

Molekulární biotechnologie

- Regulovatelné promotory

Promotor a operátor

- Promotor je regulační oblast, na kterou se váže RNA polymeráza a jiné proteiny podmiňující zahájení transkripce s ním sdružené transkripční jednotky
- Operátor je regulační oblast na DNA, na kterou se specificky váže protein označovaný jako represor. V důsledku vazby represoru na operátor se zastaví transkripce operonu tj.
- přepisování genetické informace z DNA do RNA, při které DNA slouží jako matrice pro syntézu RNA katalyzovanou RNA polymerázou.

Regulovatelné promotory

- Umožňují kontrolovat transkripci operonu tak,
- že k expresi klonovaného genu dochází
- pouze v určitém stadiu růstového cyklu buněk a
- pouze po určitou dobu
- Dají se vypínat a zapínat (přídavkem určité látky, změnou teploty)

Zapnutí promotoru

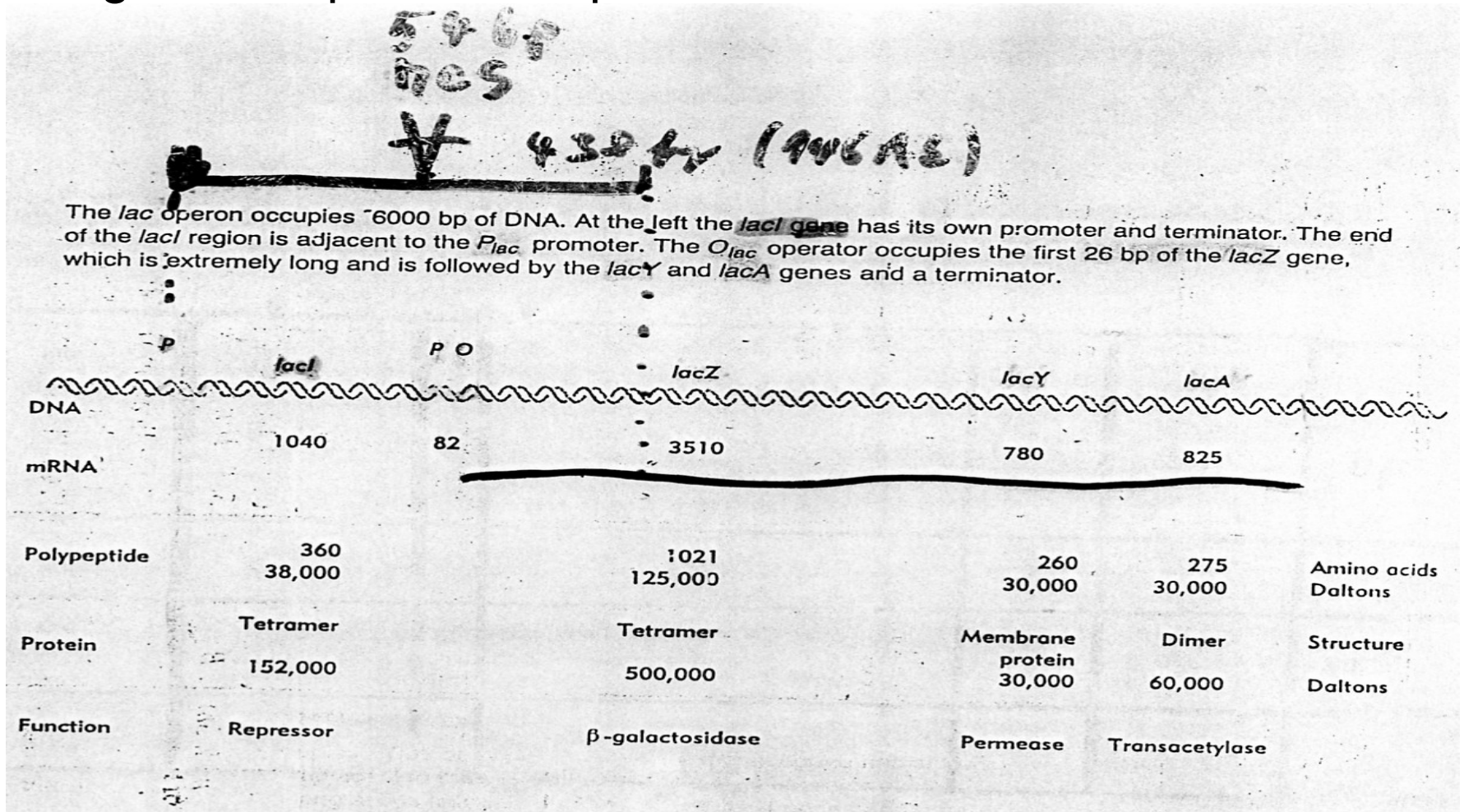
- Uvolnění pro vazbu RNA polymerázy a
- Pro transkripci

Vypnutí promotoru

- Zabránění vazby RNA polymerázy
- Zabránění transkripce

Laktózový operon *E.coli* (Glick a spol.2003)

Regulace exprese lac operonu – Obr.



Nejvíce používané regulovatelné promotory

- lac a trp promotory z laktózoového a tryptofánového operonu *E. coli*
- tac promotor (*in vitro* konstrukt, který obsahuje -10 oblast lac promotoru a -35 oblast trp promotoru)
- levý pL promotor fága lambda (*E. coli*)
- promotor genu 10 bakteriofága T7 (*E. coli*)
- Jedná se o silné promotory

Silný promotor

- Často se na něj váže RNA polymeráza a
- Dochází k syntéze mRNA

Přehled regulovatelných promotorů, jejich původ, způsob vypnutí a zapnutí

promotor	E. coli	vypínán	zapínán
lac (lac UV)	lac operon	lac represor	IPTG (nebo laktosa)
trp	trp operon	trp - trp represor	3- indolakrylová kys. (nebo odstranění trp)
tac	-10 lac, - 35 trp	lac represor	IPTG
pL	λ	CI (tg CI ₈₅₇) represor 30 °	40 °
p10 (p ^{T7})	gen 10 fága T7	T7 RNA polymeráza se nesyntetizuje	T7 RNA polymeráza syntetizuje se
p na plasmidu s vysokým počtem kopií (30-100)		represor na plasmidu s nízkým počtem kopií (1 - 8) nebo v chromozomální DNA → hladina represorového proteinu je na nízké úrovni	

Používají se

- Různé kombinace klonování promotorů a represorů
- S cílem zabezpečit regulovanou expresi klonovaného genu

Regulace genové exprese promotorem p^L , který vypíná a zapíná teplotně sensitivní represor cI fága lambda (Glick 2003)

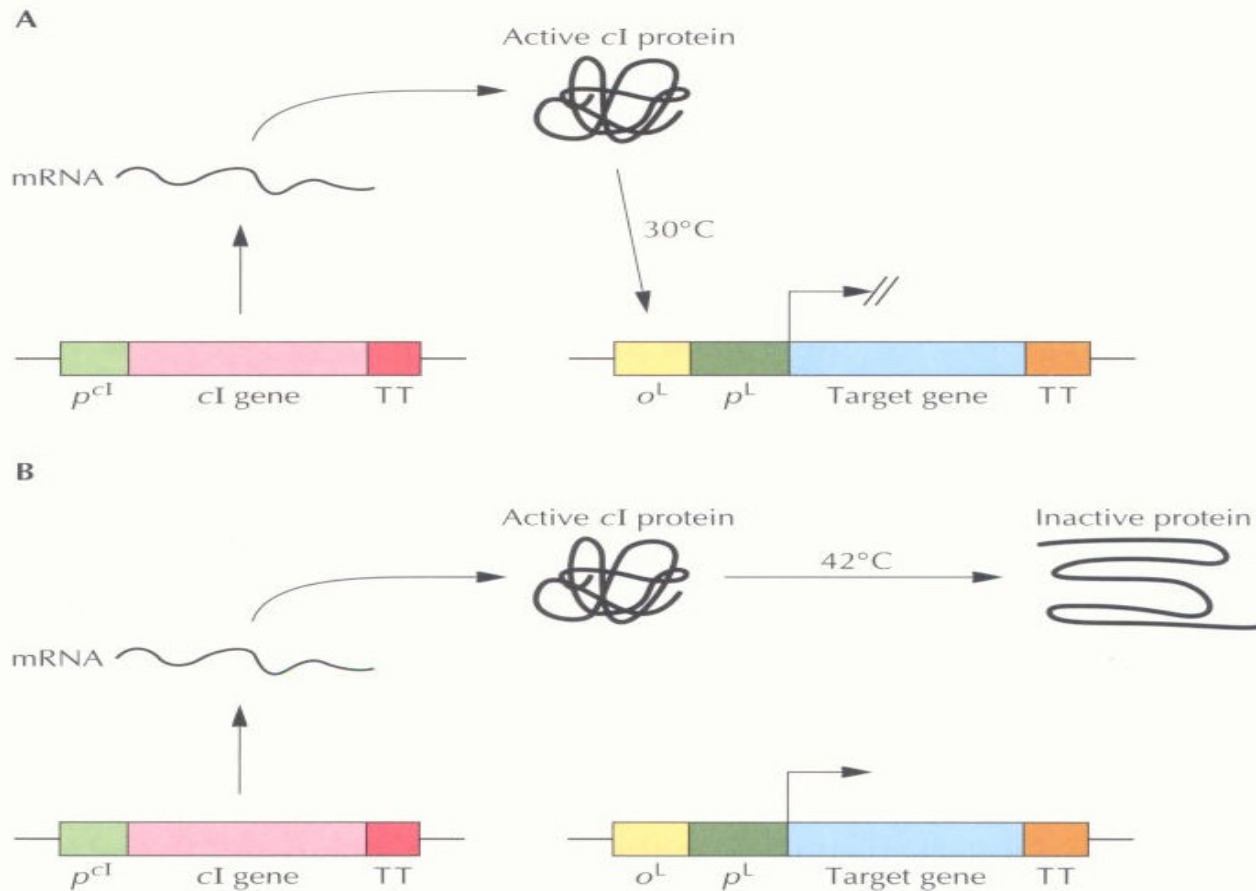


Figure 6.2 Regulation of gene expression controlled by the p^L promoter. **A.** At 30°C, the cI repressor, which is synthesized constitutively under the control of its own promoter (p^{cI}), binds to the operator region (o^L) of the p^L promoter, thereby preventing the target gene from being transcribed. **B.** At 42°C, the temperature-sensitive cI repressor is synthesized and then inactivated so that it no longer interferes with transcription of the target protein. TT, transcription termination sequence.

Regulace genové exprese promotorem genu 10 bakteriofága T7 (*E.coli*) (Glick 2003)

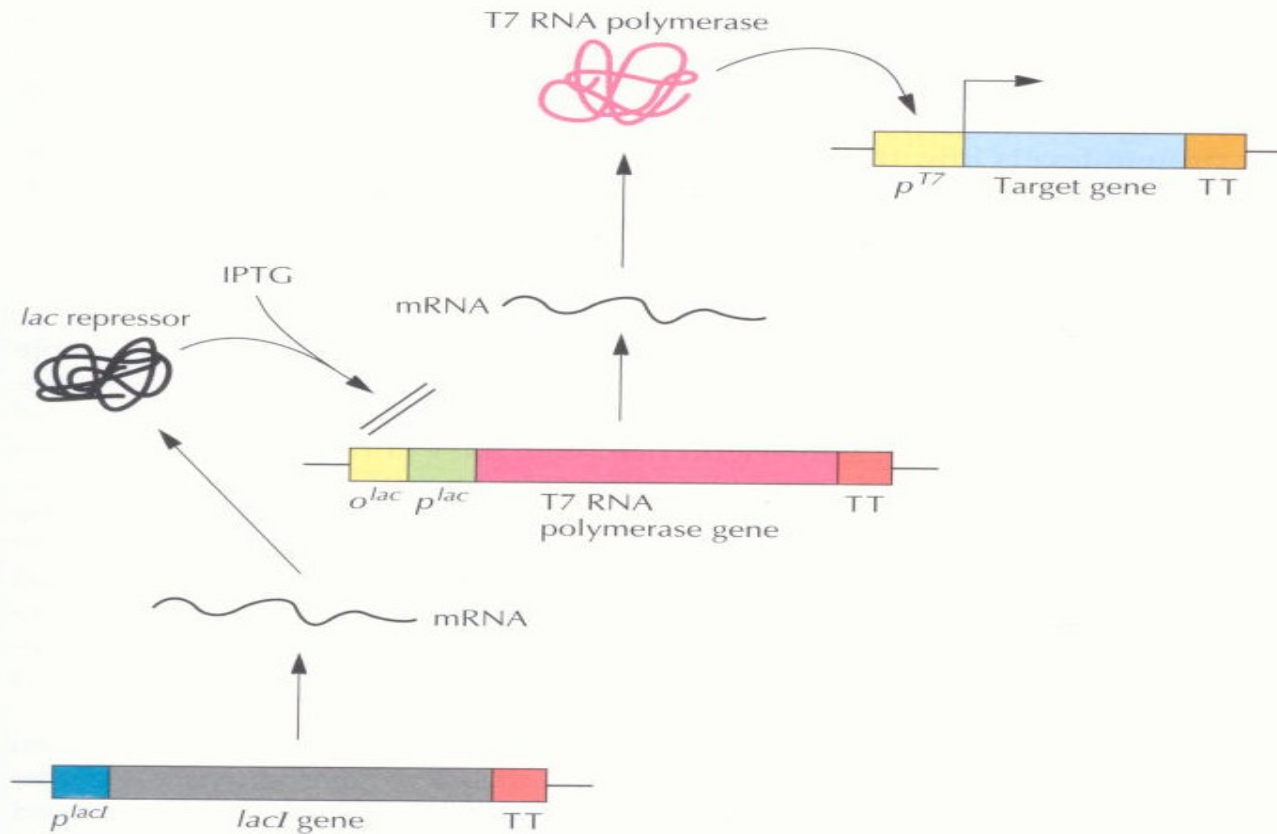


Figure 6.3 Regulation of gene expression controlled by the promoter for gene 10 from bacteriophage T7 (p^{T7}). In the absence of the inducer IPTG, the constitutively produced *lac* repressor, the product of the *lacI* gene, which is under the control of the *lacI* promoter, p^{lacI} , represses the synthesis of the T7 RNA polymerase that is transcriptionally controlled by the *lac* operator (o^{lac}) and *lac* promoter (p^{lac}). In the absence of T7 RNA polymerase, the target gene, which is under the transcriptional control of the T7 gene 10 promoter (p^{T7}), is not transcribed. When lactose or IPTG is added to the medium, it binds to the *lac* repressor, thereby preventing it from repressing the transcription of T7 RNA polymerase. In the presence of T7 RNA polymerase, the target gene is transcribed. TT, transcription termination sequence.

Průmyslový systém ve velkém

- Využívá buněk, které nesou 2 plasmidy, každý s jiným regulovatelným promotorem
- Jeden plasmid nese tryptofánový promotor, který kontroluje expresi *cl* represoru
- Druhý plasmid nese *pL* promotor, který kontroluje expresi klonovaného genu
- Represe *pL* promotoru se docílí růstem buněk na mediu bez tryptofanu (melasa, kaseinový hydrolyzát)
- Dereprese se docílí přidáním tryptonu (trypton obsahuje dostatek tryptofanu)

Systemy ve velkém využívající 2 různých regulovatelných promotorů, tryptofánového, který kontroluje produkci cI represoru, a pL promotoru, který kontroluje expresi klonovaného genu (Glick 2003)

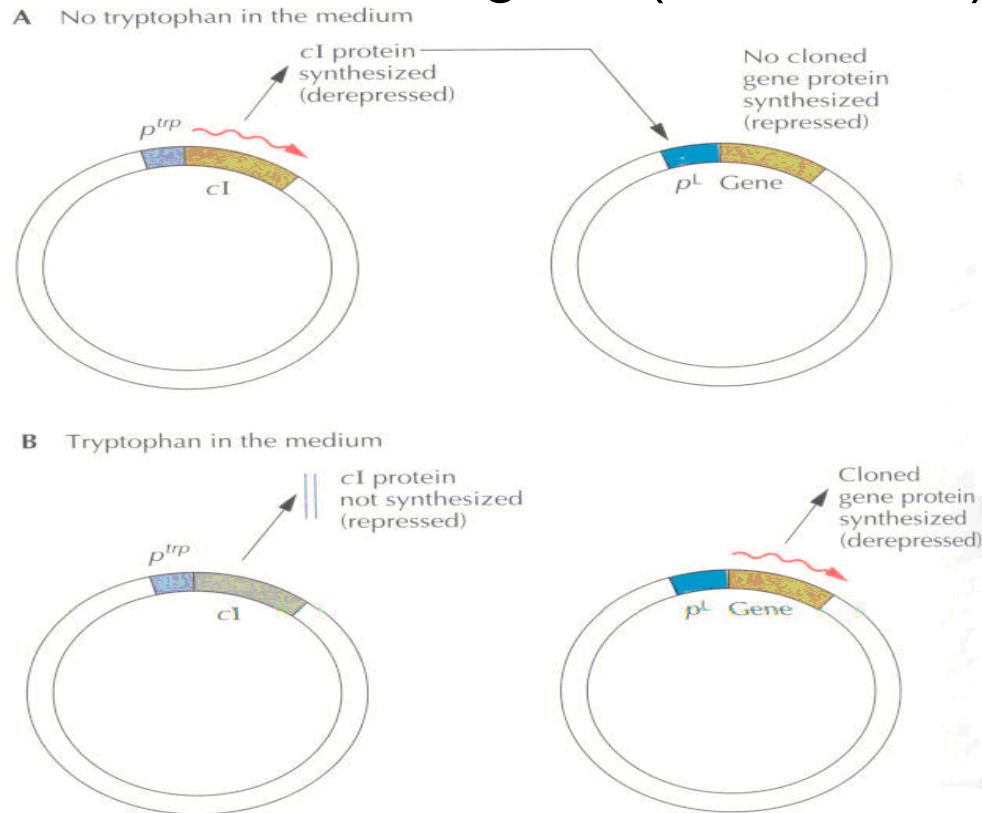


Figure 6.5 Dual plasmid system for controlling the λp^L promoter by regulating the cI repressor with tryptophan. The tryptophan promoter (p^{trp}) is inserted next to the cI gene on one plasmid, and the p^L promoter is placed adjacent to the cloned gene (Gene) on a second plasmid. The wavy arrows denote transcription. **A.** With no tryptophan in the medium, the cI gene is transcribed and translated, and the cI repressor protein binds to the p^L promoter, thereby blocking the transcription of the cloned gene. **B.** In the presence of tryptophan, the cI gene is repressed, no cI product is made, and the cloned gene is transcribed and translated.

- PřF 19.10.2010
- FCh 21.10.2010