

Genetika prokaryot

RNDr. Irena Lichá, CSc.

Katedra genetiky a mikrobiologie, č.m. 110A

Viničná 5, Praha 2, 128 44

tel.: 2 2195 1714

e-mail: licha@natur.cuni.cz

<http://www.natur.cuni.cz/molbio/licha>

literatura:

- ❑ Molecular Genetics of Bacteria, Snyder and Champness, 2nd ed. 2003, (ASM Press), úvod a část II kapitoly 3-9. část III kapitoly 10 a 11.
- ❑ Microbiology, Prescott, Harley, Klein 4. Vydání 1999 (McGraw Hill)
- ❑ Archaea molecular and cellular biology, Cavicchioli, 2007, ASM Press, kapitoly 2, 20,21

web:

- ❑ <http://www.els.net> (jen z fakultních PC)
- ❑ <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/>

Schéma přednášek

- Úvod – organizace chromozomu - opakování
- Popis a struktura mobilních elementů bakterií i archae
 - Transpoziční elementy
 - Plazmidy
 - Konjugace
 - Bakteriofágy
 - Transdukce
 - Transformace
- Rekombinace
- Bodové mutace a opravné mechanismy
- Základy genetické analýzy
- Nespecifická mutageneze
- Specifická mutageneze
- Základy genomických přístupů

genetika

věda, která vytváří, identifikuje a popisuje mutanty za účelem studia buněčných funkcí

- **hlavní cíle** – porozumět organizaci a funkci genů
- **způsoby dosažení** – vytváření alterací v DNA a jejich efekt na vlastnosti organismu (fenotyp)
 - **klasická genetika:**
analýza „zajímavých mutant“ s detekovatelným mutantním fenotypem
 - **genové inženýrství („inverzní genetika“):**
charakterizace a změna genotypu
 - **genomické přístupy:**
globální přístupy ke studiu organizace a funkce genů
 - Sekvenování a analýza sekvencí
 - Microarrays – studium obsahu genomu
 - Nespecifická mutageneze transpozony –mapování genomů

Genetika prokaryot

Kurz genetiky prokaryot by Vás měl seznámit se základními problémy klasické genetiky.

Důvody proč, byste se měli s nimi měli seznámat jsou hned dva.

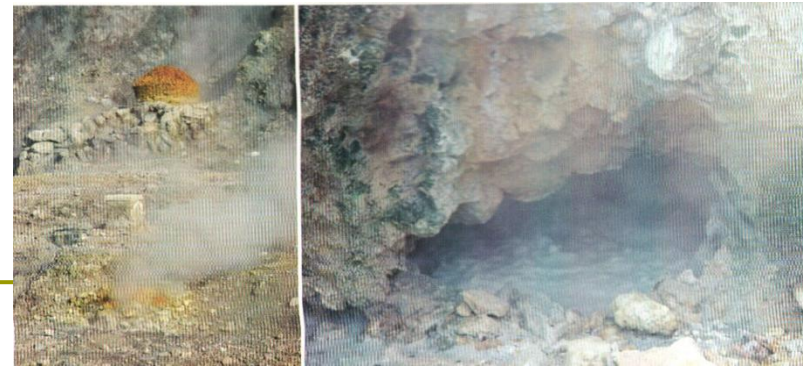
- **První** – získat povědomí o tom jak Vám metody bakteriální genetiky mohou pomoci řešit biologické problémy na molekulární úrovni. - Genetické přístupy – levnější a méně namáhavé
- **Druhý** - umožnit Vám správně interpretovat výsledky druhých jejichž práce budete studovat.

Vlastnosti bakterií

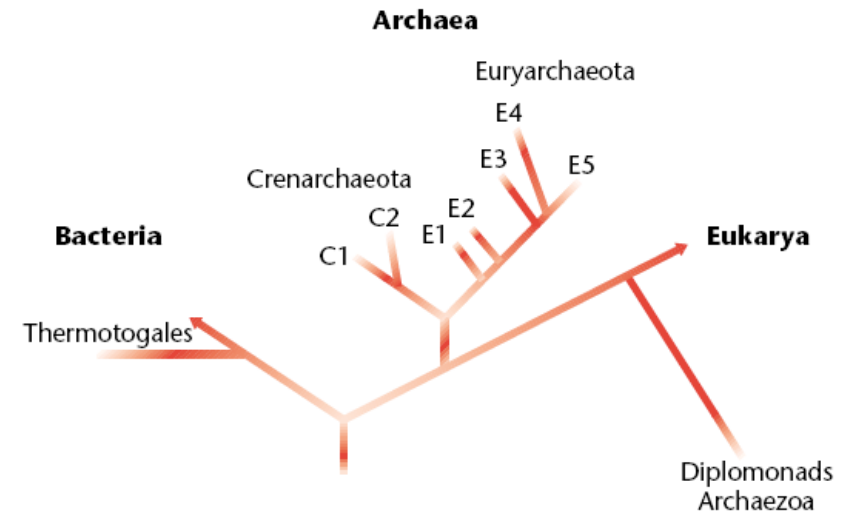
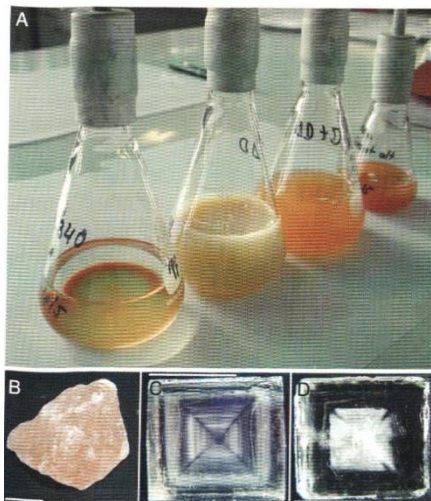
kteřé jsou výhodné pro genetická studia

- **Mají krátký generační čas**
umožňuje provedení mnoha experimentů v krátkém čase
- **Bakterie jsou haploidní**
mají pouze jednu kopii či alelu každého genu (výjimky tRNA, rDNA)
snadná identifikace buňky se sledovanou mutací
- **Asexuální reprodukci – semikonzervativní replikace**
při dělení jsou buňky ve všech generacích geneticky identické – klony
- **Růst v koloniích na agarových plotnách**
každá kolonie se skládá z miliónu buněk odvozených od jednoho jedince
 - Čištění kolonií
 - Ředění kultury umožňuje počítání kolonií a statistická vyhodnocení
- **Selekce**
snadná izolace žádané mutanty za daných podmínek

Genetika Archaea



- Rozdíly přístupů u Archaea –
 - více příbuzný mechanismům eukaryot.
 - replikace, transkripce, translace, struktura genů,
 - obtížná kultivovatelnost
 - nedají se aplikovat zásady klasické genetiky
 - metody se vyvíjejí –
 - Klasické genetické
 - genomické, metagenomické přístupy



Genetické přístupy umožňují studovat systém *in vivo*:

- **Organizace genů:** vytváření a charakterizace mutant
 - způsoby vytváření
 - nspecifická mutageneze – klasická genetika
 - specifická mutageneze – kombinace metod genového inženýrství a klasické genetiky
 - umožňuje studovat
 - počet genů zapojených do určitého procesu,
 - jejich relativní uspořádání a transkripční organizaci.

Genetické přístupy umožňuje studovat systém *in vivo*:

□ Funkční studie:

- biochemická studie mutanta,
 - geneticky charakterizovaný
 - definován jako defektní v jednom genu
- umožňuje studovat:
 - indikaci role produktu změněného genu v metabolismu *in vivo*
 - korelace genu a jeho proteinového produktu potvrzuje jeho biochemickou aktivitu *in vivo*
 - potvrzení genomických studií
 - studium metabolických drah; analýza metabolitu akumulovaného u mutanta umožňuje a koreluje mutaci s biochemickým dějem.

Genetické přístupy umožňuje studovat systém *in vivo*:

□ **Strukturní studie:**

- biochemické charakterizace řady mutant s mutací v jednom genu,
 - mohou objasnit závislosti struktury a funkce proteinu
 - výhoda pokud je stanovena struktura rentgenovou (X-ray) krystalografií a je známa 3-D struktura.

□ **Biotechnologie:**

- Vytváření mutant s žádoucími vlastnostmi
 - zvýšená produkce žádaného metabolitu,
 - produkce modifikovaného metabolitu,
 - vytváření zcela nové látky organismu nevlastní.

Základní parametry prokaryotního chromosomu

□ všechny esenciální informace na jednom kruhovém chromosomu

■ Bakterie – výjimky

- *Leptospira* má dva chromosomy o velikosti 4,4 a 4,8 Mbp),
- *Streptomyces* a *Borrelia* – mají lineární chromosom

■ Archae – pouze kruhový chromosom,

□ Velikost – menší než eukarya – velké rozdíly

- Bakterie - 0.58 Mbp (*Mycoplasma genitalium*) až 9,2 Mbp (*Myxococcus xanthus*)
- Archaea – 0,5 Mbp (*Nanoarchaeum equitans*) až 5,8 Mbp (*Methanosarcina acetivorans*)
- Nejmenší nemají některé biosyntetické dráhy.
- Syntéza lipidů, aminokyselin, nukleotidů,
- Nutná symbióza
 - Symbióza s jinými mikroorganismy nebo obligátní intracelulární patogeny

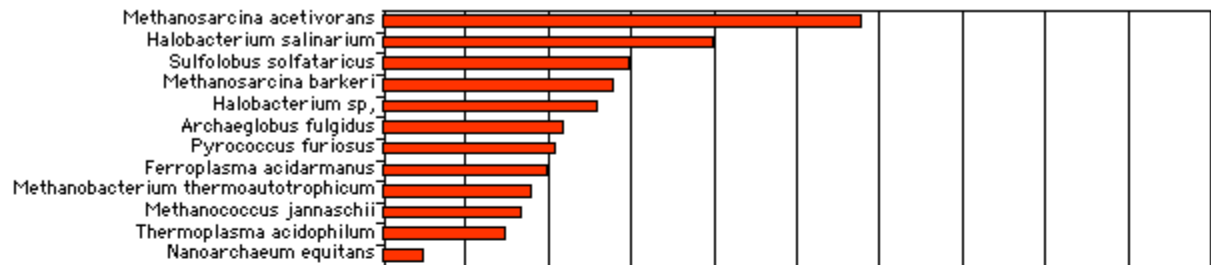
□ Mimochromozomální DNA

- Plazmidy – bakterie i archaea
- Viry - bakterie i archaea

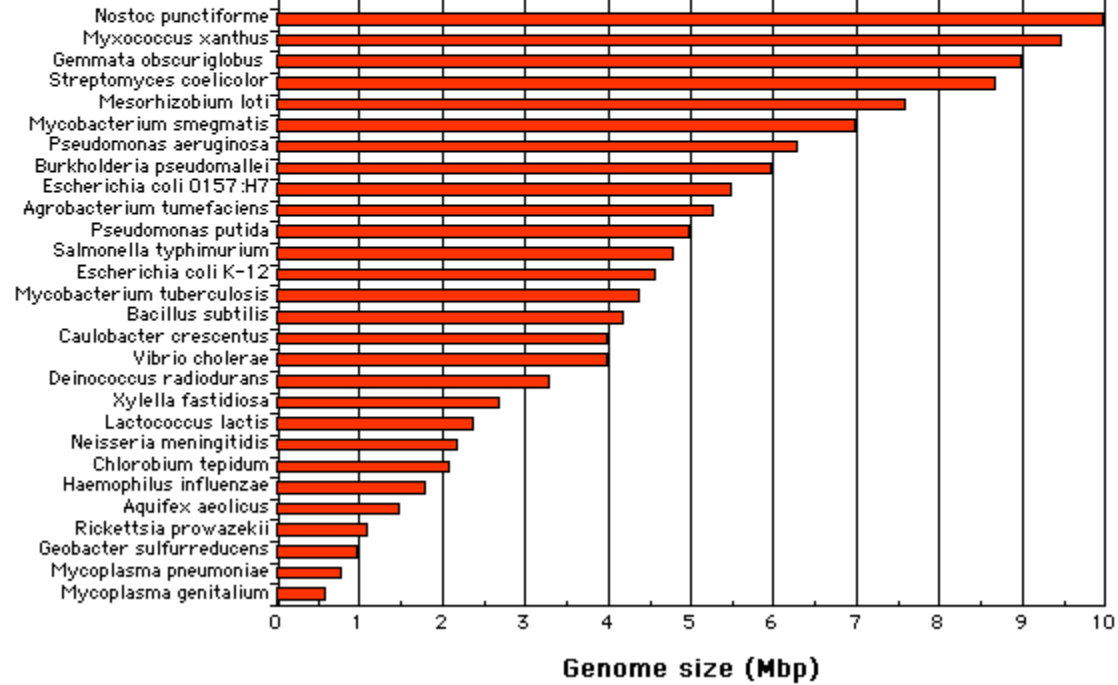
□ Literatura:

- Bakterie - Bacterial Genomes. Ronald M Atlas, Daniel Drell,
- Archaea - Archaeal Chromosome. Magnus Lundgren. Archaeal Genomes. Ronald M Atlas
ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES, 2008, John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

Archaea:



Bacteria:



Tabulka velikostí chromosomů vybraných mikroorganismů

<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> HK1651	2.2	University of Oklahoma		Human pathogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	5.3	University of Washington/Dupont		Plant pathogen causing crown gall, high gene
<i>Bacillus subtilis</i> 168	4.20	International Consortium	Kunst <i>et al.</i> , 1997	Very widely studied Gram-positive bacterium
<i>Bartonella henselae</i> Houston 1	2.00	University of Uppsala		Human pathogen
<i>Bordetella bronchiseptica</i> RB50	4.9	Sanger Centre		Human pathogen
<i>Bordetella parapertussis</i>	3.9	Sanger Centre		Human pathogen
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1.23	Genset		Human pathogen, intracellular parasite
<i>Chlamydia pneumoniae</i> AR39	1.23	TIGR	Read <i>et al.</i> , 2000	Human pathogen, intracellular parasite
<i>Escherichia coli</i> K-12	4.60	University of Wisconsin	Blattner <i>et al.</i> , 1997	Very widely studied Gram-negative bacterium
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	5.6	Japanese Consortium/University of Wisconsin	Nicole <i>et al.</i> , 2001	Human pathogen
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	3.00	TIGR		Gram-positive bacterium
<i>Francisella tularensis</i> schu 4	2.00	European & North American consortium		Human pathogen, potential bioterror agent
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 700396	1.9	Environmental Biotechnology Institute Dairy Management.		Milk digestion inoculum
<i>Mycobacterium leprae</i>	2.80	Sanger Centre		Human pathogen, causes leprosy
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> K-10	5.00	University of Minnesota		Human pathogen
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CSU#93 (clinical isolate)	4.40	TIGR		Human pathogen, causes tuberculosis
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (lab strain)	4.40	Sanger Centre	Cole <i>et al.</i> , 1998	Human pathogen, causes tuberculosis
<i>Mycoplasma genitalium</i> G-37	0.58	TIGR	Fraser <i>et al.</i> , 1995; Hutchison <i>et al.</i> , 1999	Human pathogen; serves as model for minimal set of genes sufficient for free living
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 232	0.89	University of Washington		Human pathogen
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC PG1	1.28	The Royal Institute of Technology, Stockholm & The National Veterinary Institute, Uppsala		Human pathogen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	5.90	University of Washington PathoGenesis		Gram-negative bacterium with diverse metabolism, human pathogen
<i>Pseudomonas putida</i>	6.1	TIGR/German Consortium		High potential for bioremediation by natural and synthetic
<i>Salmonella paratyphi</i> A ATCC 9150	4.60	Washington University Consortium		Human pathogen
<i>Staphylococcus aureus</i> COL	2.80	TIGR		Human pathogen
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	8.0	Sanger Centre/ John Innes Centre		Antibiotic production

Základní parametry prokaryotního chromosomu

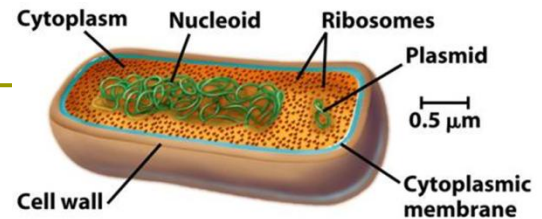


Figure 2.1a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

□ organizace uvnitř buňky –

- Bakterie - pevné seskupení do nukleoidu („supercoiled“ struktury, vazby na proteiny, vazba na membránu)
- Archaea – chromatin – histony a alba proteiny – homology z eukaryoty – stabilizace DNA u termofilních

□ Organizace genů –

- Bakterie - klastry a operony, 75 – 95 % genomu kódující sekvence, geny v jedné kopii, (mimo rRNA a tRNA)
- Archaea – podobné- u některých –“self-splicing“ introny II skupiny

□ zastoupení GC párů

- Bakterie - charakteristické pro jednotlivé druhy: 24% *Mycoplasma*, *Clostridium* , 76% *Micrococcus*
- Archaea – 35 % *Sulfolobus*, 60% *Pyrodictum* – nepřispívá k termostabilizaci

□ dsDNA, obsahující standartní base

- výjimky: 5-methyl a 4-methyl cytosin, N6-methyl adenin) - (ochrana DNA proti specifickým nukleázám, kontrolní signál některých funkcí)

□ Schéma buňky.

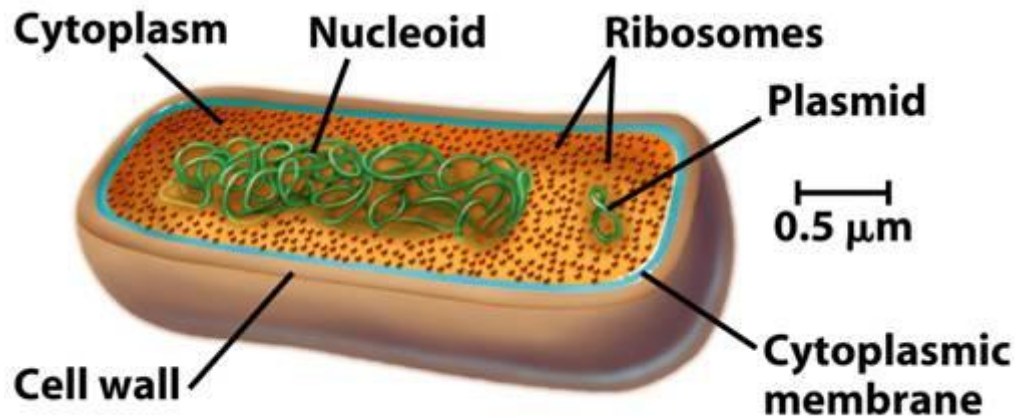


Figure 2-1a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

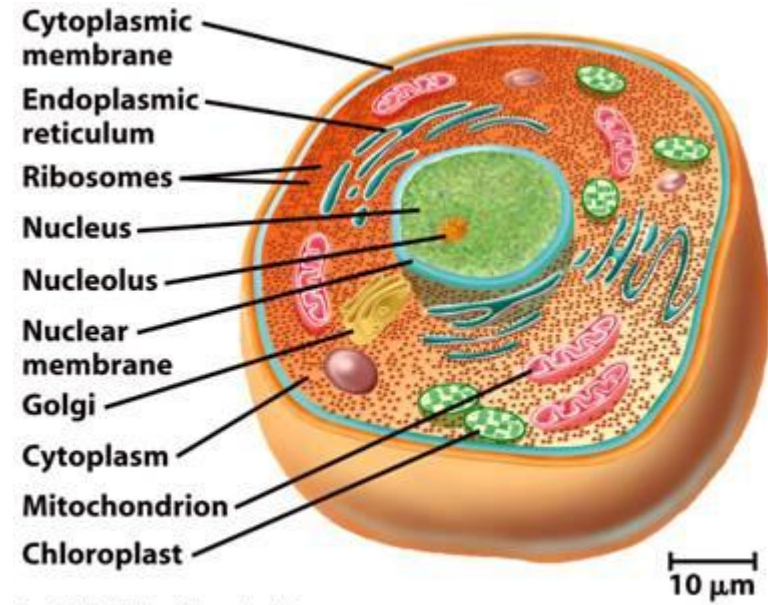
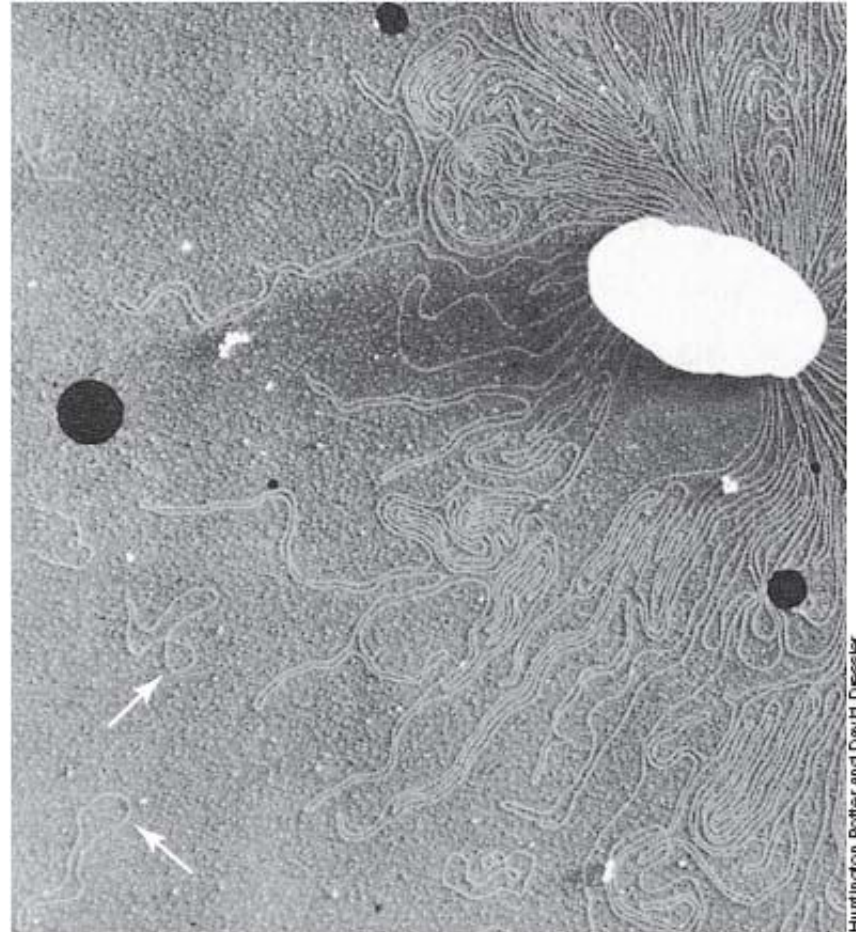


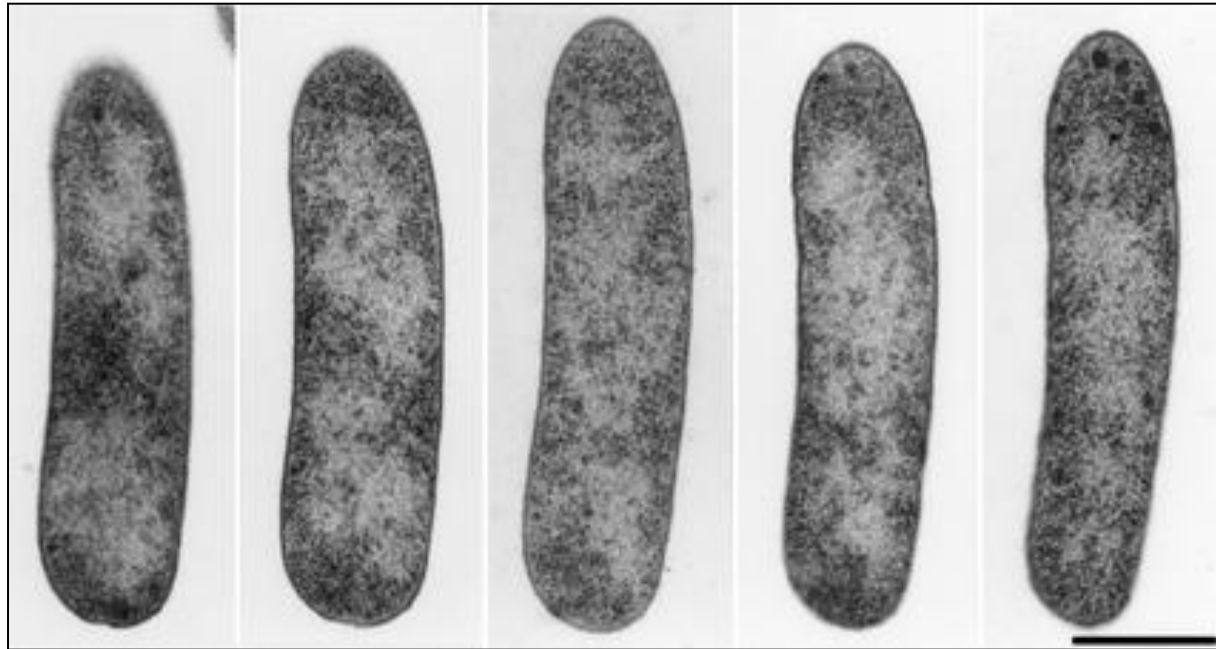
Figure 2-1b Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Elektronový snímek chromosomu

- Chromosomální a plazmidová DNA
 - šipka označuje plazmid
 - buňky rozbity šetrnou metodou – chDNA intaktní



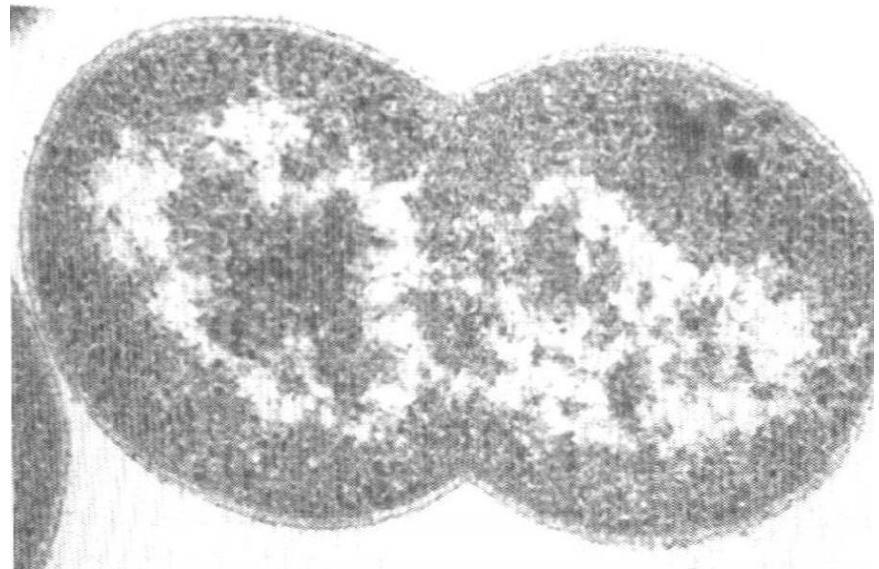
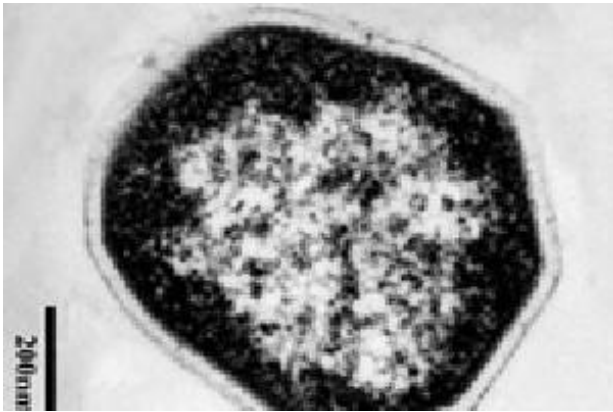
Elektronový snímek nukleoidu bakterií



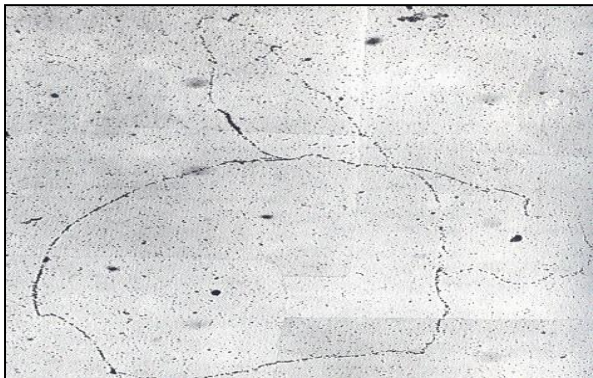
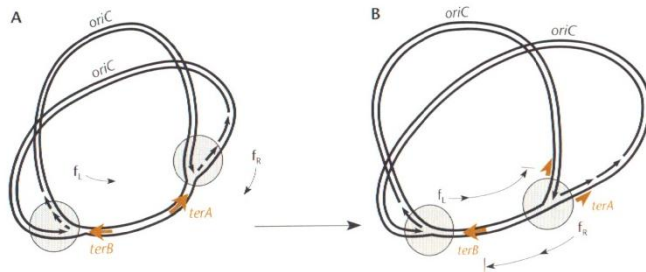
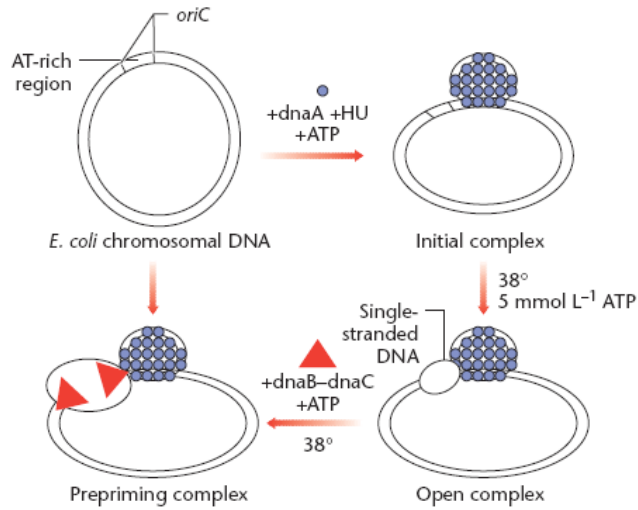
Série podélných řezů buněk *E. coli*, připravených kryofixací (CFS).

Elektronový snímek nukleoidu archaea

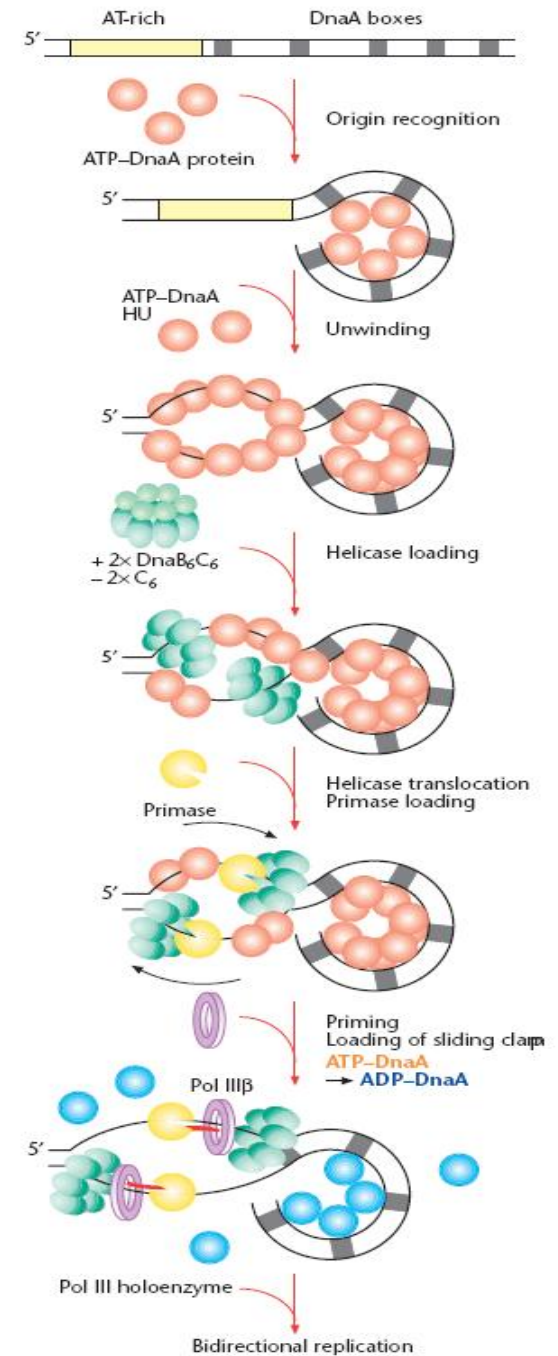
Elektron mikroskopický snímek *Thermococcus celer*



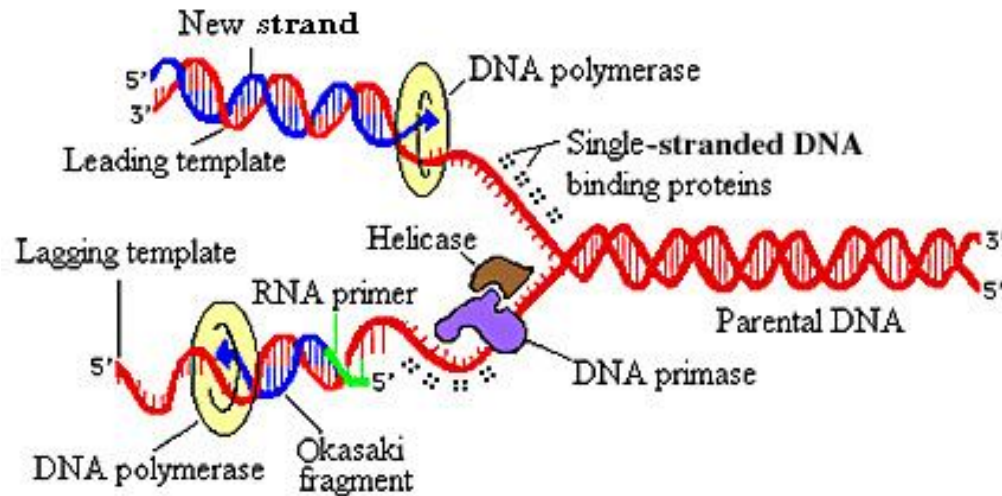
Replikace – bakterie



Elektron mikroskopický snímek autoradiografu DNA z *E. coli* b



Replikace – bakterie



**Collaboration of Proteins
at the Replication Fork**

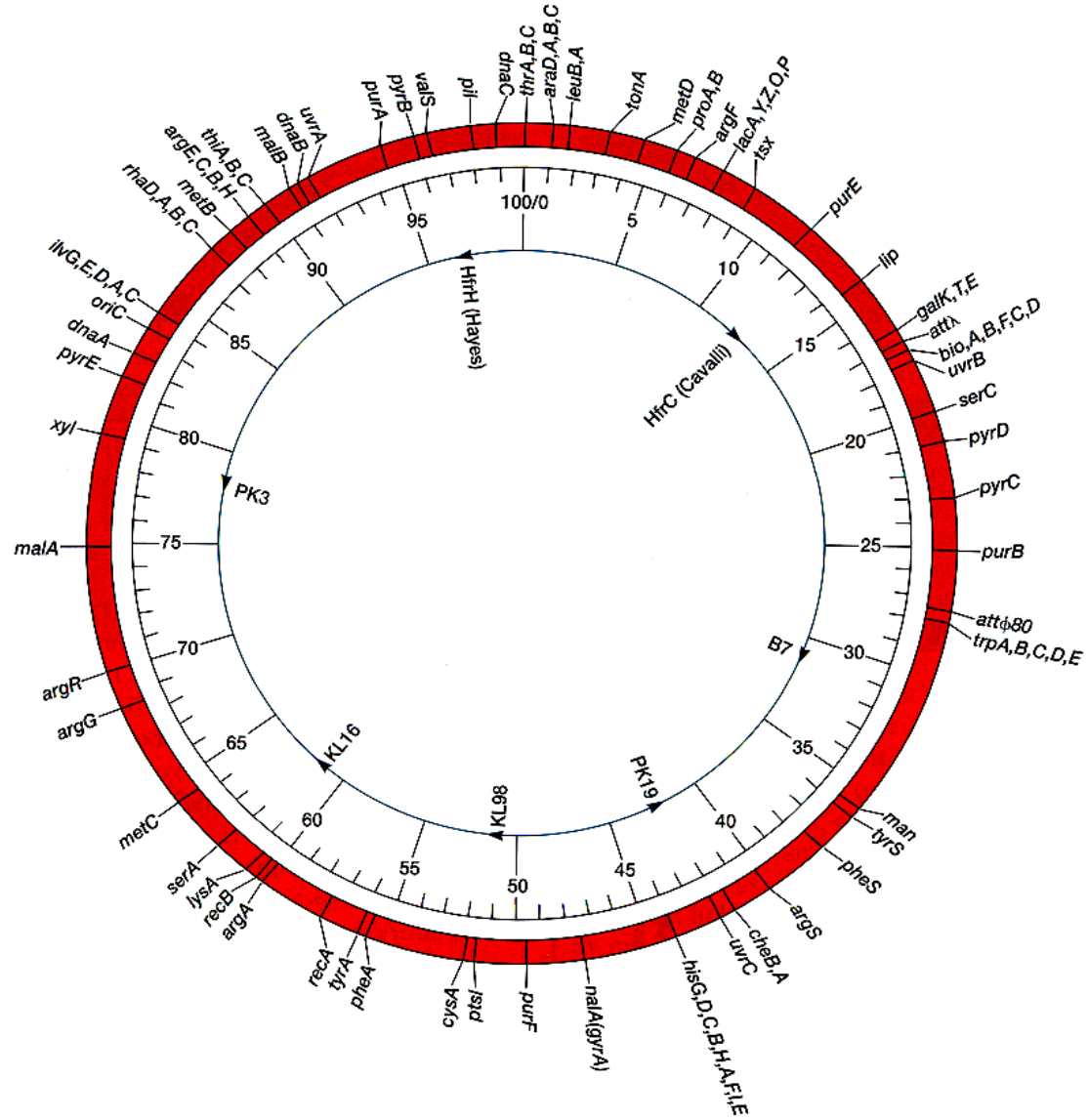
Korelace genetických a fyzikálních map:

- **Genetická mapa** – přibližná pozice genu určená genetickým křížením
 - U enterobakterií je kalibrována v jednotkách, rovných jedné setině mapy.
 - Vzhledem k tomu, že přenos chromosomu *E.coli* konjugací trvá asi 100 minut, jsou tyto jednotky pojmenovány jako **minuty**.
 - Místo *ori* lokalizováno do 80 minuty.
 - Nula je umístěna v threoninový lokus. Vytvářeny pomocí všech způsobů přenosu (konjugace, transformace, transdukce).

- **Fyzikální mapa** – stanovení exaktní pozice určité sekvence DNA od *ori*
 - Je kalibrována ve 100 intervalech nazvaných **centisomy**.
 - Jeden centisom je roven 1% délky genomu.
 - Jeden centisom (stanoven jako fyzikální jednotka) se nemusí nezbytně rovnat jedné minutě (stanovena rekombinací), neboť frekvence rekombinace je v různých částech genomu různá).

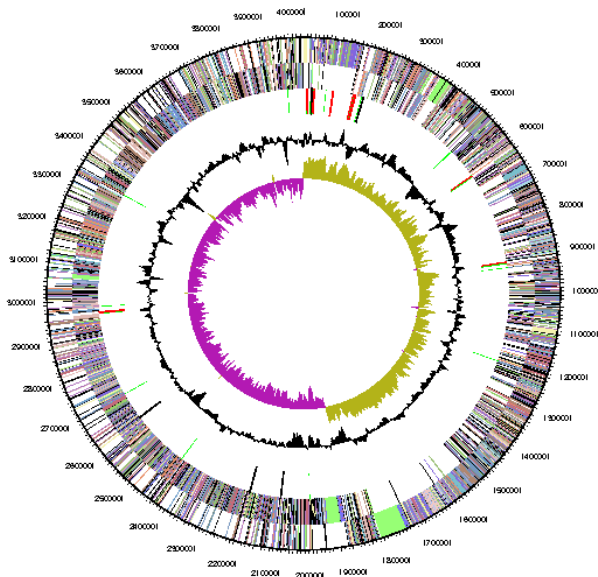
- **Při sekvenačních projektech** –
mnoho ORF s neznámou funkcí - označení těchto genů podle pozice na fyzikální mapě (v centisomech) třípísmenným kódem: *y_{ej}Y*
1. *y*, 2. desítky centisomů, 3. jednotky centisomů, (*a a k = 0*, *b a l = 1* atd.)

Genetická mapa E.coli



Fyzikální mapy

- V současné době 1456 kompletních sekvencí bakterií a archaea
- Sekvence publikovány –
 - NCBI – Genome - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome>
 - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/microbial_taxtree.html
 - bakterie i archaea –



NCBI Microbial Genomes

HOME | SEARCH | SITE MAP | Genome Project | Genome | Prokaryotic Projects | Collaborators | gMap | ProtMap | TaxPlot | BLAST | FTP | Contact us

Microbial Genomes Resources presents public data from prokaryotic genome sequencing projects. The sequence collection contains data from finished genomes as well as draft assemblies.

Microbial Genome Annotation Tools: We are pleased to announce the availability of GeneMark and Glimmer, gene prediction tools for microbial genome annotation.

Genome Annotation Pipeline: NCBI has developed a pipeline for annotation of prokaryotic genomes. This service is available to all users by request. If interested, please send an email to NCBI Genomes.

NEW Submission Check Tool: Microbial genome submission check is for the validation of genome submissions to Genbank.

The Concise BLAST database allows for faster calculation times and a broader taxonomic view by eliminating similar proteins within a genus.

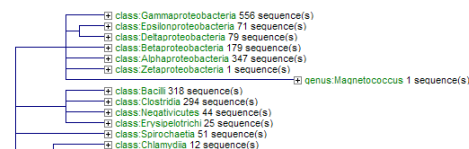
Prokaryotes are the earliest forms of life, appearing on earth 4 billion years ago. During the course of their evolution they have extensively altered the biology and chemistry of our planet. More advanced organisms developed as once free-living bacteria took up symbiotic residence inside other cells. These organisms eventually became the organelles found in modern eukaryotes. Energy-producing mitochondria and chloroplasts are examples of organelles in eukaryotic cells.

The Prokaryotes include the Archaea, which include inhabitants of some of the most extreme environments on the planet, and the Bacteria, which include both important pathogens and producers of fermented food, antibiotics, and vitamins.

Genomes
Genome Projects
Prokaryotic Projects
Microbial Genomes
Home
Complete Genomes
Draft Assemblies
Registered
Plasmids
Entrez Genome
Submit a Genome
Sequin
Submission Guide
Register a Project
Submit a Genome
Submit Traces
Tools
Resources
Sequencing Centers
Collaborators
Statistics

Browse Genomes

Database: Genomes | Organisms: Bacteria | Completeness: All | level: Limit by class



Fyzikální mapy

Organizace genomu

The Organization of the Bacterial Genome. Eduardo P.C. Rocha, Annu. Rev. Genet. 2008. 42:211–33

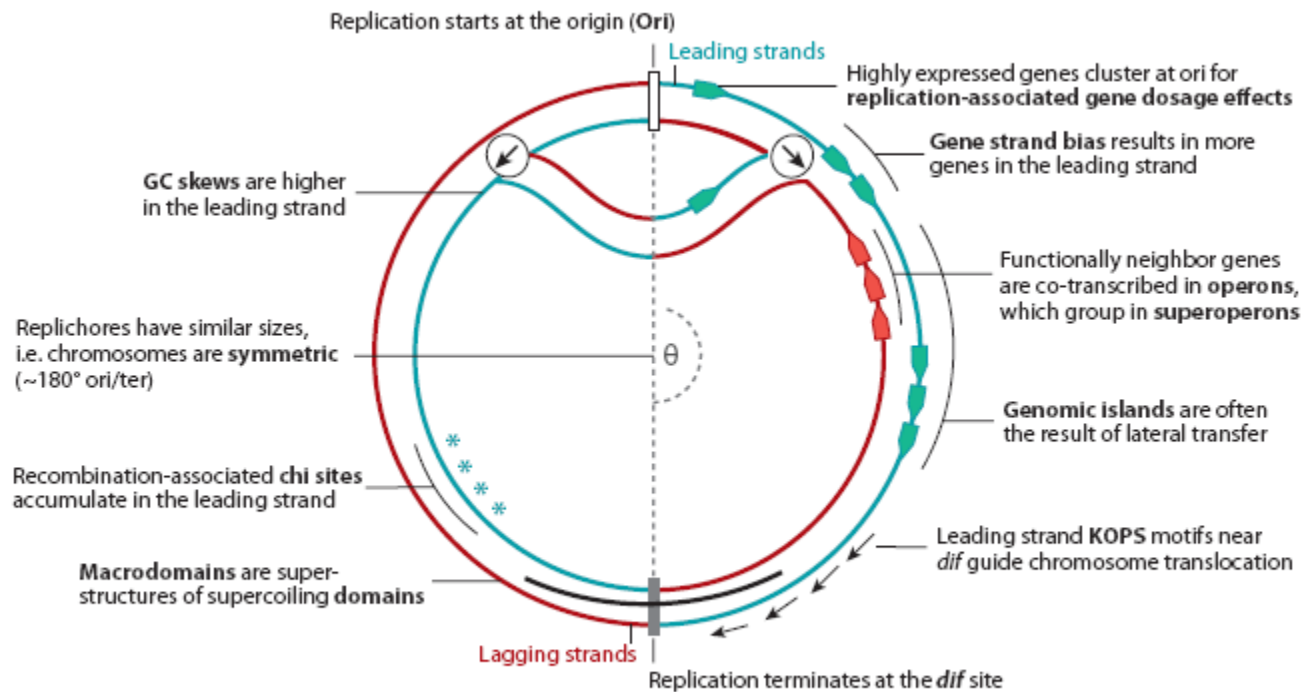
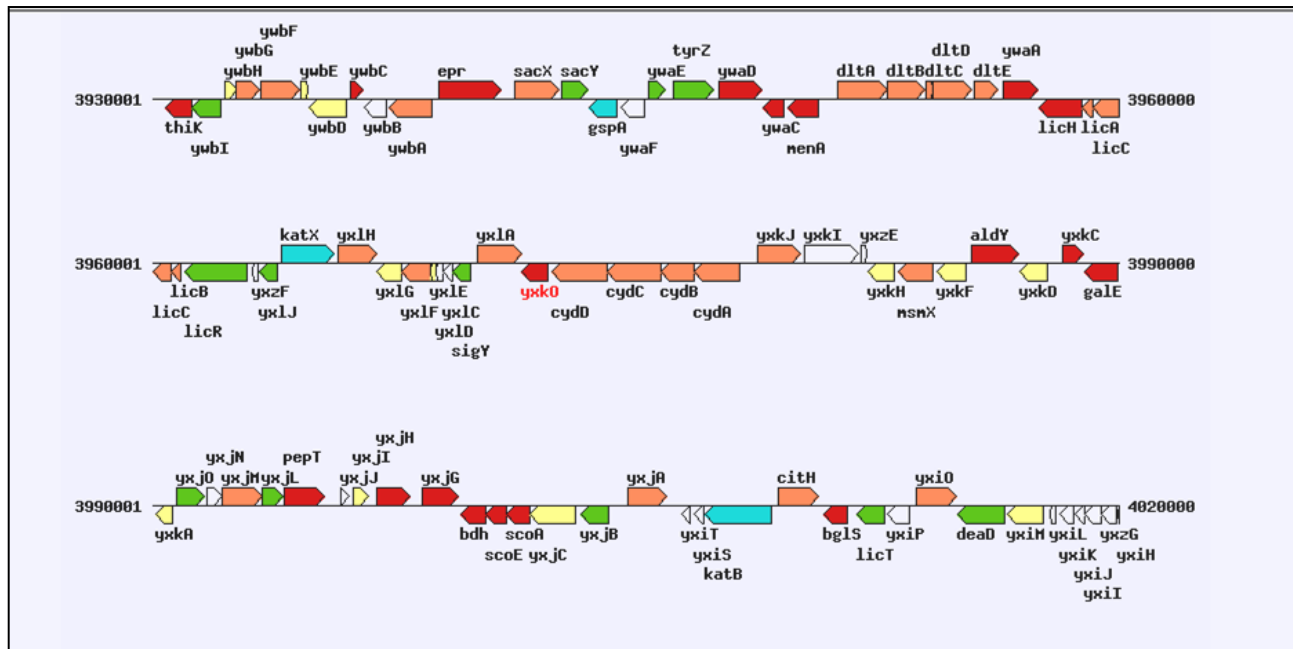


Figure 1

Elements of genome organization.

Struktura bakteriálního genomu

- Kódující informace na jednom vlákně
 - Střídavě na obou vlákněch
 - U fágů někdy dochází k překryvu
 - Jednotlivé geny v jedné kopii (vyjímky tRNA, rRNA,)



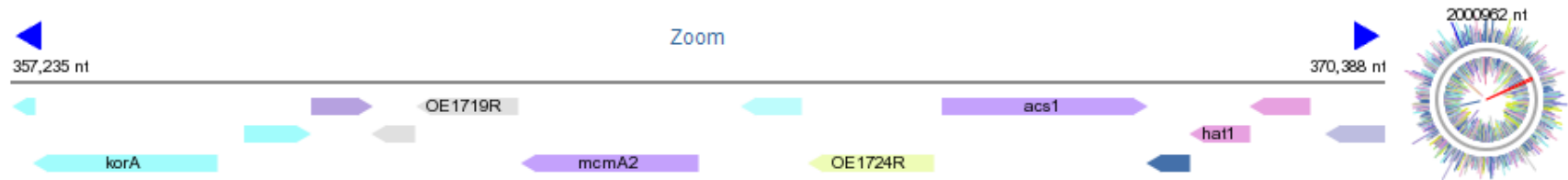
Struktura genomu Archaea

- Fyzikální mapa genomu *Halobacterium salinarum* R1 – NCBI Genome

Gene Classification based on [COG functional categories](#)

Search gene, GeneID or locus_tag:

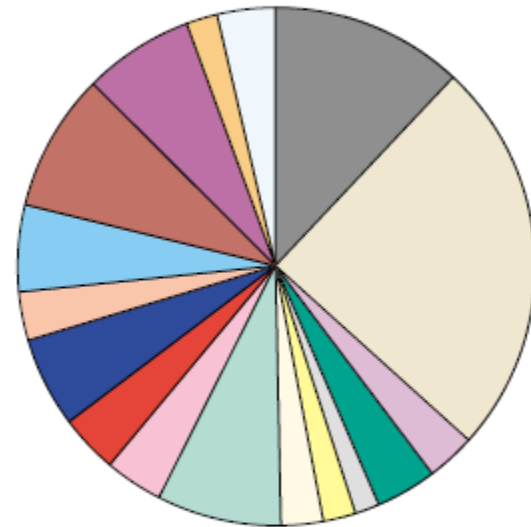
Find Gene



Click [here](#) for Sequence Viewer presentation (base sequence and aligned amino acids) of selected region

Mycobacterium tuberculosis

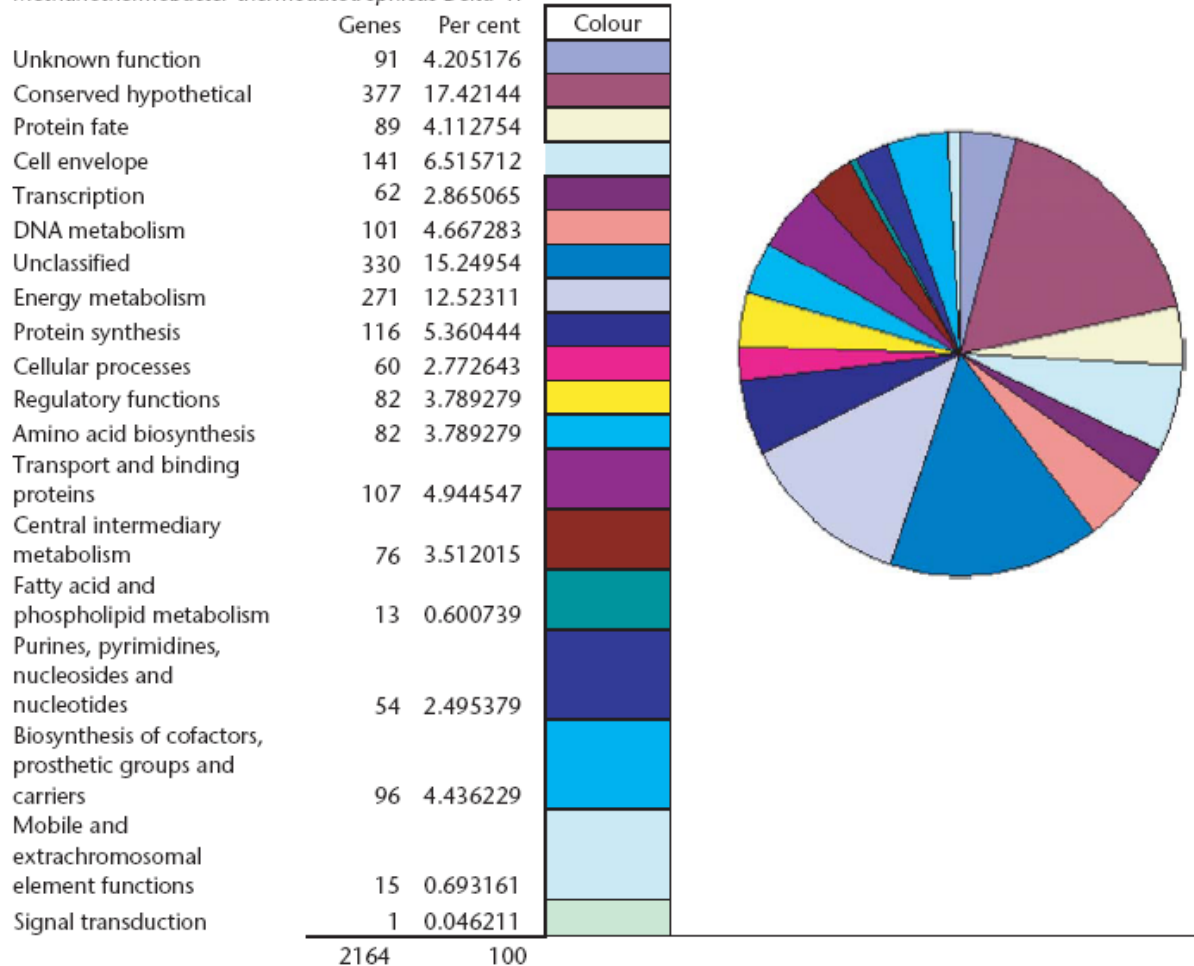
Gene role	Genes	Per cent	Colour
Unknown	335	11.60	Grey
Hypothetical	725	25.10	Light beige
Protein fate	79	2.74	Purple
Cell envelope	114	3.96	Teal
Transcription	37	1.28	Light grey
DNA metabolism	64	2.22	Yellow
Other categories	70	2.43	Light yellow
Energy metabolism	227	7.88	Light green
Protein synthesis	114	3.96	Pink
Cellular processes	101	3.50	Red
Regulatory functions	164	5.69	Dark blue
Amino acid biosynthesis	84	2.91	Orange
Transport and binding proteins	162	5.62	Light blue
Central intermediary metabolism	274	9.52	Brown
Fatty acid and phospholipid metabolism	168	5.83	Purple
Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	56	1.94	Orange
Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	104	3.61	Light blue
Number of genes	2878	100.00	



Functional distribution of genes for the bacterium *Mycobacterium tuberculosis* CSU 93.

Methanothermobacter thermoautotrophicus

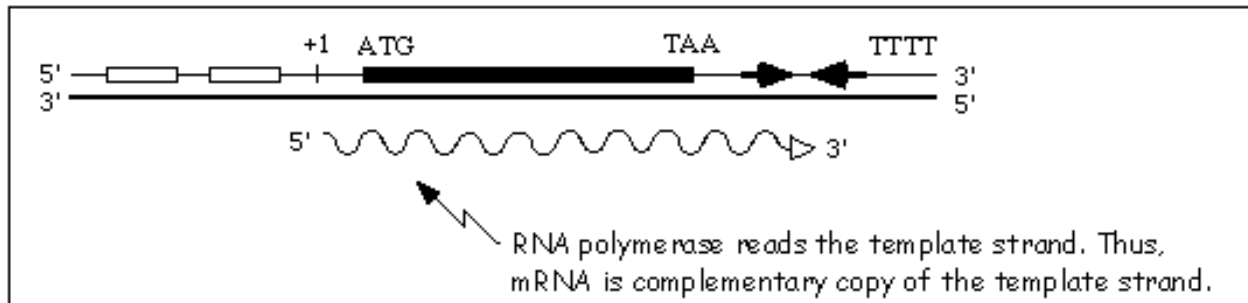
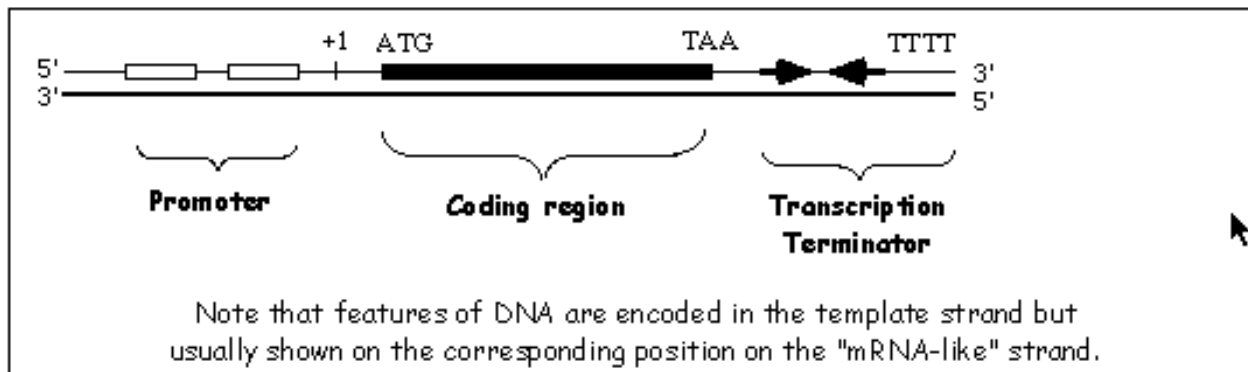
Methanothermobacter thermoautotrophicus Delta H



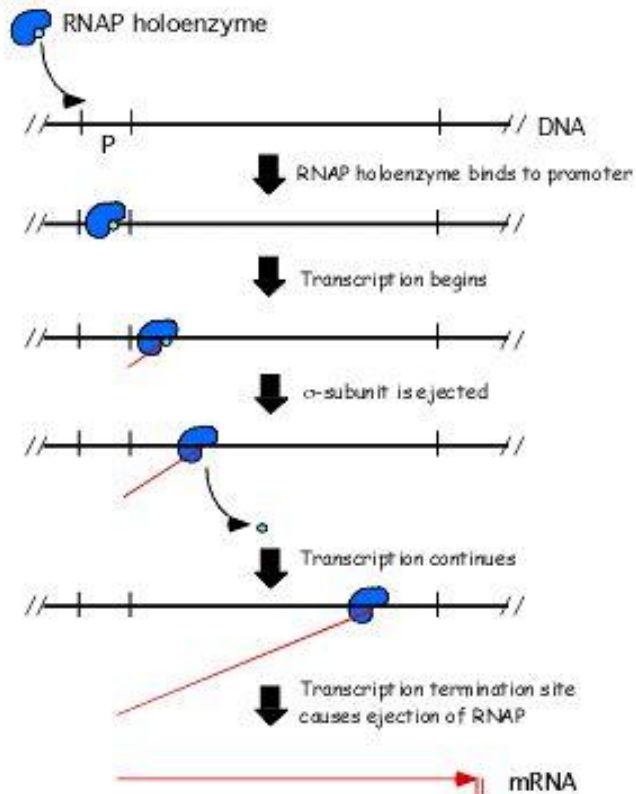
! Functional distribution of genes for the archaeon *Methanothermobacter thermoautotrophicus* Delta H.

Struktura bakteriálního genu

- Organizace typického strukturního genu u bakterií.

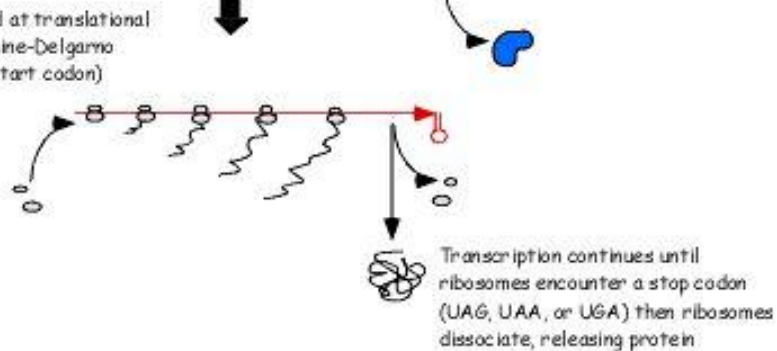


Transcription:

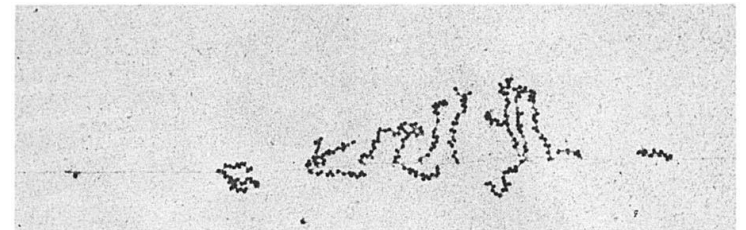


Translation:

Ribosomes bind at translational start sites (Shine-Delgarno sequence and start codon)



Note that although not shown in this cartoon, translation begins soon after the mRNA transcript is made.



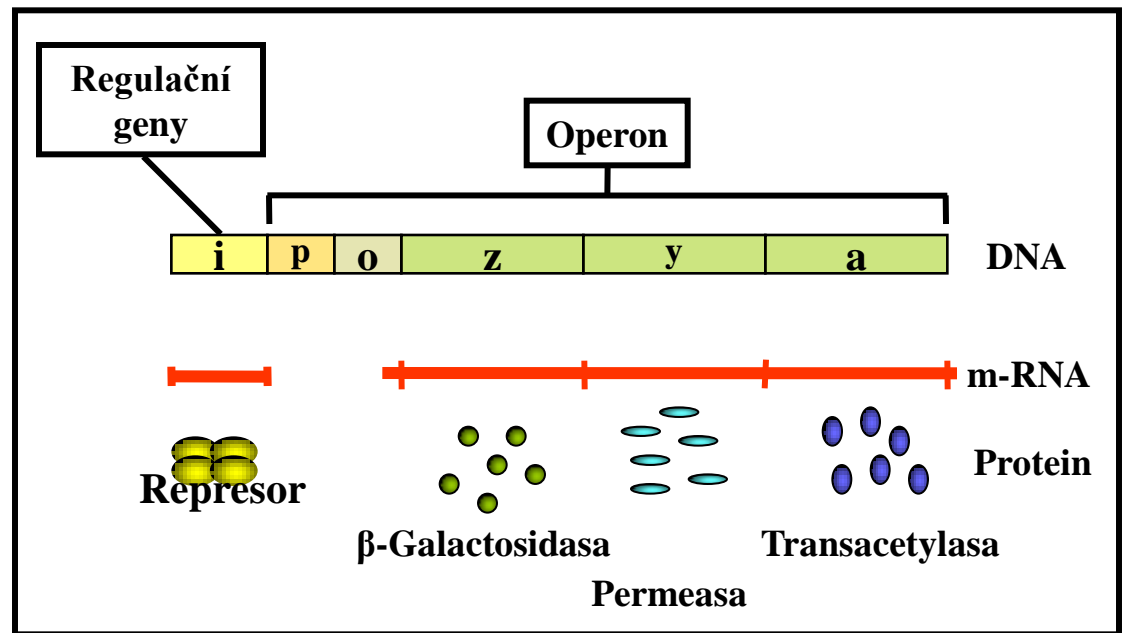
Kontrola genové exprese

Bakterie

- Organizace *souvisejících* genů do klastrů
- Koordinovaná kontrola *souvisejících* genů
 - operonový model
- Polycistronní mRNA
- Kontrola na transkripční úrovni -
 - regulační proteiny kontrola transkripce
 - určité podmínky – inducibilní geny
- Kontrola na translační úrovni -
 - struktury mRNA regulují iniciaci translace
 - nízkomolekulární látky, teplota, antisense RNA

Laktosový operon

- **Structurní geny**
 - *lac z, lac y, lac a*
 - Promotor
 - Polycistroní mRNA
- **Regulační geny**
 - Repressor
- **Operátor**
- **Operon**
- **Induktor - laktosa**

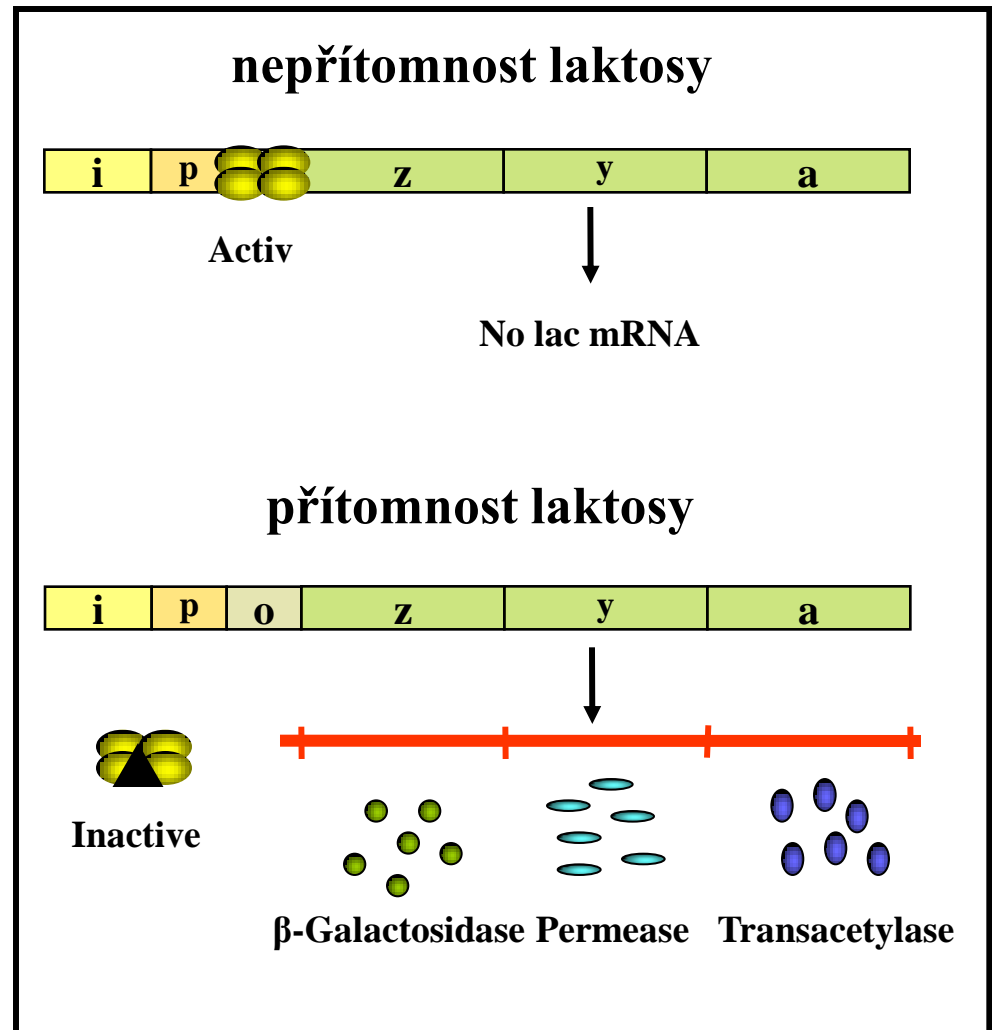


Laktosový operon

□ Induktor -- laktosa

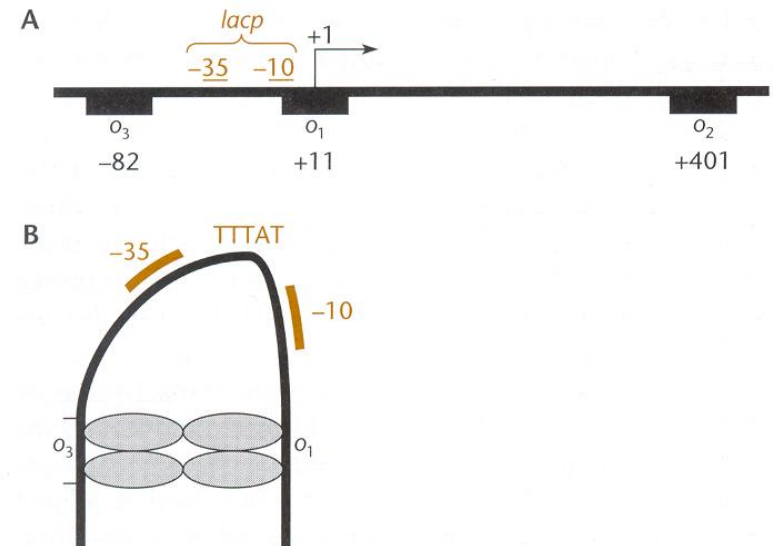
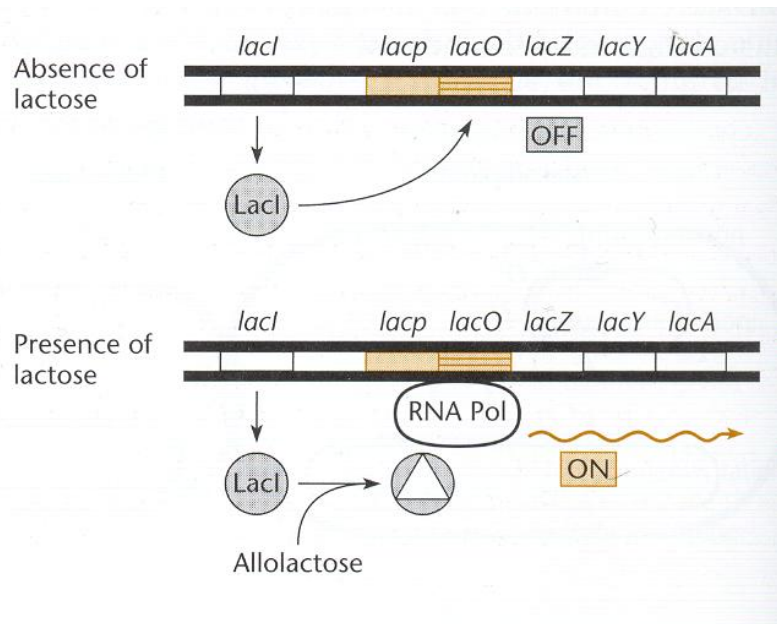
- nepřítomný
 - aktivní represor
 - žádná exprese
- přítomný
 - inaktivace represoru
 - exprese mRNA

□ Negativní kontrola



Laktosový operon

- Genetickou analýzou *lac* operonu vytvořen model – platný dodnes

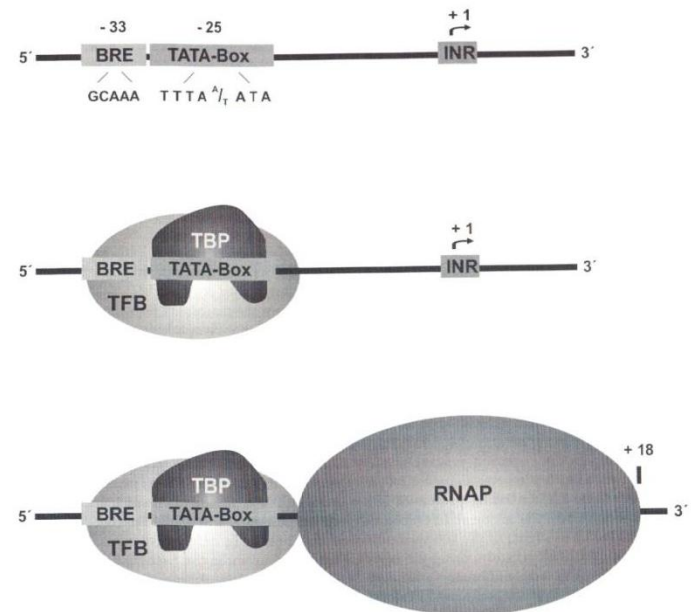
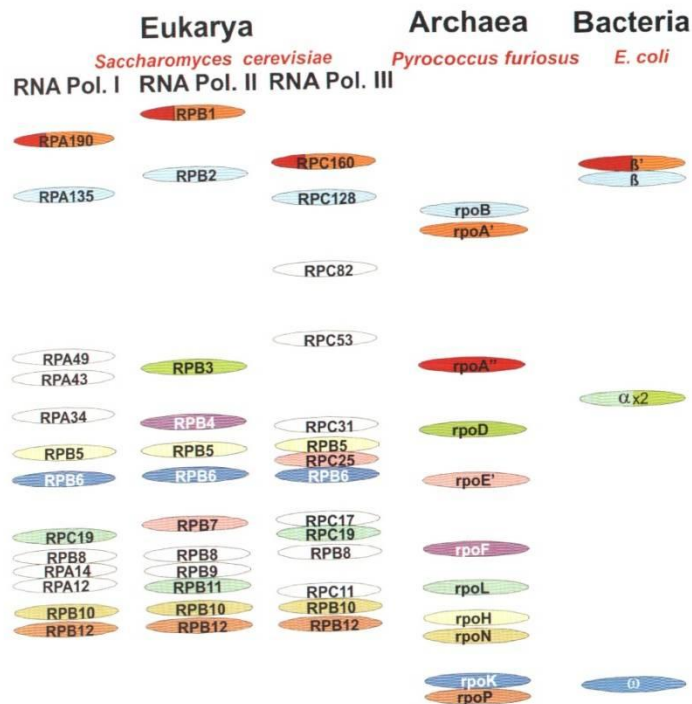


Kontrola genové exprese

Archaea:

Transkripce:

- transkripční mechanismus - podobný eukaryotní
- regulace – regulátory bakteriálního typu, pozitivní, negativní regulace



Rozdíly bakterie versus Archaea

β

Property	Archaea	Bacteria	Comments
Cell wall	Peptidoglycan absent	Peptidoglycan present	A variety of cell wall types are found among the Archaea, based on pseudomurein, complex polysaccharides, glycoproteins and other components
Membrane lipids	Phytanyl (isoprenoid)-based hydrophobic chains, bound to atom C2 and C3 of glycerol by ether linkages	Predominantly straight-chain fatty acids, bound to atom C1 and C2 of glycerol by ester linkages	Eukarya have lipid similar to those of the Bacteria
Histone-like proteins	Present	Absent	A property the Archaea share with the Eukarya
Initiator tRNA in protein synthesis	Methionine	N-formylmethionine	A property the Archaea share with the Eukarya
Ribosome sensitivity to diphtheria toxin	Yes	No	A property the Archaea share with the Eukarya
RNA polymerase structure	8–12 different subunits	4 different subunits (')	
Promoter structure	TATA box	–10 and –35 sequences (Pribnow box)	A property the Archaea share with the Eukarya
Sensitivity to chloramphenicol, kanamycin, streptomycin	No	Yes	

□ Rozdíly2

Table 1 Some comparative properties of Bacteria, Archaea and Eukarya ^a

Property	Bacteria	Archaea	Eucarya
Membrane-enclosed nucleus	No	No	Yes
Closed circular DNA chromosomes	Yes	Yes	No
Genes organized in operons	Yes	Yes	No
Histones present	No	Yes	Yes
Membrane lipid linkage	Ester	Ether	Ester
Peptidoglycan in cell walls	Yes	No	No
mRNAs with 5'-caps and 3'-poly A tails	No	No	Yes
Transcription TATA box-like binding sites	No	Yes	Yes
Sensitivity to diphtheria toxin (translation factor EF2 inhibitor)	No	Yes	Yes
Sensitive to streptomycin (70S ribosome inhibitor)	Yes	No	No
Sensitive to anisomycin (80S ribosome inhibitor)	No	Yes	Yes
Sensitive to aphidicolin (DNA polymerase inhibitor)	No	Yes	Yes

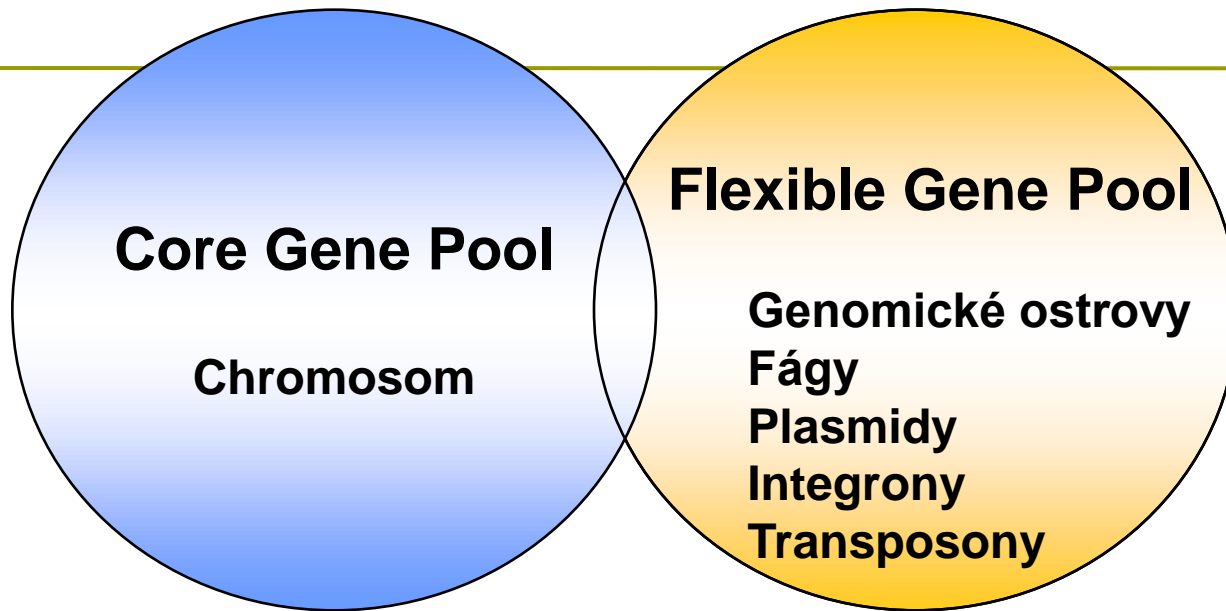
^aReferences in Brown and Dolittle (1997)

Základní charakteristiky „chování“ bakteriálního chromosomu

- Haploidní s nestabilní diploidní fází během reprodukčního cyklu
 - částečná diploidita - při některých formách genetických změn (konjugace, transdukce)

- Plasticita a proměnlivost genetického materiálu přestože u prokaryot není sexuální reprodukce.
 - náhodné mutace – mutátorové kmeny - bodové mutace, delece, inserce
 - mobilní genetické elementy – delece, inserce, duplikace, plasticita genomu
 - horizontální přenos - vzájemné sdílení mobilních elementů – konjugace, transdukce

Bacteriální genom



Core Gene Pool

Chromosom

- Buněčná stěna a membrána
- Základní metabolické dráhy
- Ribosomy
- DNA replikace
- Metabolismus nukleotidů

•
•
•
•

Flexible Gene Pool

Genomické ostrovy

Fágy

Plasmidy

Integrony

Transposony

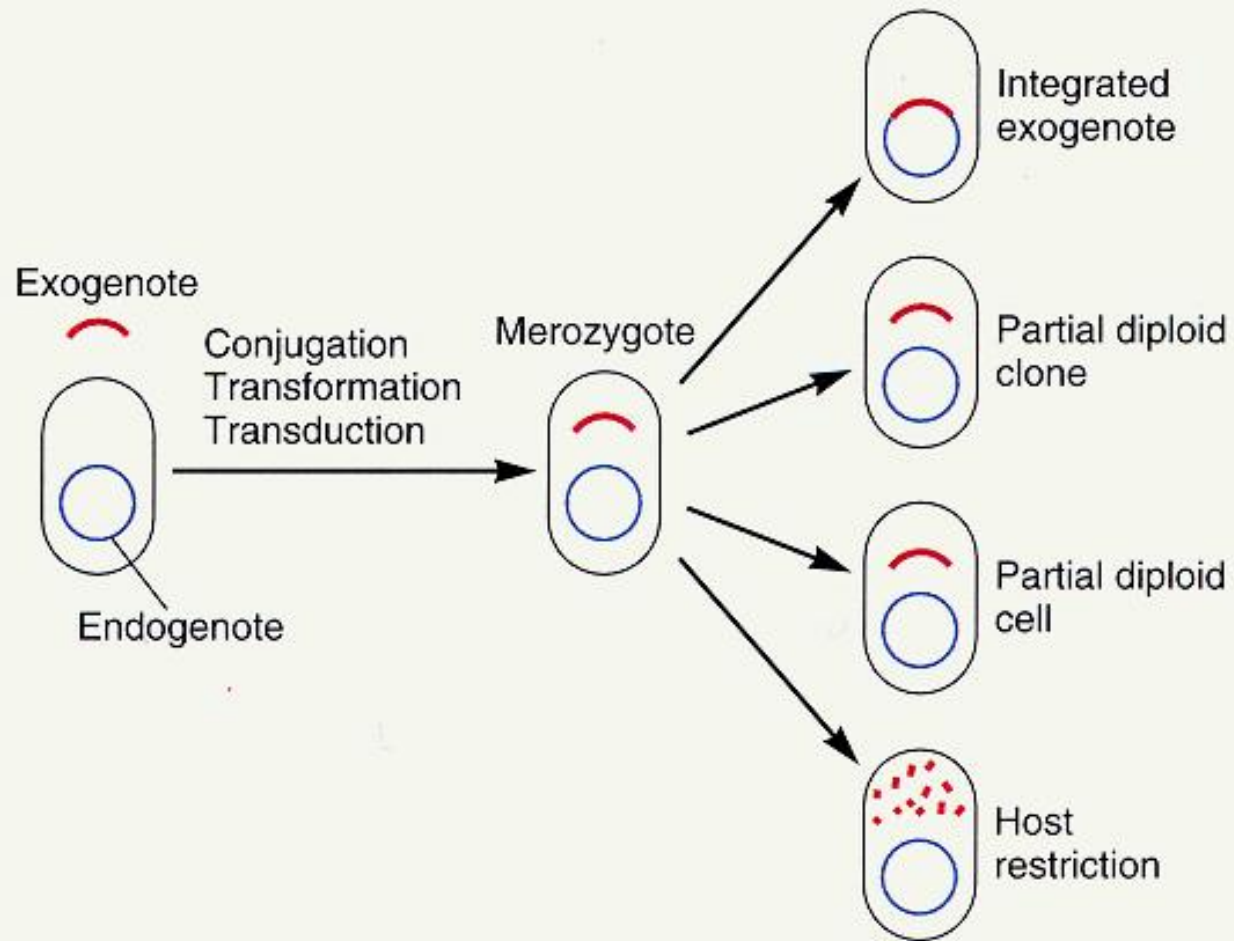
- Patogenicita
- Resistence k antibiotikům
- Sekrece
- Symbiosa
- Degradace
- Sekundární metabolismus
- Restrikce/ Modifikace
- Transpozice/ Integrace

•

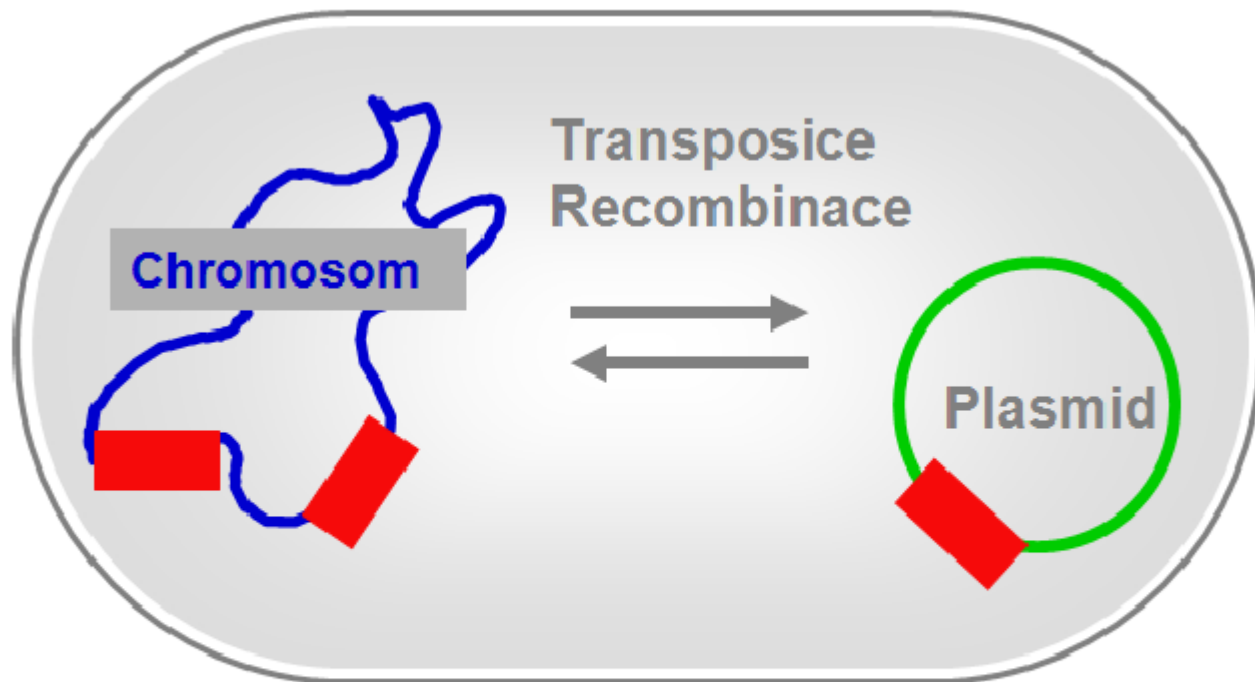
Základní rysy přenosu genů u bakterií

- **Přenos je jednosměrný**
 - donor > akceptor
- **Donor neposkytuje celý chromozom - vytvoření merozygoty**
 - přechodná diploidita
 - homologní rekombinace – záměna alel
 - restrikce akceptorem
- **Částečná stabilní diploidita**
 - při některých formách genetických změn (konjugace, transdukce)
 - in cis – insertovaný v blízkosti alely akceptoru
 - in trans - plazmid, bakteriofág
- **Přenos genů je možný mezi různými druhy**
 - horizontální přenos

Vytvoření a osud merozygoty



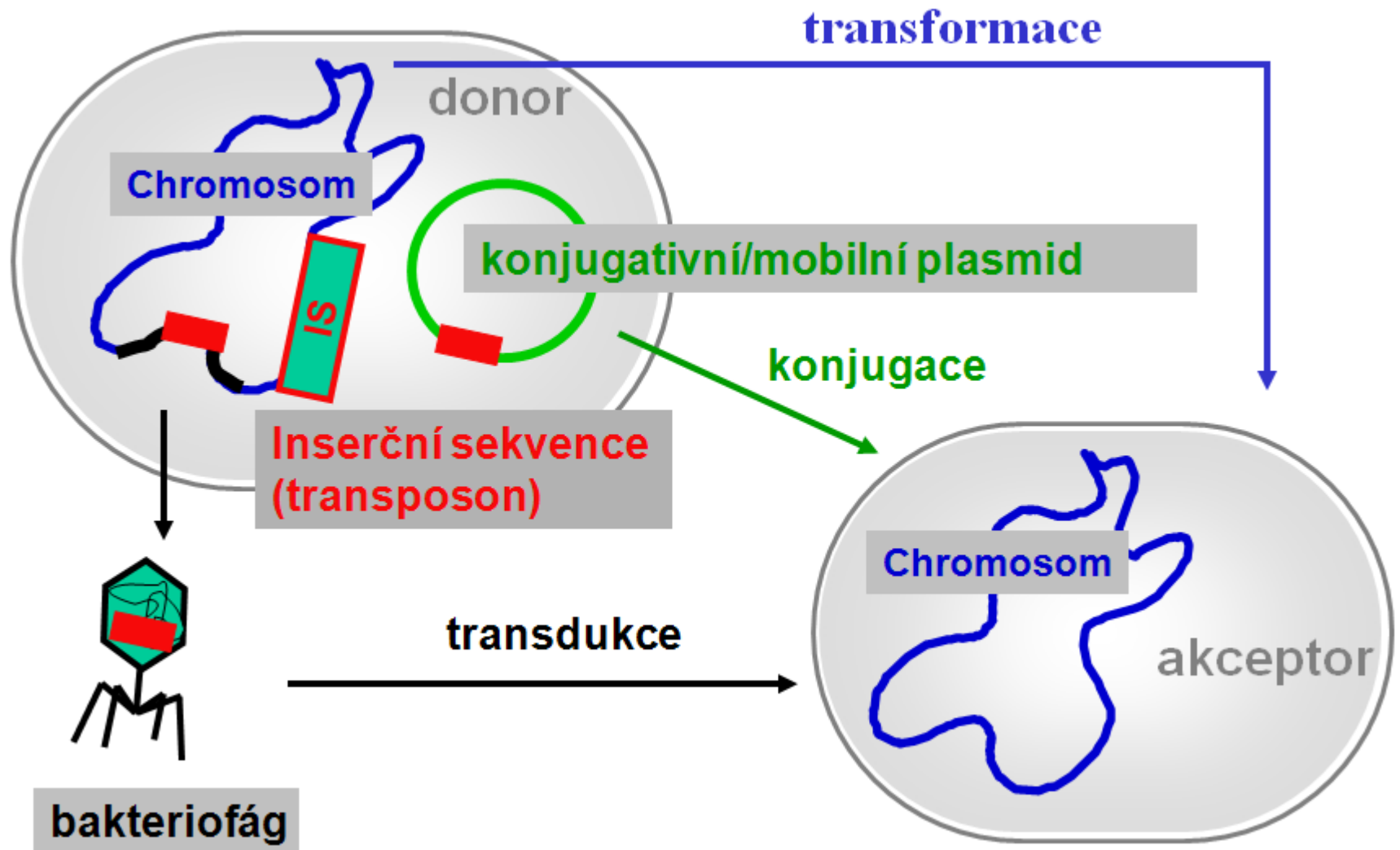
INTRACELULARNÍ PŘENOS GENOMU



— „Housekeeping“ geny

— Geny pro virulenci, resistanci k antibiotikům etc.

INTERCELULARNÍ PŘENOS GENOMU GENETICKÉ ELEMENTY BAKTERIÍ



Modelové organizmy

□ Bakterie –

- Gramozitivní – *Bacillus subtilis* –
 - transformace
 - Genetické studie sporulace
- Gramnegativní - *Escherichia coli*
 - Genetické mapování - konjugace
 - Lac operon – regulace transkripce
 - Bakteriofágy – studie translace
 - Hostitelský organismus pro rekombinantní techniky

□ Archaea –

- nejlépe prostudovaná archaea- *Sulfolobus sp.*, *Halobacterium sp.*, *Methanosarcina sp.* –
 - Klasické genetické nástroje – transformace, konjugace, shuttle vektory (E.coli) – knock out, nesespecifická mutageneze.