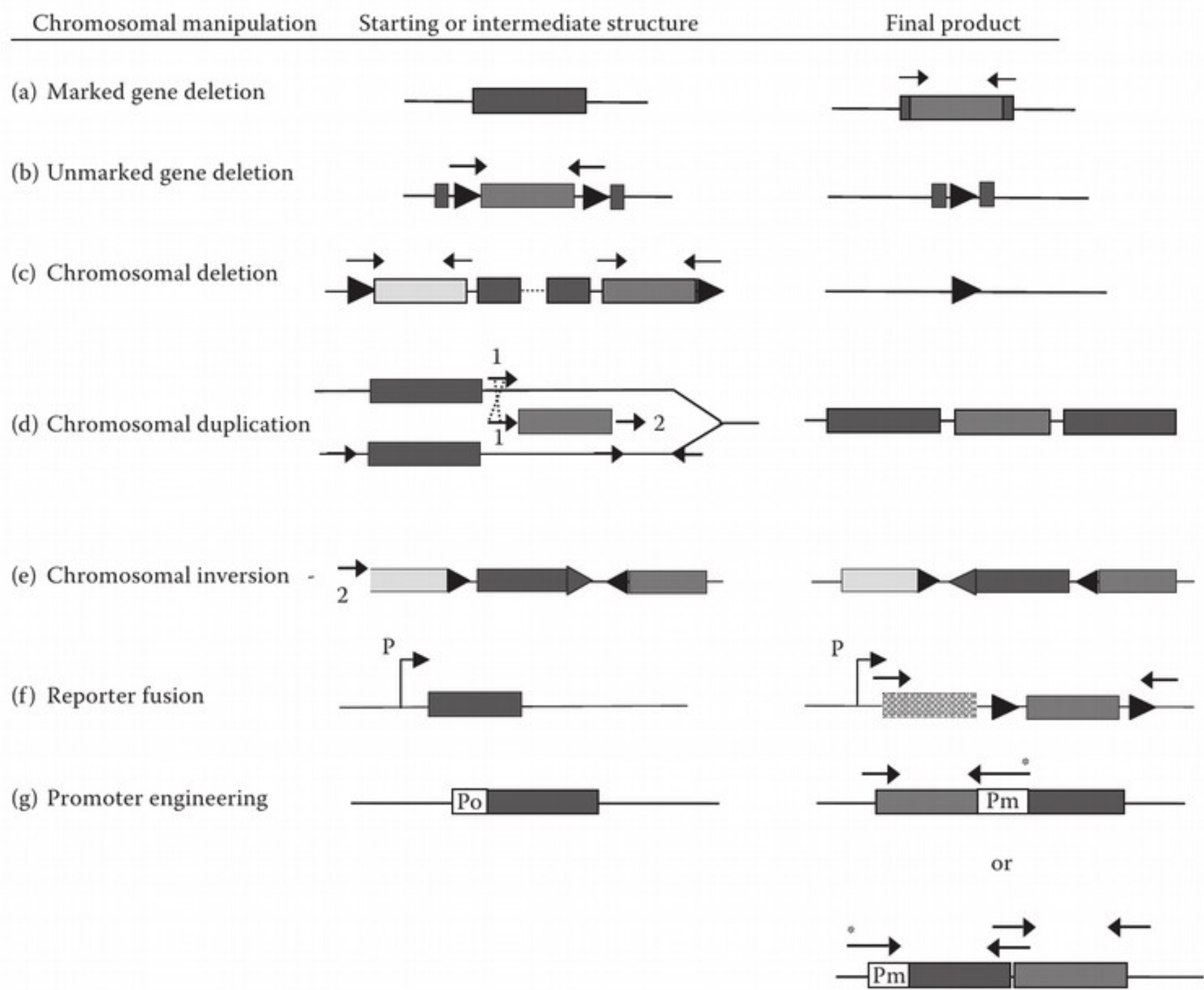


34 bazlık minimal fonksiyonel bölge

Rekombinasyon bileşkesinde neler oluyor?

iplikçik değişimi ve yeniden ligasyon gerçekleşmeden her 4 iplikçik kesilir

FRT ve loxP motiflerinin birbirine oryantasyonu önemli



"Markerless" mutant oluşturmak için

Meganükleaz

I - SceI, bir garip meganükleaz

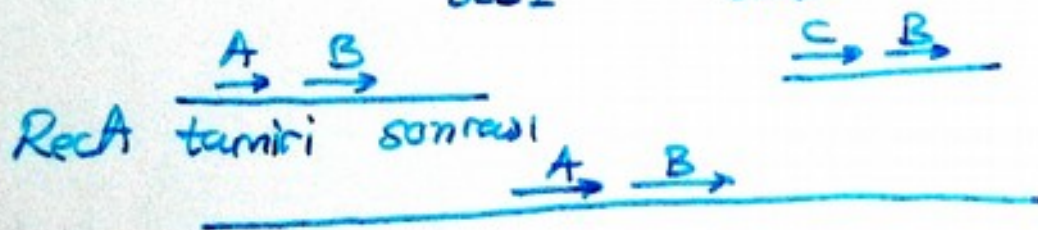
18 bç'lik tanıma motifi *E. coli* genomunda bulunmuyor...

 diye bir operon olsun (kromozomda)

λ -Red recombining ile



in-vivo SceI ekspresyonu



"Markerless" mutant düřtürmek için...

Düldüil olmadan Red Kit olmazdı !

TS mutant ori

sacB vektör üzerinde

Regulator RNA lar

5' ya da 3' UTR de yer alan "cis-acting" elementlar

- translasyonun başlaması (RBS / IRES)
- RNaz aktivitesi
- Ribozom ~~in~~
- Antisens
- RNAi

Sensör Eleman: RNA

Termosensör: 2° yapı sıcaklığa bağlı

Nükleik asitlere bağlanan RNAlar

Moleküler ligandlara bağlanan RNAlar - Aptamerler

"Riboswitch" : Sensör-Aktuatör
"cis-acting" RNA elemanları

Doğal "Riboswitch"ler

Tiyamin pirafosfat
Adenosylcobalamın
Flavin mononucleotide
S-adenosyl methionine
Lysine
Glycine
Guanine & Adenine
Glucosamine-6-fosfat

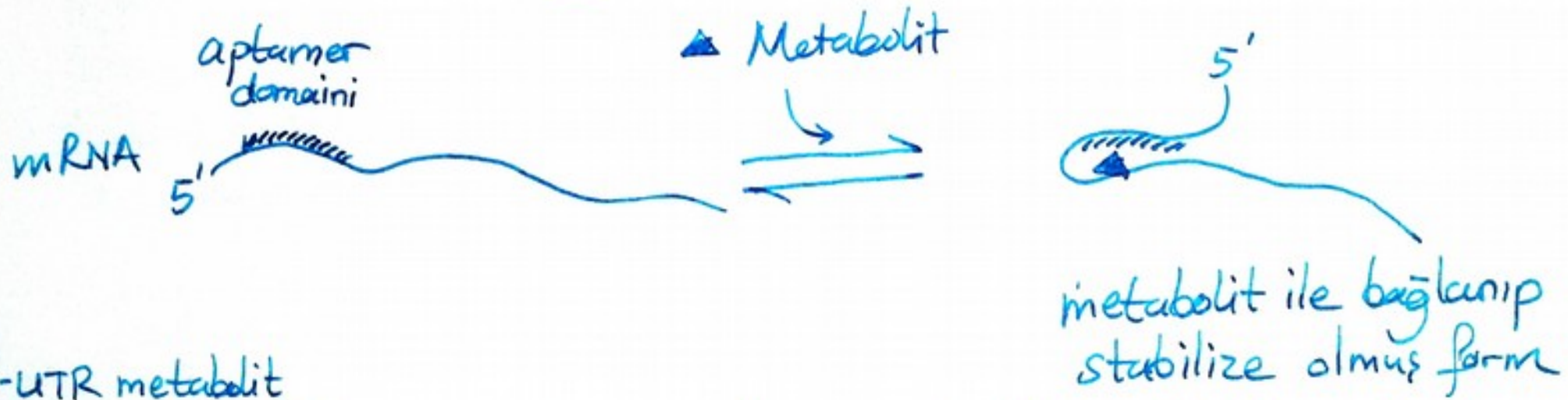
Sentetik "Riboswitch"ler

Transkripte aptamer eklenmesi
Regulator elemana aptamer eklenmesi

"Riboswitch"

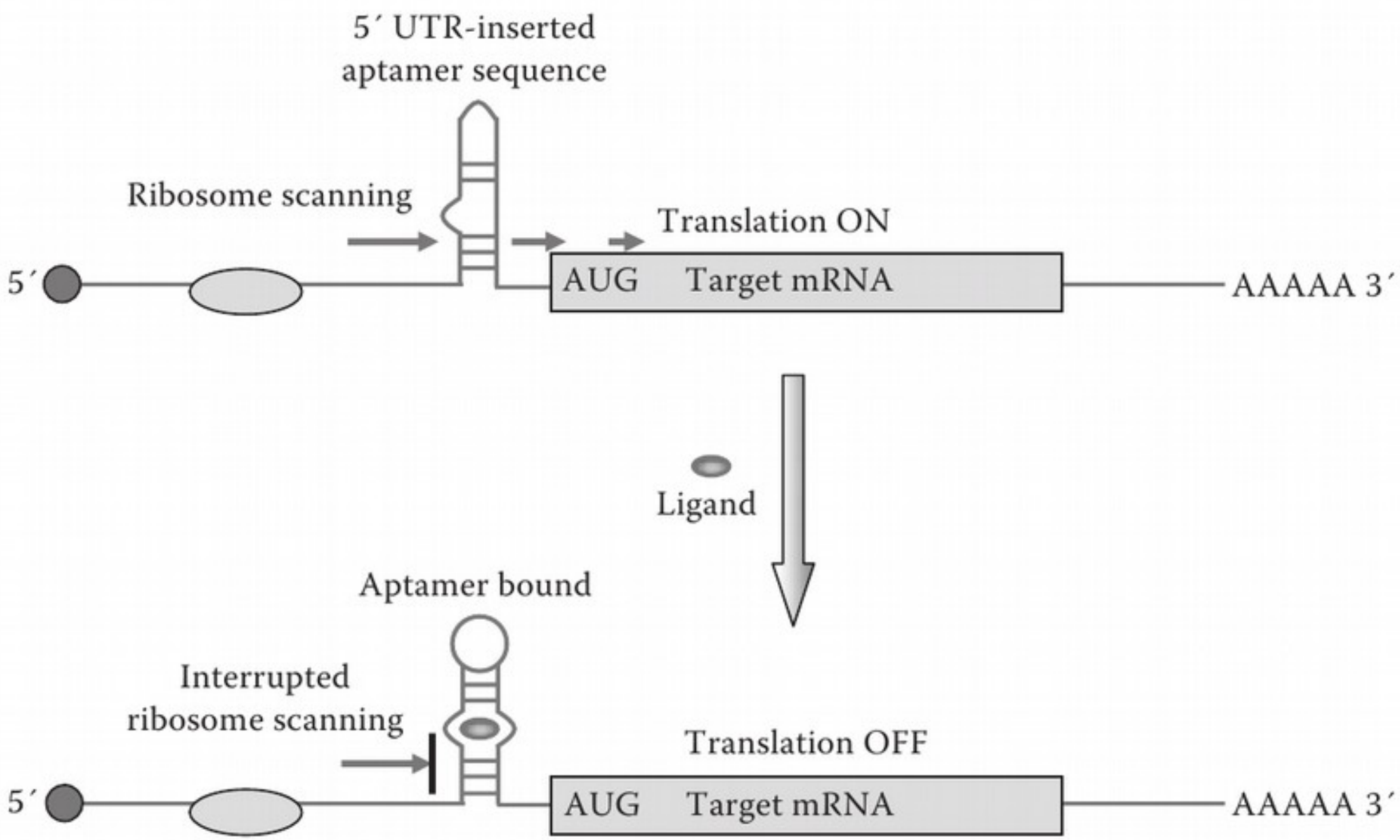
cis-acting

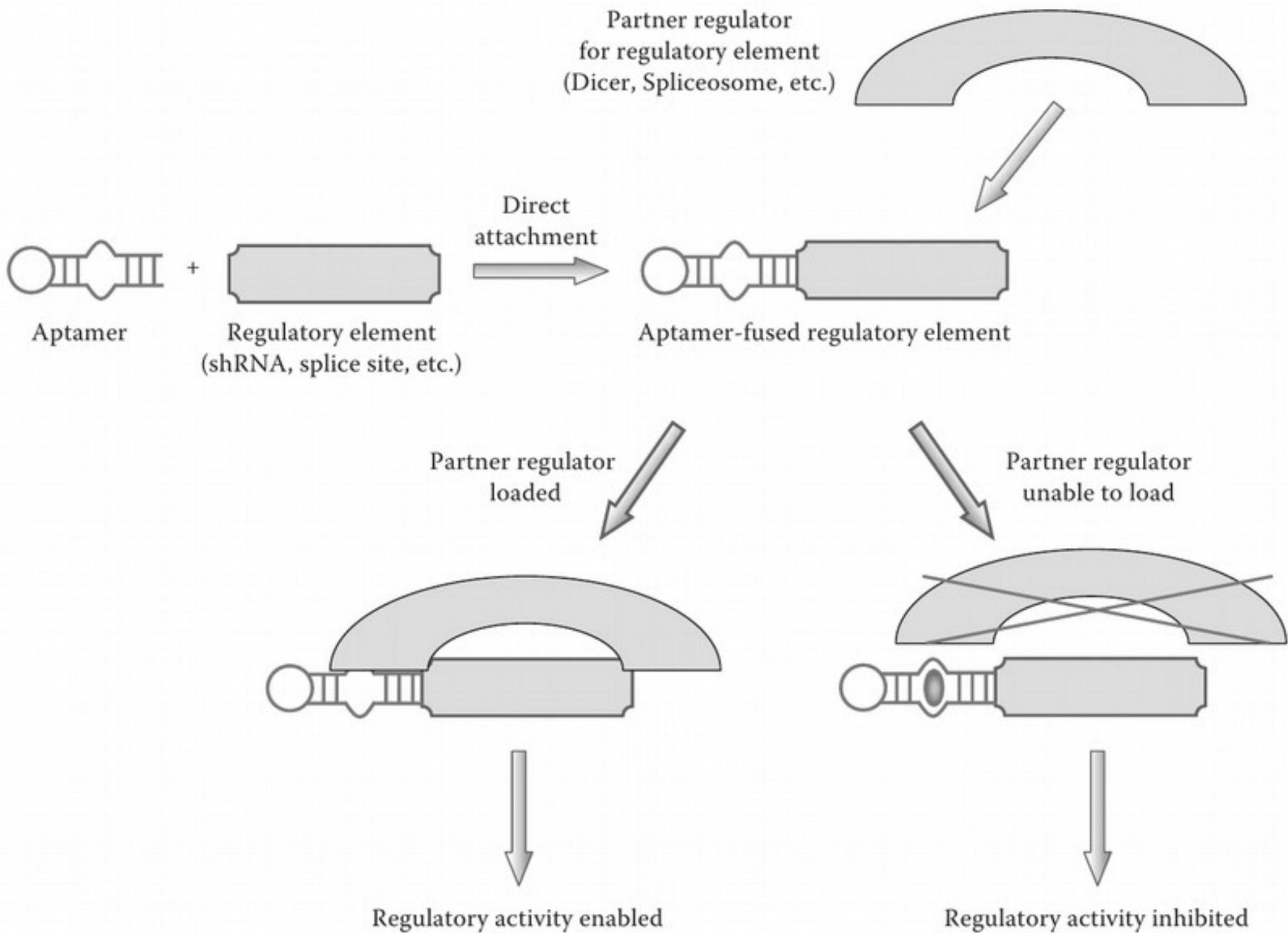
5'-UTR'de yerleşmiş sensör-aktuatör sistemleri
metabolitlere yanıt verirler



3'-UTR metabolit bağlayan sistemler
RNA stabilitesi

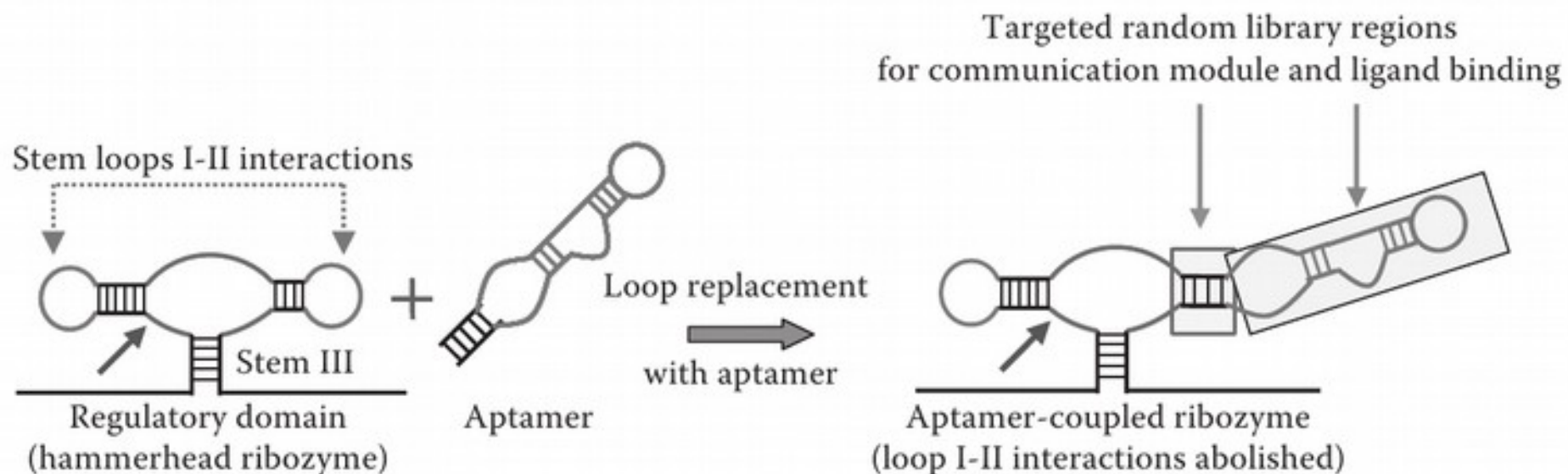
Transkripsiyon elongasyon kompleksinin stabilitesinin bozulması
2° yapılar, ribozoma bağlanmayı önleme
"Self-cleaving" RNA transcript





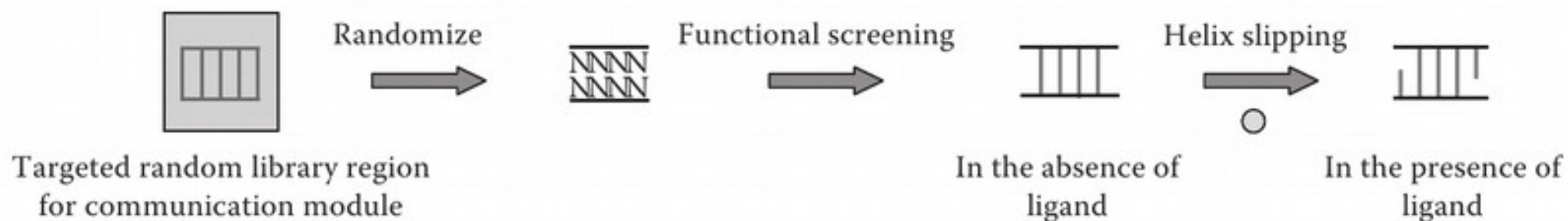
A

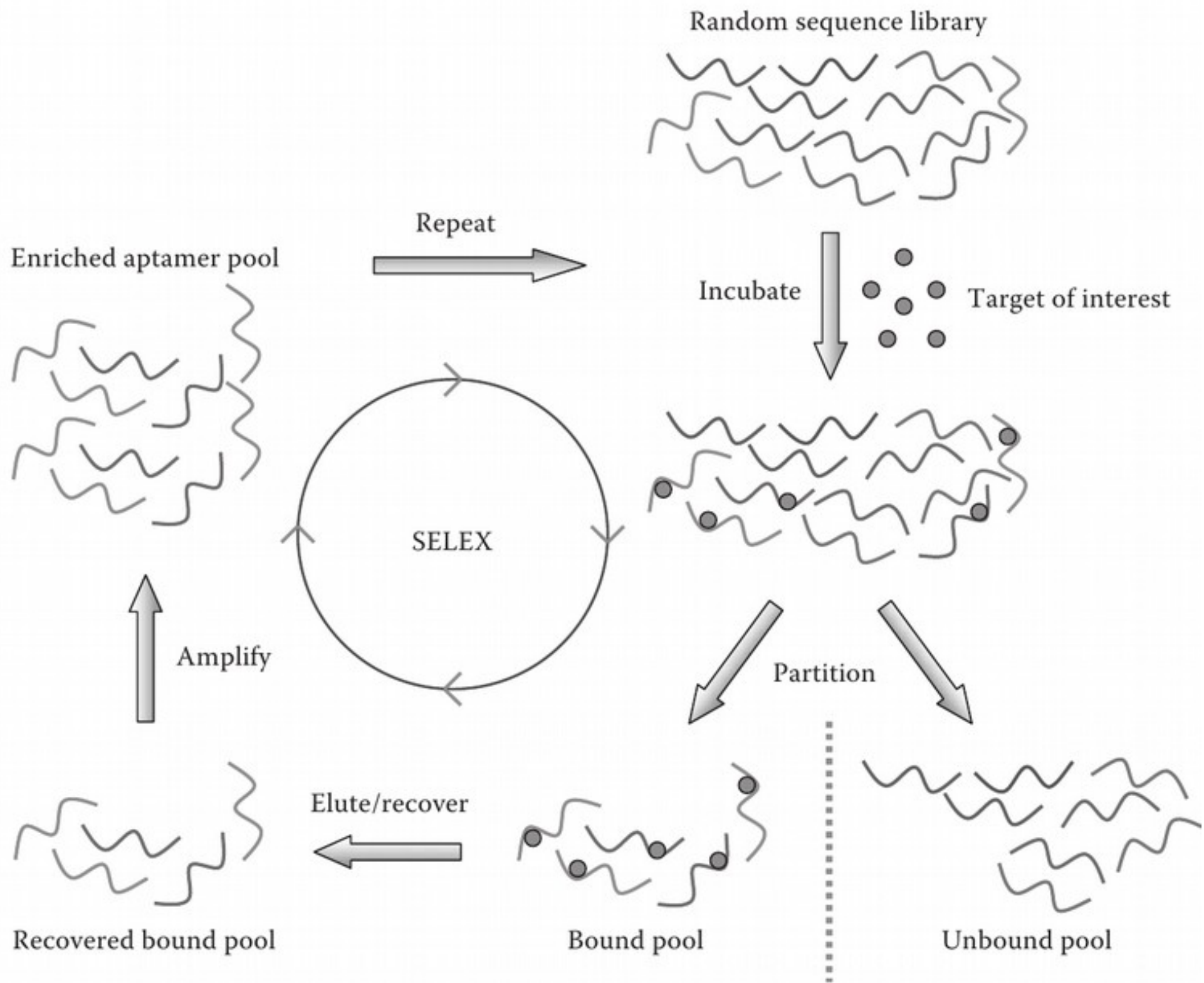
Coupling regulatory and aptamer domains

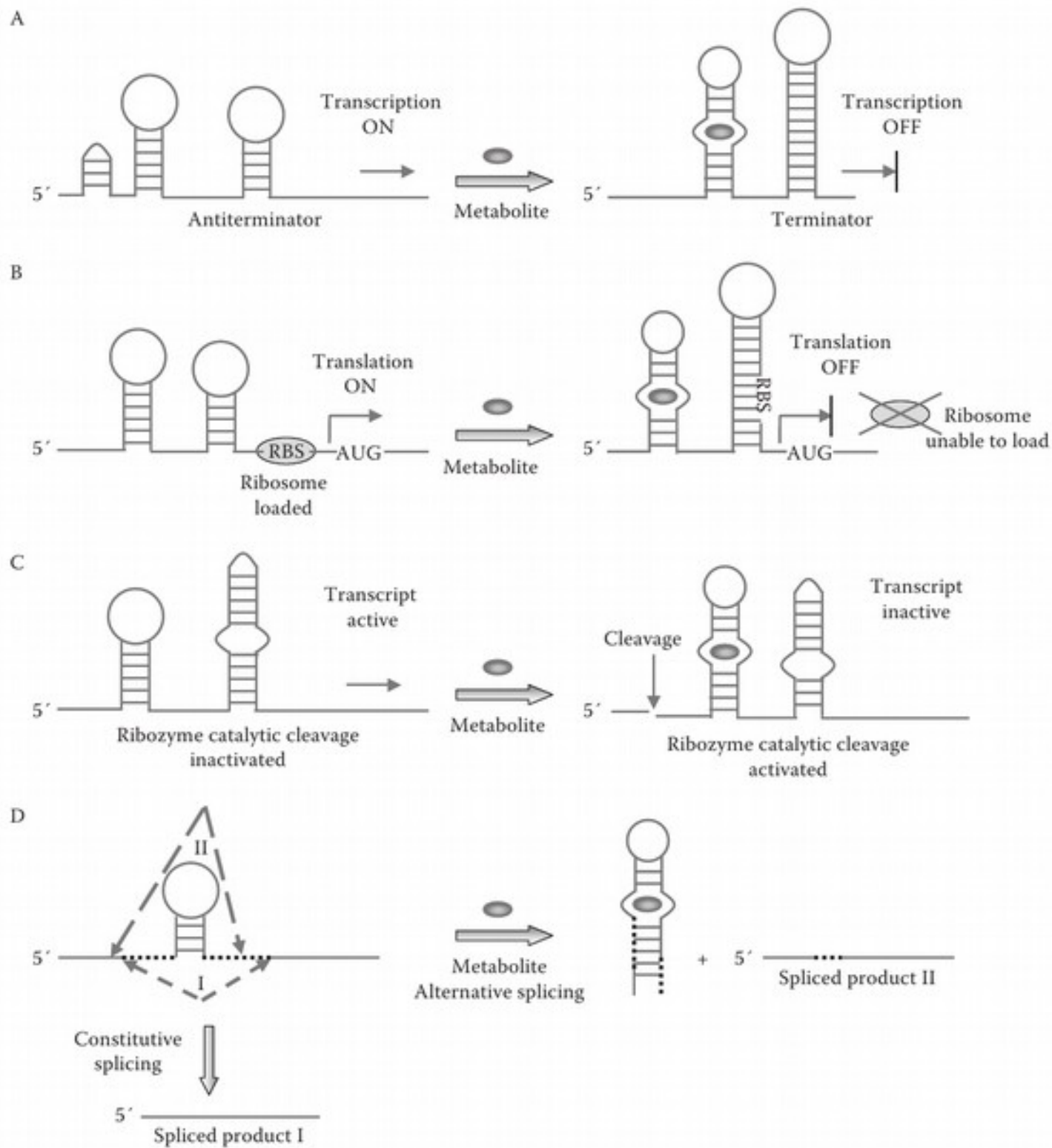


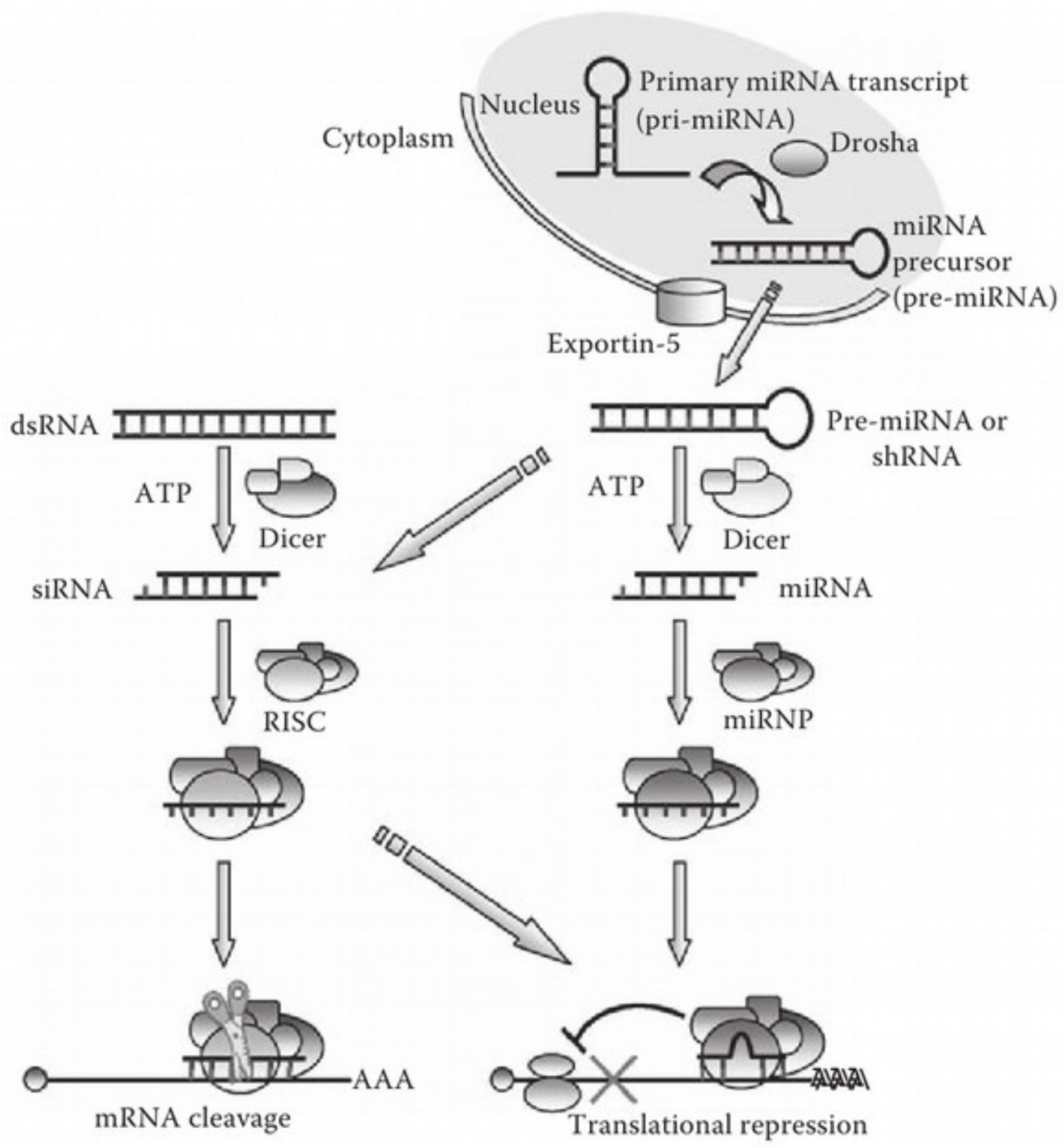
B

Functional screening of communication modules









Sentetik Genler - Sentetik Biyoloji

GC içeriği

Kodon optimizasyonu

mRNA sekans motifleri (Shine Dalgarno . . .)

mRNA 2° yapısı