

STUDIUM REGULACE

Integrační vektory, reportérové geny, značené proteiny,
dvouhybridní systémy

- **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), část III kapitoly 10,11,12,13 část IV kapitola 14.
- Prokaryotic genetics, Joset, F., Guespin-Michel, J. (Blackwel), 1993, kapitoly 13,14,15.
- Aktuální separáty
- **web:**
 - <http://els.wiley.com> (jen z univerzitních PC) (<http://www.els.net>)
 - jednotlivé citované práce

Studium regulace

□ Regulace genové exprese

- v popředí zájmu studia v postgenomické době
- proces při kterém je exprese genu zapínána/vypínána
- různé podmínky, různý fyziologický stav

□ Důvody regulace exprese genů

- exprese jen aktuálně potřebných genů
- reakce na změnu vnějšího prostředí
- součást procesu vývoje – (sporulace)

□ Formy regulace

- regulace na transkripční úrovni – regulace syntézy RNA – nejefektivnější
- postranskripční regulace - všechny regulace po transkripci RNA
- regulace na translační úrovni – RNA konstitutivně, za určitých podmínek není translatována – atenuace, asRNA

Studium regulace

□ Vytváření genových fúzí

■ Transkripční fúze

- Plazmidy -
- jeden gen je fúzován (přiřazen) k promotoru druhého genu
- oba geny jsou transkribovány do jedné mRNA ale vytvářejí dva proteiny.
- Deriváty transpozonů
- obsahují reportérový gen (*lac*, *lux* atd.) s vlastní oblastí iniciace translace.

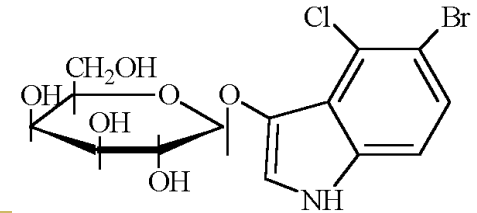
■ Translační fúze

- Plasmidy - ORF dvou proteinů jsou fúzovány dohromady a vytvářejí jeden společný ORF – vznik jednoho fúzního proteinu.
- Deriváty transposonů obsahují reportérový gen (*lac*, *lux* atd.) ale bez oblasti iniciace translace.

Genové fúze – reportérové geny

- Reportérové geny – geny jejichž aktivita je snadno detekovatelná a kvantifikovatelná
- Transkripční fúze
- Vlastnosti
 - ▣ **Detekovatelnost** – nesmí interferovat s genetickým pozadím ani prostředím
 - ▣ **Citlivost** – záleží na typu experimentu – strukturní geny x regulační geny, kultivace v tekutém mediu, pevné půdy, enviromentální pokusy – nejcitlivější i jedna buňka
 - ▣ **Spolehlivá kvantifikace**
 - ▣ **Specifická aktivita**
 - ▣ **Schopnost reagovat na změny** transkripce – kompromis mezi citlivostí a stabilitou. Stabilní reportéry nereagují na oscilující změny transkripce

Genové fúze – reportérové geny



- **lacZ** – β –galaktozidáza – štěpí laktozu na glukosu a galaktozu
 - Stanovení kolorimetricky – v tekutém mediu i na pevném
 - x-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

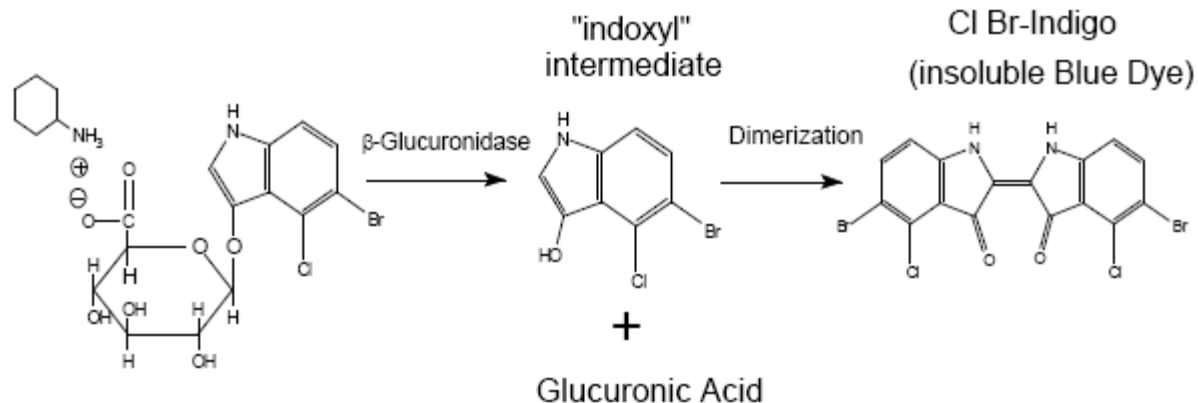
X-Gal (colorless) $\xrightarrow{\beta\text{-gal}}$ galactose (colorless) + 4-Cl-3-Br-Indigo (deep blue)

- ONPG - 2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside
- Fluorescentní nebo luminiscentní stanovení (Bronstein I., et al. 1994, Anal Biochem. 219, 169.)
 - Řádově citlivější
- Studium regulací v jedno druhových kulturách –
 - některé bakterie mají β –galaktozidázaovou aktivitu (mutanty),
 - sensitivní k pH a vyšší teplotě
 - nevhodný k měření rychlých změn v transkripci

(Atlas R.M. et al. BioTechniques. 12,706. Burlage, R.S. et al. Annu. Rev. Microbiol. 48,291.)

Genové fúze – reportérové geny

- ***gusA*** – (*uidA*) – β -glucuronidase - štěpí široké spektrum glucuronidů
 - Chromogenní substrát –
 - X-gluc - *p*-nitrophenyl β -D-glucuronidide
 - X-GlcA - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide
 - Těž fluorescentní pigment –
 - Použití převážně u patogenních rostlinných virů, symbioty rostlin (tam kde nelze *lacZ*),
 - U enviromentálních bakteriálních populací též omezeno



Genové fúze – reportérové geny

- ***xylE*** – catechol-2,3-oxygenasa – přeměna catecholu na 2- hydroxymuconic semialdehyd –
 - žlutý pigment – spektrofotometrické stanovení
 - nalezen u Pseudomonad – nevyskytuje se nikde jinde
 - nevýhoda – stabilita závislá na fyziologickém stavu bakterie a dostupnosti kyslíku
- **Bioluminescence** – *luxCDABE* operon z *Vibrio fischeri*
 - světlo emitující reakce (*luxAB*) – v přítomnosti alifatického aldehydu (substrát, *luxCDE*) a zdroje redukčních ekvivalentů – FMNH₂ a O₂
 - aerobní prostředí, aktivně rostoucí buňky
 - vhodný pro studium genové exprese *in situ*
 - minimální pozadí
 - kvantifikace luminometrem nebo protony měřící přístroje
 - stabilní reportér – není vhodný pro rychlé změny transkripce
- ***cat*** – resistance k chloramfenikolu –chloramphenicol acetyl transferasa

Genové fúze – reportérové geny

- **Fluorescentní proteiny** – Errampalli 1999, J. Microbiol. Methods 35, 187,
 - **GFP** – green fluorescent protein – jellyfish *Aequorea victoria* – absorbuje fialové světlo při maximu 395 nm a emituje zelené světlo s maximem 509 nm – první používaný
 - Kvantifikace fluorescenční spektroskopii a konfokální laserovou mikroskopií
 - Použití pro jednotlivou buňku – lokalizace proteinů
 - Vhodný pro nerostoucí buňky
 - Odolný proti mnoha denaturantům, proteázám, odolný proti teplotě (65 °C), formaldehydu
 - Vhodný pro elektronovou mikroskopii
 - **Barevné varianty** – rozdílné excitační a emisní vlnové délky
 - Možnost použít několik najednou pro různé geny – metoda FRET
 - Žlutý (513,527) , tyrkysový (453,501), modrý (385,445),
 - Modifikované GFP – red shifted S65T (395, 490) – více fluorescentní i odolný

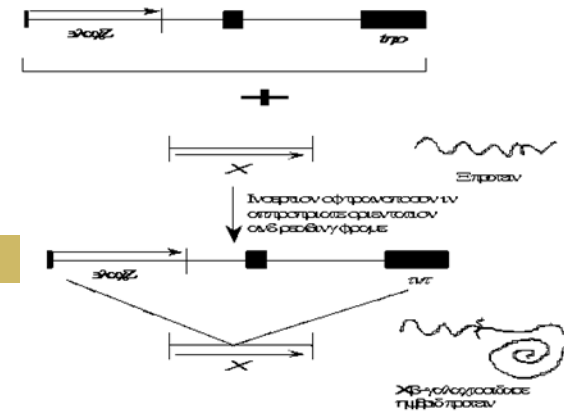
Značení proteinů

- Nestabilní varianty GFP –
 - obsahují N-terminální peptid - AANDENYLAA – označení pro proteasy
 - Alterace 3 aa na C – konci LVA, AAV, ASV – stabilita v *E. coli* – 40, 60, 100 min.
 - Snižuje se citlivost – dobrý kompromis mezi citlivostí a schopností reagovat na změny transkripce
- Obecně bakteriální buňky tolerují nízké koncentrace GFP
- Některé kmeny vysoké hladiny netolerují – degradace konstruktů – důvod neznámý
 - použití k lokalizaci
- RFP – red - izolovaný z mořských korálů
 - „Divoký“ protein – fluorescenční aktivita až po několika hodinách po transkripci

Značení proteinů

- Typy značek
 - ▣ Translační fúze s epitopy – komerčně dostupné protilátky (Sigma, Roche)
- **FLAG** – arteficielní 8 aa zbytek
- **HA** – 9 aa zbytek odvozený od chřipkového hemaglutininu
- **C-Myc 10** aa zbytek odvozený od lidského c-myc onkogenu

Vytváření genových fúzí – nespecifická mutageneze



□ Studium procesů

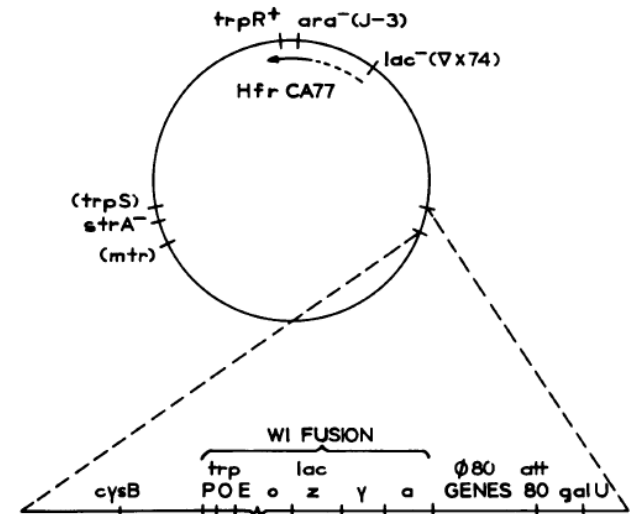
- Pomocí transpozonů – nespecifické inserce
- Rychlá a celková analýza chování genů a jejich funkcí
 - použitím sekvenčně definovaných kolekcí mutantů pro daný fenotyp
 - dojde k vyřazení genu –
- nelze studovat
 - esenciální geny
 - geny esenciální pro daný fenotyp v nonpermissivních podmínkách (regulační geny, signální dráhy)
- lze studovat
 - úroveň transkripce daného genu na změny prostředí, genetické
 - geny účastnící se daného fenotypu
 - dají se vytvořit např. knihovny regulonů - např. sigma podjednotek RNA polymerázy

První použití fúze s lacZ

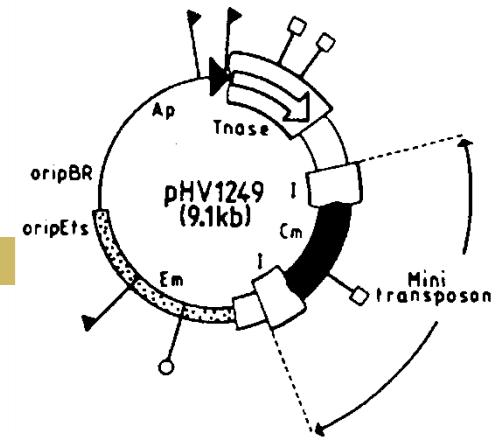
□ Př. 1: Isolating Tryptophan Regulatory Mutants in Escherichia coli by Using a trp-lac Fusion Strain.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Feb. 1972, p. 526-532, Reznikoff, William

- Popis a izolace mutant – laktozový operon byl přenesen transpozicí do blízkosti Trp operonu
- Genetickými manipulacemi – izolován kmen s trp-lac fúzí ve správné orientaci
- Z různých kmenů – deleční mutanty v trp operonu fúzované s lac
- Potvrzení domněnky, že tento nový systém může umožnit izolaci trp regulačních mutant
- Konstitutivní mutanty, trp-, lac+, -
 - výhoda pro studium trp konstitutivních mutant
 - Zároveň auxotrofní – selkční marker
 - Výhoda použití x-gal – barevný systém
 - Použití diferenčních ploten



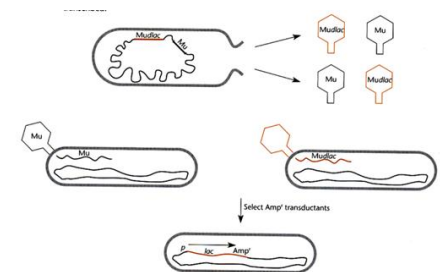
Vytváření genových fúzí – nespecifická mutagenese



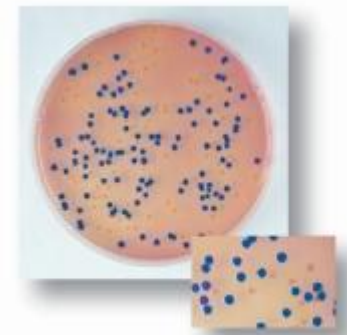
- Volba transpozonu, jeho „doprava“ - druhově závislé
 - sebevražedné plazmidy s minitransposony,
 - pHV1249 pro *Bacillus* a G+ -
 - dva oriV – *E.coli*, *B.subtilis* (termolabilní),
 - tři selekční markery - Cat – v Tn, Ery – mimo Tn, Ap – mimo Tn selekce pouze v *E.coli*
 - gen pro transponázu mimo IR
 - promotor transponázy z *B.subtilis*
 - v miniTn unikátní restriční místo -
 - transformace DNA transpozonů (komplex transposon-transponase) nebo produkty inserce *in vitro* (plazmidy)

□ sebevražedné fágy, transponující bakteriofágy

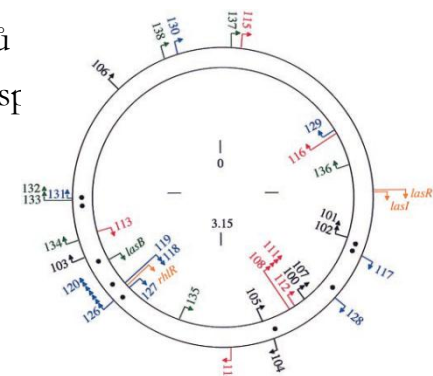
- Nejvíce používané jsou deriváty Mu fága
- Široké spektrum hostitele u G- bakterií (*Erwinia*, *Citrobacter*, *E.coli*)
- Mud(Amp^r, lac) derivát – je odstraněna většina genů s výjimkou konců fága a genu pro transponázu, lacZ je bez promotoru
- Po inserci ve správné orientaci downstream k promotoru – dochází k aktivaci reportérového genu.



Vytváření genových fúzí – nespecifická mutagenese



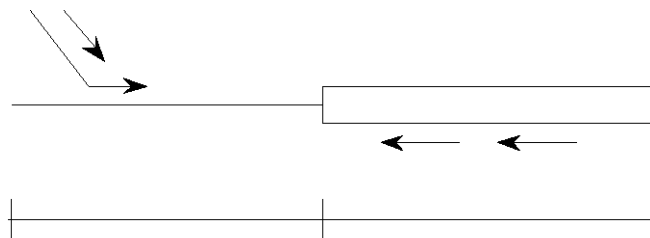
- Př. 2: identifikace genů pro Quorum sensing u *P. aeruginosa*
 - Identification of genes controlled by quorum sensing in *P. aeruginosa*. Marvin Whiteley, PNAS (1999) vol. 96 pp.: 13904–13909
 - Hledání genů aktivovaných v přítomnosti acyl-homoserin laktonů
 - Nespecifická inserční mutagenese WT kmene *P. aeruginosa*
 - Použitý transposon – Tn5-B22 nesoucí *lacZ* gen bez promotoru
 - Doprava transposonu – konjugací *E. coli* S17 s plasmidem s transpozonom s kmenem *P. aeruginosa* a následná selekce s HgCl₂, gentamicin, tetracyklin
 - Screening transkonjugant s insercí transposonu na komplexních půdách s X-gal.
 - Screening 7 000 mutant v mikrotitračních destičkách, měřena aktivita β –galaktozidázy
 - po a bez přidání acyl-homoserin laktonů luminiscenční metodou
 - Při zvýšení transkripce 5x – laktony indukovaný gen – 70 klonů
 - Isolace mutant a opětovná kontrola, napěstování submerzně v baňce – 47 klonů
 - Lokalizace mutace - sekvenací pomocí arbitrari PCR – sekvence přilehlé k transp



Identifikace míst inserce pomocí PCR

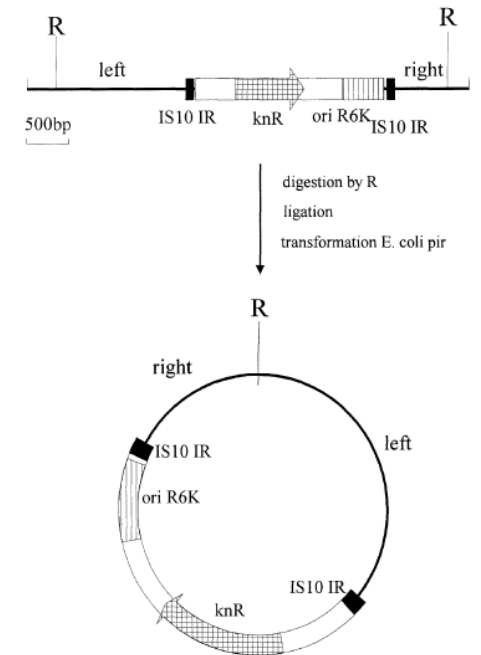
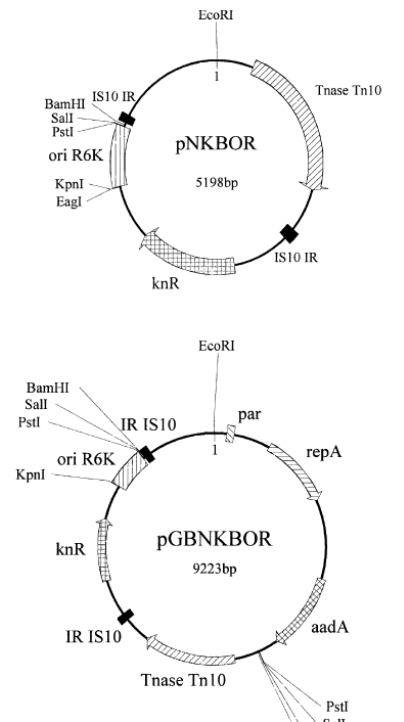
Dvoukolové PCR.

- Specifický primer z transposonu a náhodný primer se specifickou sekvencí na konci (Tn5 Ext, 5'-GAACGTTACCATGTTAGGAGGTC-3') a arbitrary primer 1 (ARB1, 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNGATAT-3')
 - Podmínky reakce jsou MgSO₄ (1 mM), Vent, exo -DNA polymerase (2 U) with 5 μl bakteriální kultury rostlé v LB přes noc jako zdroj DNA. Nasedací teplota 6 x 30 °C a 30 x 45 °C
- Druhé kolo s 5 μl předchozí PCR reakce s primery: ARB2 (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3') and Tn5 Int (5'-CGGGAAAGGTTCCGTTTCAGGACGC-3').
 - Nasedací teplota 30 x 45
- PCR produkt se po přečištění sekvenuje z Tn5 Int primeru



□ Další možnosti rychlé lokalizace inserce transpozonu

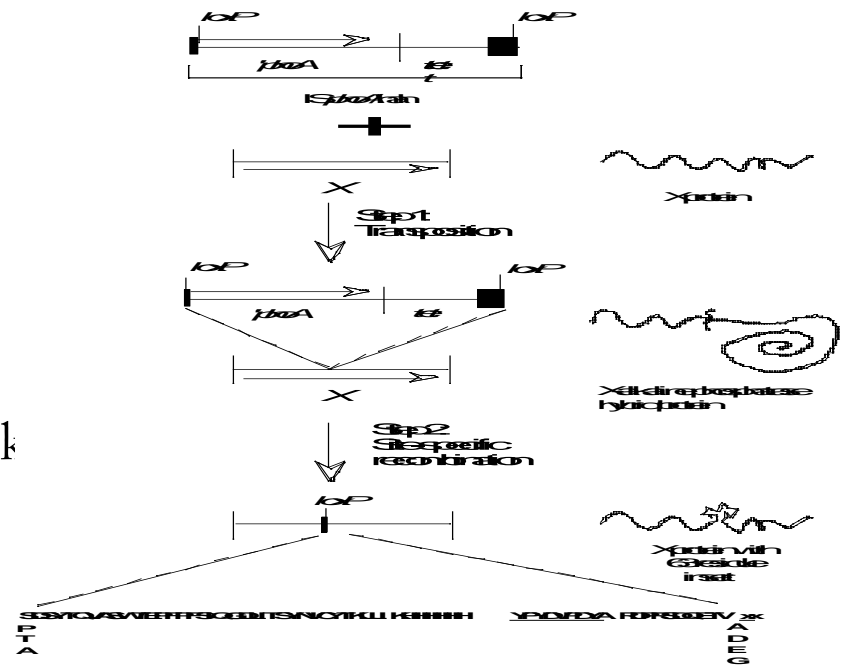
- Vektor s ori R6K v transpozonu
- Restrikce hostitelského chromozomu a self ligace
 - Generování plazmidů s cílovou sekvencí
 - Michèle Rossignol. Res. Microbiol. 152 (2001) 481–485



Značení proteinů

vytváření inzerčních tagů do proteinů

- Dvoustupňový krok *loxP*
- Detekce proteinů pomocí protilátky
- Podmínky užití stejné jako v předchozím, záleží na místě inserce, zda dojde nebo nedojde k změně aktivity proteinu
- Signature-tagged mutagenesis (Genetic analysis of bacterial virulence. Chiang et al, Annu. Rev. Microbiol. 53, 129 (1999))



Vytváření genových fúzí – specifická mutageneze

- Studium jednotlivých genů nebo operonů
 - Integračních vektorů – určité geny, specifické inserce
 - Takový plazmid, který se v mutovaném hostiteli nereplikuje
 - Rekombinace na základě sekvenční homologie
 - Fúze proteinů nebo promotorů (integrace do „nepotřebných genů“)

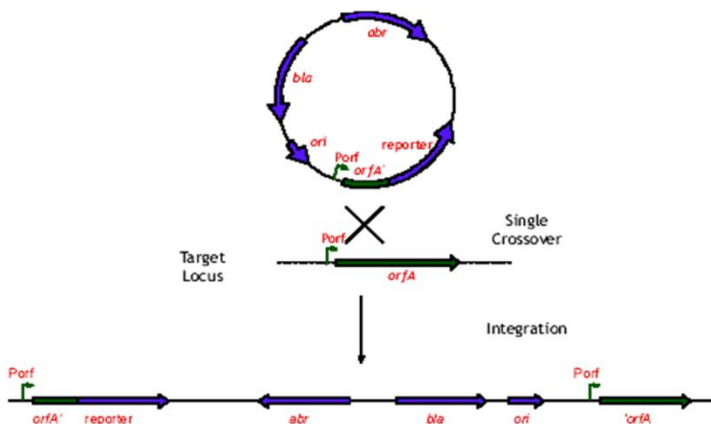


Figure 2. Use of an integration vector to construct a reporter gene fusion under the control of the promoter of a hypothetical open reading frame, *orfA*.

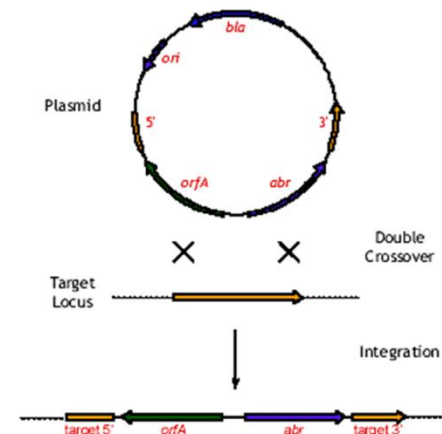


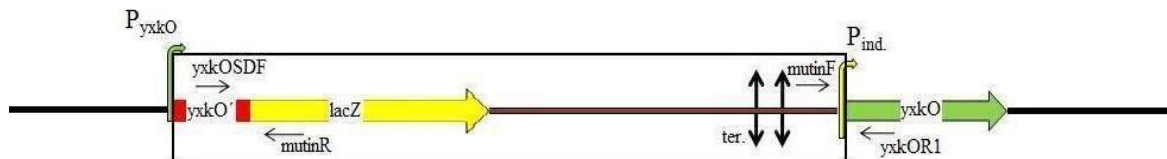
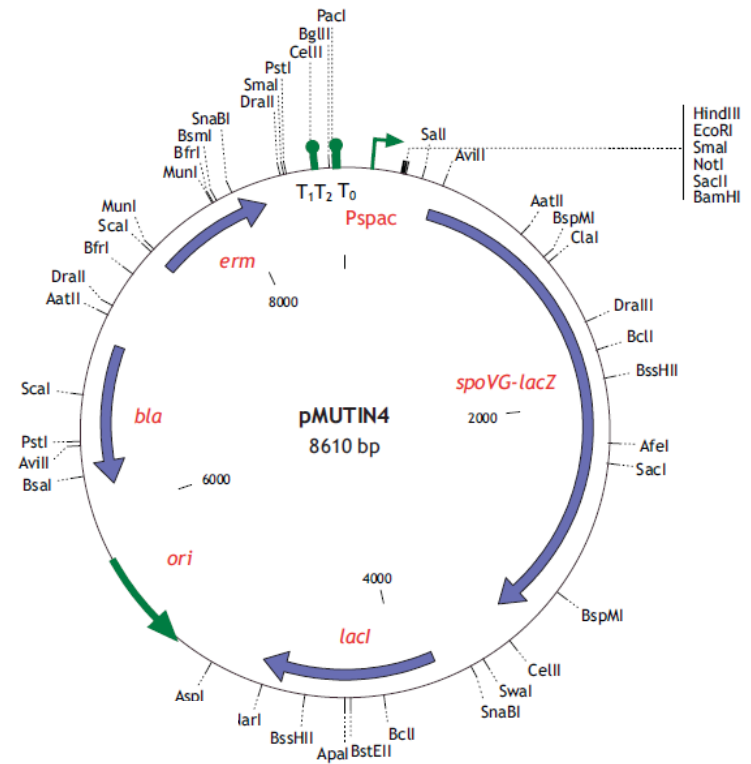
Figure 3. Use of an ectopic integration vector to insert a hypothetical open reading frame, *orfA*, into a target locus on the chromosome, such as the *B. subtilis amyE* gene.

Integrační vektory

□ Mutin4

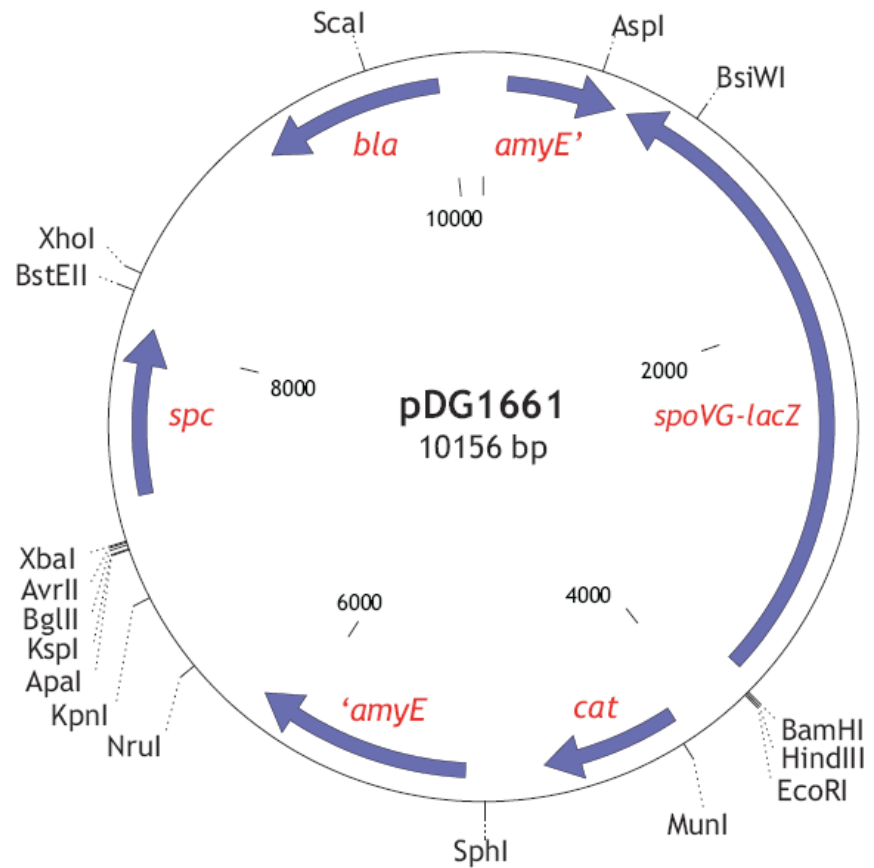
□ Využití integrativního vektoru pMutin4, který umožňuje :

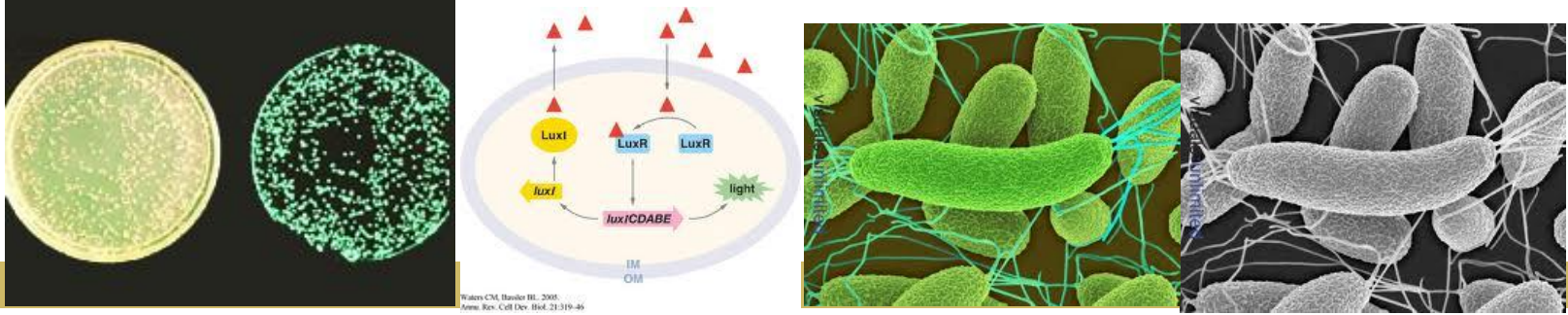
- knockout genu
- sledování transkripční aktivity
- komplementaci



Integrační vektory

- Lac-Z
 - ▣ Promoter probe
 - ▣ Umístění do amy lokusu



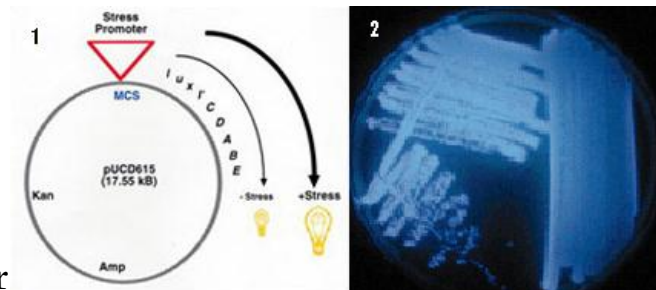


- Construction of a Tn7-*lux* system for gene expression studies in Gram-negative bacteria
Gene, [Volume 122, Issue 1](#), 1 December 1992, Pages 27–34

- Tn7-*lux* systém pro studie genové exprese v G- bakteriích

- Plazmidy pHSK728 a pHSK729

- *Vibrio fischeri lux* operon jako reportérový systém
 - MCS upstream k reportéru
 - Terminační sekvence
 - Spektinomycinová rezistence jako selekční marker
 - TN7 krajní sekvence ohraničující předchozí

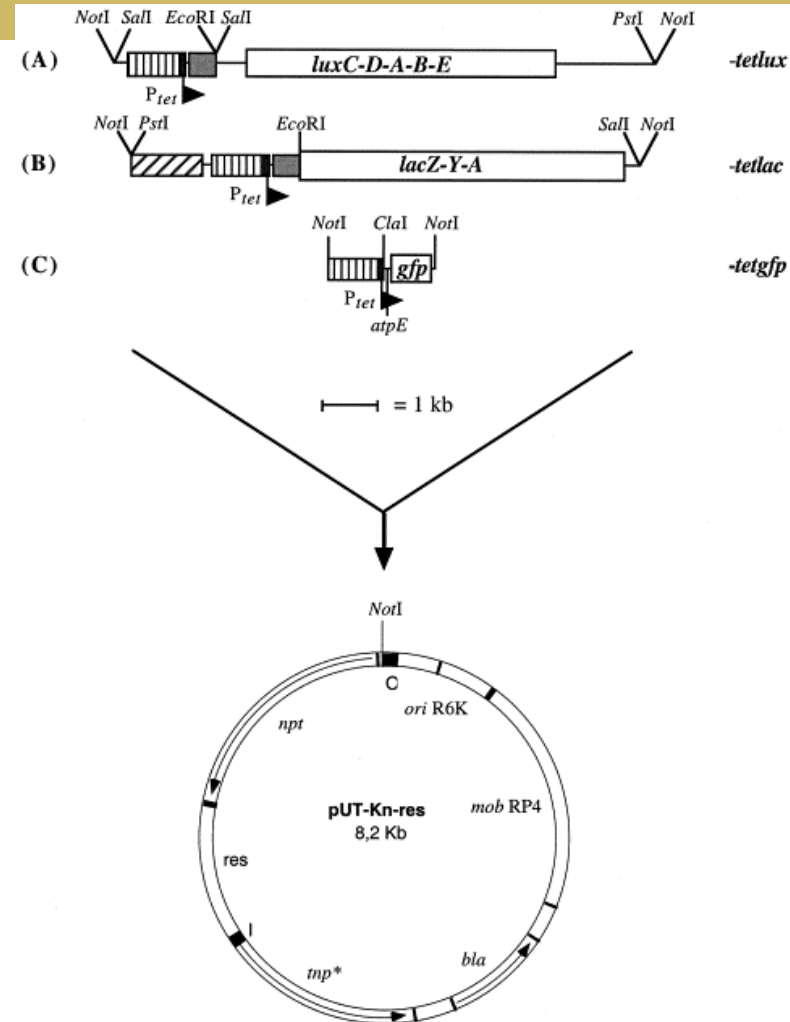


- Kontrola systému

- *lac* operon v *E. coli* *avr* operon v *Pseudomonas syringe* , *palE* gen v *Erwinia chrysanthemi*
 - Hybridizace genomů po transpozici – jedna inzerce v jednom genomu
 - Žádná exprese reportéru – nesvítí v bohatém, komplexním mediu
 - Silná exprese pokud bakterie rostly v rostlinné tkáni.

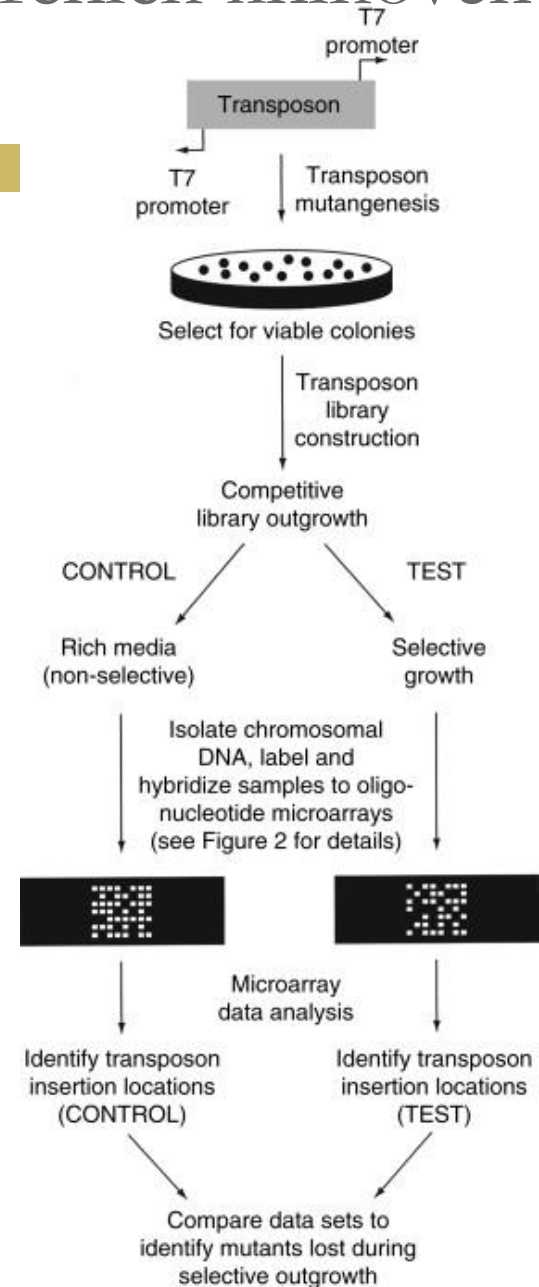
Další použití reportérových genů - biosensory

- Detekce a kvantifikace tetracyklinu celobuněčnými sensory
 - Tři plazmidy s mini-Tn5
 - Regulační gen pro tetR v operonové fúzi s reportérovým genem (*lacZ*, *luxCDABE*, *gfp*)
 - V přítomnosti tetracyklinu – aktivace reportéru (např. mléko)
 - Citlivý k nízkým koncentracím ATB
 - Pro G- bakterie – přenos konjugací



Fenotypové testování Tn5 inserčních knihoven u *E. coli* metodou microarrays

- Srovnávací studie – identifikace esenciálních genů za nonpermissivních podmínek.
 - Witenberg, *Applied. Environ. Microbiol.* 2005,71(1), 451-459
 - Transpozon má 2 T7 promotory směřující ven z transpozonu
 - V kolekci mutant se aktivuje RNA
 - Provede se microarrays
 - Srovnají se různé podmínky kultivace
- Chybějící mutanty jsou esenciální



Protein - proteinové interakce

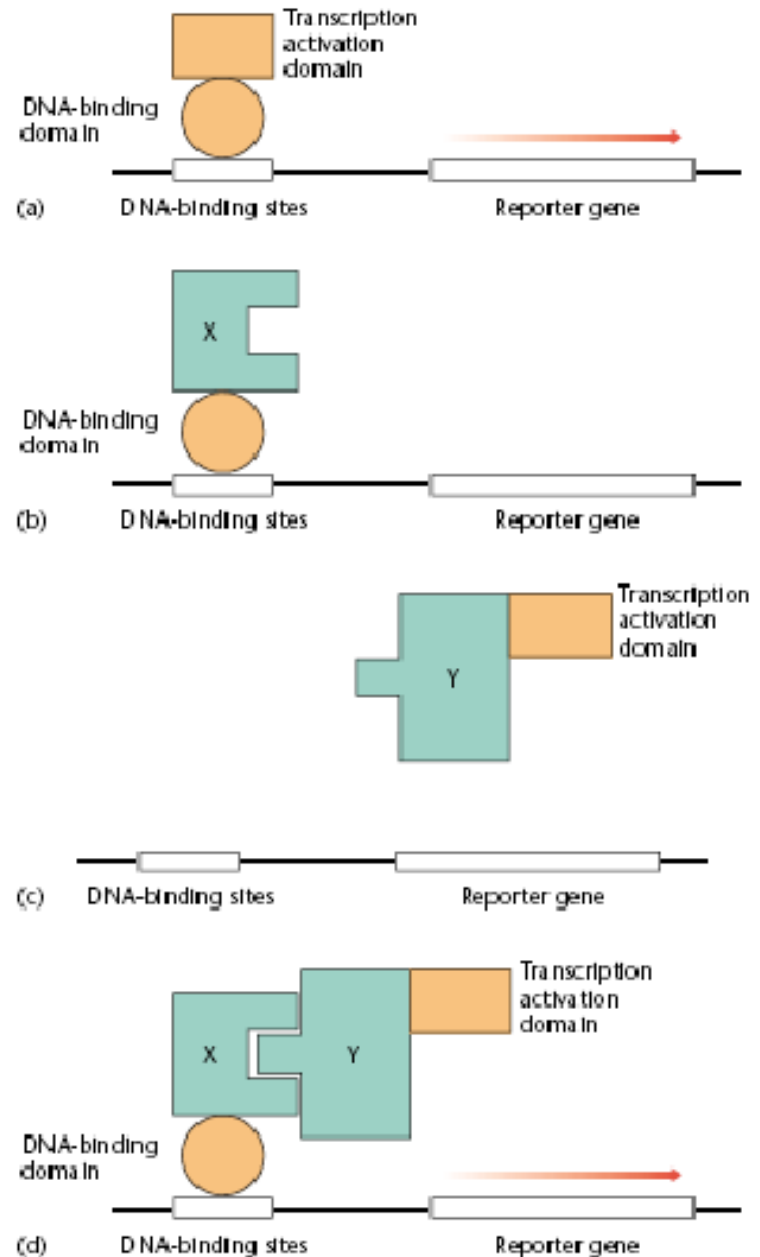
- two hybrid system –
 - ▣ založené na známých regulačních procesech
 - ▣ transkripce reportérového genu po interakci hybridních transkripčních regulátorů
- imunoprecipitace -
 - ▣ detekce interagujících proteinů a proteinových komplexů protilátkovou afinitní chromatografií studovaného proteinu
- kopurifikační metody -
 - ▣ zachycení komplexů se studovaným proteinem pomocí tagování proteinu a jeho uchycení na nosiči – Ni-NTA resins

Two hybrid systems

- studování všech tří typů interakcí
 - ▣ protein – protein
 - ▣ protein – DNA
 - ▣ protein – RNA
- 1. systém 1989 Fields and Song – Nature 340, 245
 - ▣ kvasinkový systém – *Sacharomyces cerevisisae*
 - ▣ transkripční regulátor s DNA vazebnou doménou (Gal4) – při fúzi ze studovaným (X) se váže na DNA, ale nespouští transkripci
 - ▣ transkripce se spouští interakcí hybridního proteinu - z aktivačního proteinu (bez DNA vazebné domény s vazebnou doménou na Gal4) a hledaným proteinem Y - hledaný transkripční regulátor –
 - realizováno knihovnou (cDNA, restrikce chDNA)
 - selekce na reportérový gen

Two hybrid systems – princip metody

- transkripční regulátor s DNA vazebnou doménou
- Transkripční regulátor fúzovaný s X proteinem
- Transkripční aktivátor fúzovaný s Y proteinem
- Inicuje transkripcie reportérového genu.



Two hybrid systems

□ **Výhody**

- proteiny Y a X mohou být vybrány z různých organismů, z různých kompartmentů
- Y a X nejsou velikostně limitovány
- metoda je velice citlivá – interakce s afinitou $10 \mu\text{mol L}^{-1}$

□ **Limitace**

- membránové proteiny nefoldující mimo membránu
- interakce závisující na postranslační modifikaci neprobíhající v kvasinkách – fosforylace
- interakce závislé na N-terminální doméně X a Y
- interakce proteinů X a Y s kvasinkovými proteiny
- jistá velikostní limitace v interagujících doménách

Two hybrid systems

- Nekvasinkové systémy –
 - modifikace – rozšíření použití
 - savčí buňky – není příliš potřeba
 - bakterie – rozšíření na další typy interakcí
 - dimerizace, kooperativní vazba prokaryotních transkripčních regulátorů
- Reversní analýza -
 - reportérový gen toxický pro kvasinkovou buňku při definovaných podmínkách – *URA3* a 5 flouroorotic acid
 - procesy znemožňující interakci X a Y proteinu
 - Vidal et al., 1996, PNAS 93, 10315

Two hybrid systems - reverzní analýza

□ split-hybrid method -

■ *E. coli* a *TetR* represor jako reportér

- po vazbě inhibuje expresi *His3* obsahující *TetR* vazebnou doménu
- mutace způsobující rozrušení interakce snižují úroveň exprese *TetR* represoru – zvyšování transkripce *His3* – možnost selekce na mediích bez histidinu.
- Shih *et al.* 1996, PNAS, **93**, 13896.

Two hybrid systems

- Differential screening
 - regulační protein se často váže na několik dalších proteinů
 - systém umožňující studium mutací ovlivňující rozlišit vazbu na dva proteiny
 - použití dvou různých hybridních DNA vazebných domén
 - Inouyen et al. 1997, Genetics, 147, 479.
 - Hybridní s Gal4 (X1) a LexA (X2) regulující dva různé reportéry (Ura3 a lacZ) v jednom kmeni
 - Y se váže jak na X1 tak na X2
 - v přítomnosti aktivační domény pro X1 i X2 – Ura⁺ LacZ⁺
 - mutanty Y nevážající se k X1 – Ura⁻, LacZ⁺

Two hybrid systems

- modifikující a přemost'ující proteiny
 - interakce závisující na postranslačních modifikacích
 - koexprese třetího proteinu zprostředkující interakci nebo modifikaci
 - koexprese proteinových kinás
 - Osborne et al. 1995, Bio/Technology 13,1474
 - interakce zprostředkovaná malými ligandy
 - Chiu et al. 1994, PNAS, 91, 4604

One hybrid systems

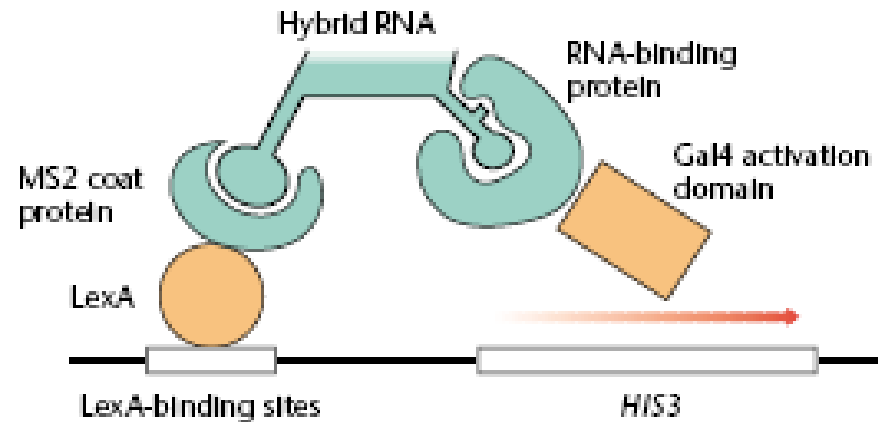
- DNA – protein interakce
- hledání DNA vazebných proteinů regulující aktivaci transkripce jednoho či více genů
 - DNA element zkrácený na nejmenší možnou funkční velikost a insertován před reportérový gen
 - His3, lacZ
 - integrace do kvasinkového chromosomu nebo a plasmidu
 - kmen transformován knihovnou plasmidů s proteiny fúsovaných z aktivační doménou
 - exprese této domény s DNA elementem – His⁺, Lac⁺
 - negativní kontrola na přítomnost transkripčního regulátoru v hostitelské organismu
 - nespecifické vazebné proteiny – druhý reportér s mutacemi ve vazebném místě – diferenzní rozlišení false positive
 - Wang and Reed 1993, Nature, 364, 121

RNA Three-hybrid system

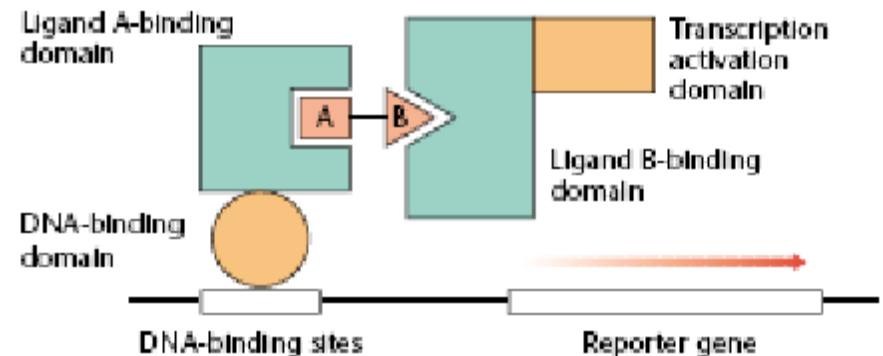
- RNA - protein interakce
 - RNA splicing, translation, životní cyklus RNA virů
- hybridní molekula RNA tvoří most mezi dvouhybridním systémem dvou proteinů
 - jeden protein má RNA vazebné místo fúzované k DNA vazebné doméně (LexA)
 - druhý vazebný protein má druhé RNA vazebné místo a transkripční aktivační doménu (Gal4)
 - hybridní RNA má rozpoznávací místo pro dvě RNA vazebné domény
 - (X - MS2 a Y - RNA vazebný protein)
 - spojuje tři komponenty dohromady ke stimulaci transkripce
 - izolace proteinů vážící se na specifické RNA elementy
 - izolace RNA ligandů interagující se specifickými RNA vazebnými proteiny

RNA Three-hybrid system

- RNA – tříhybridní systém



- Ligand – tříhybridní systém



Regulace transkripce

- **Regulace na transkripční úrovni -**
 - iniciace transkripce na promotoru - RNA polymerasa
 - regulace prostřednictvím proteinů – regulační proteiny
 - usnadňují či brání vazbě RNA polymerasy na promotor
- **negativní**
 - transkripce regulována represorem – váže se na operátor (specifická sekvence)
 - brání vazbě RNA polymerasa – promotor
 - zabraňuje RNA polymerase iniciovat transkripci
 - represor drží RNAP na začátku
- **pozitivní**
 - iniciace transkripce je kontrolována aktivátorem – nezbytný pro iniciaci transkripce
 - zvýšení vazby RNAP na promotor
 - umožňuje posunutí RNAP na začátek transkripce

Regulace transkripce

Genetická evidence negativní a pozitivní regulace

- mutanty v regulačních genech operonů se chovají rozdílně
- negativní regulace – mutace v regulačním genu
 - konstitutivní transkripce
 - transkripce operonu i v nepřítomnosti induktoru
- pozitivní regulace – mutace inaktivující aktivátor
 - konstitutivní deprivace
 - inhibice transkripce genů operonu i v přítomnosti induktoru

Genetická evidence negativní a pozitivní regulace

- **konstitutivní mutant** – mutant u něhož jsou geny operonu transkribovány vždy
 - negativní regulace – častější –
 - jakákoliv mutace, která inaktivuje represor nebo jeho vazbu na operátor
 - pozitivní regulace – málo časté -
 - mutace, která mění pouze vazbu induktoru, vazba na promotor musí být zachována

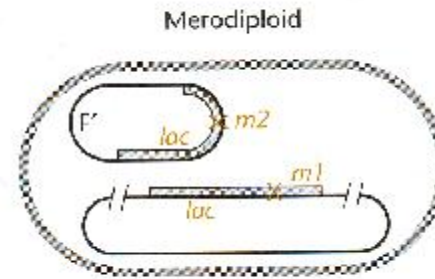
Chování v komplementačních testech

- negativně regulované konstitutivní mutanty -
 - recesivní k WT – regulační WT protein se váže na operátor mutanta – trans acting
- pozitivně regulované konstitutivní mutanty
 - dominantní k WT – u mutantního aktivátoru je zachována vazba na promotor -
- pozitivně regulované depriváční mutanty -
 - recesivní k WT -

Negativní regulace

- *E. coli lac* operon – první a klasický případ
- Francois Jacob Jacques Monod – 1950 – krátce po objevení struktury DNA a objevení mRNA
- 1965 – oceněno Nobelovou cenou
- stále slouží jako srovnávací studie
- tehdejší znalosti – enzym laktozového metabolismu je inducibilní v přítomnosti laktózy
- **první krok** –
 - izolace řady mutant defektních v metabolismu laktózy
 - rozdělení do dvou skupin
 - mutanty neschopné růst s laktózou jako jediným zdrojem C - Lac⁻
 - mutanty produkující enzym na utilizci laktózy i v její nepřítomnosti – konstitutivní mutanty
- **druhý krok** –
 - komplementační studie trans a cis působících mutací

Genetická analýza *lac* operonu



Phenotype	Interpretation
1. Lac ⁻	Complementation; <i>m1</i> and <i>m2</i> are in different genes
2. Lac ⁻	No complementation; <i>m1</i> and <i>m2</i> are in the same gene

- komplementační pokusy s *lac* mutanty –
 - F' s WT *lac* alelou vpravený do jednotlivých mutant
 - selekce podle typu použitých mutant
- dominance x recesivita -
 - recesivní mutace -
 - parciální diploidi Lac – vytvářejí kolonie na laktoze
 - dominantní mutace –
 - nevytvářejí kolonie za stejných podmínek
- většina mutací byla recesivních -
 - inaktivace genů potřebných k utilizaci laktózy
 - strukturní geny
- počet strukturních genů v operonu
 - komplementace dvou recesivních mutant – párová
 - F' s alelou jednoho mutantu vpraven do druhého
 - Lac plus – různé geny (komplementční skupiny)
 - Lac⁻ - stejné geny (komplementční skupiny)
 - Jacob Monod – dvě skupiny – *lacZ* a *lacY*

- lacI - čtyři možnosti mutací
 - lacI - inaktivace represoru při vazbě na operátor, tvorba tetrameru,
 - konstitutivní, recesivní
 - lacI^d - inaktivace operátor vazebného místa bez ovlivnění tetramerizace
 - konstitutivní, dominantní - nejde komplementovat - vždy nefunkční tetramer
 - lacI^s - zabraňuje vazbu induktoru na represor –
 - permanentní represe i v přítomnosti induktoru
 - dominantní
 - lacI^{rc} - konformační změny způsobující vazbu na operátor v přítomnosti induktoru –
 - represe v přítomnosti induktoru - reversní účinek
 - dominantn

□ konstitutivní mutace v *lac* operonu

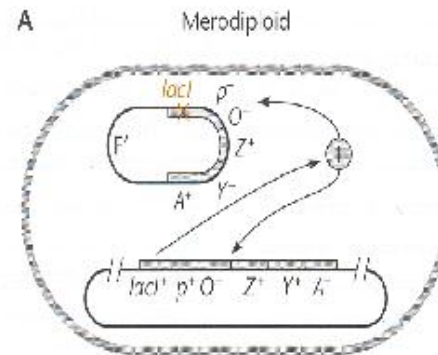
■ vzácné konstitutivní mutanty

-

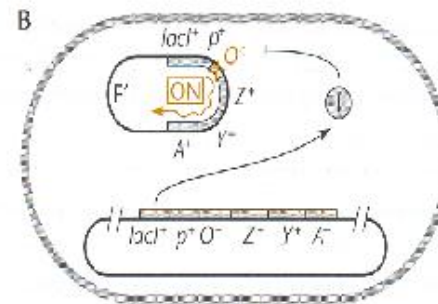
- *lac⁻* i v přítomnosti WT alely celého operonu –
- nazvané *lacO^c* - mutace v operonu bránící vazbu LacI na promotor – cis acting

■ trans dominantní mutace –

- *lacI^d* konstitutivní v expresi i v přítomnosti WT alely *lacI* – mutace v samotném proteinu zabraňující vytvoření tetrameru

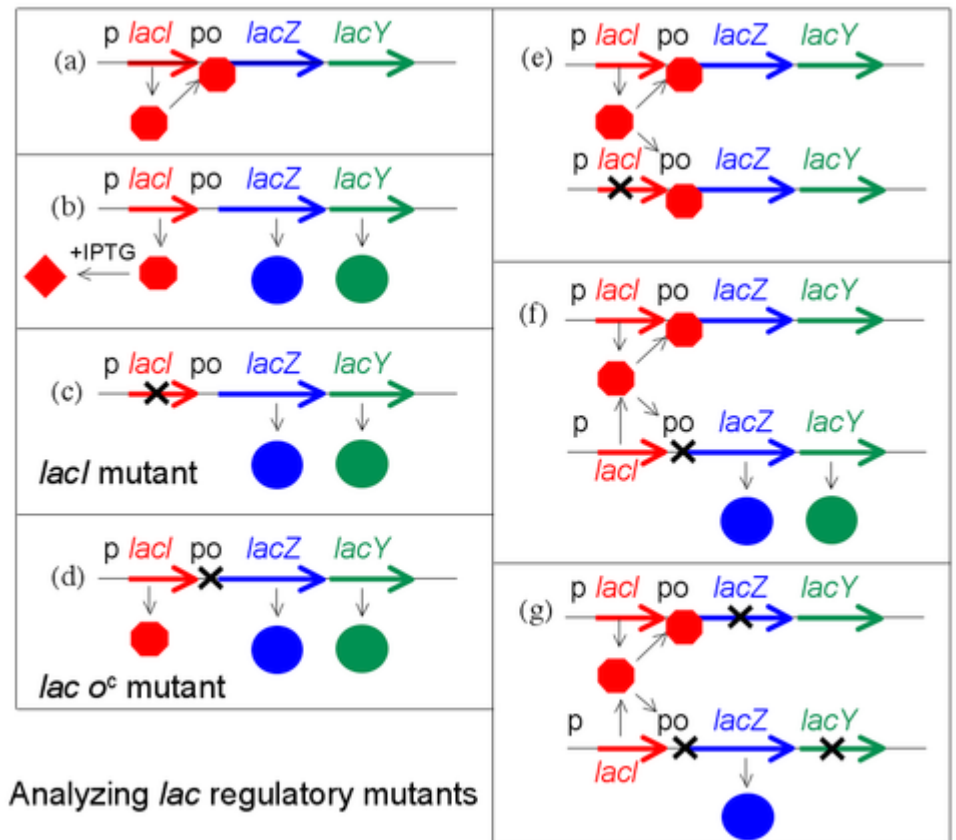


Phenotype	Interpretation
Lac ⁺ inducible	<i>lacI</i> is recessive

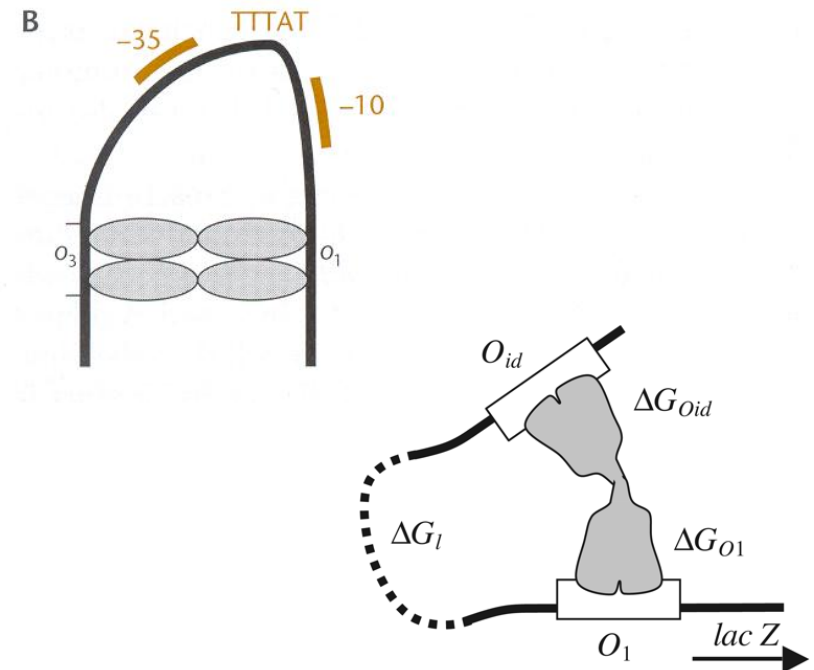
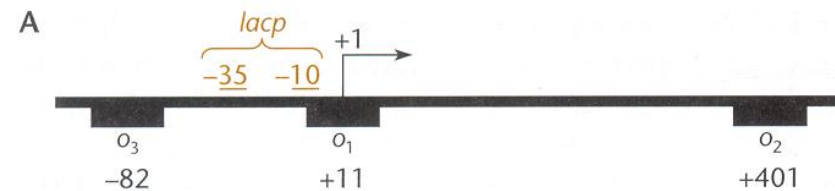
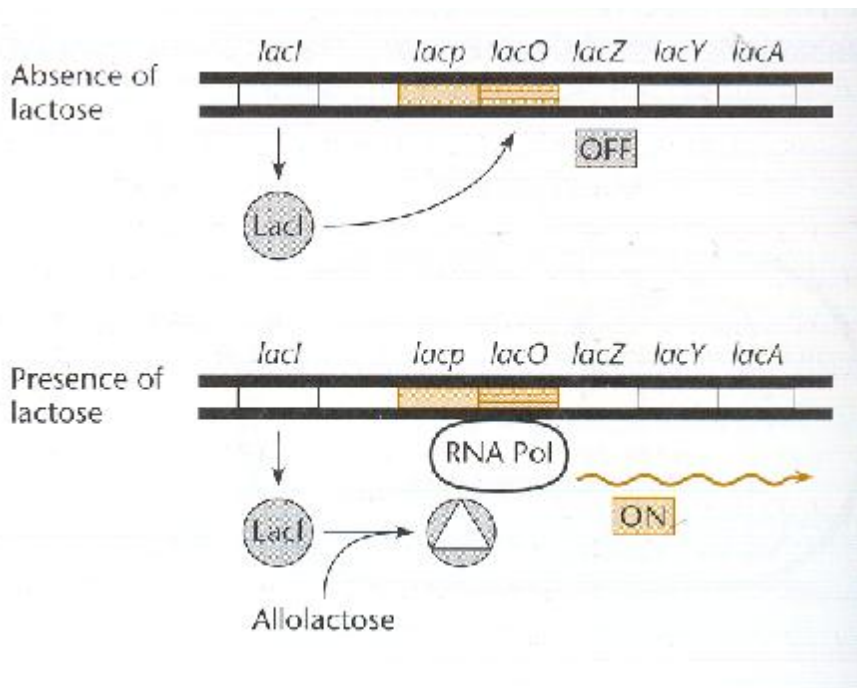


Lac constitutive	<i>lacO^c</i> is dominant and cis acting
------------------	--

□ regulace

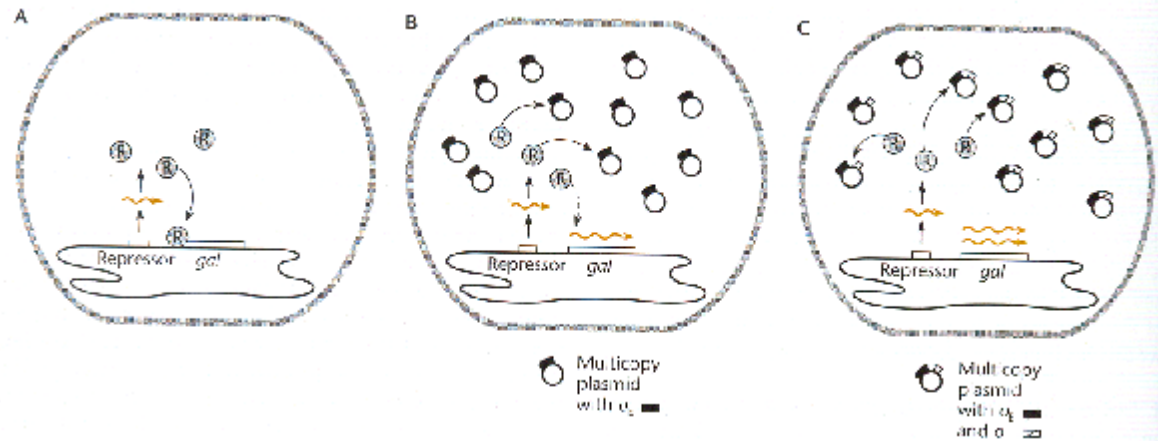


□ vytvořen model – platný dodnes



- V nepřítomnosti represoru 1 000 x efektivnější transkripce
- induktor allolaktosa –
- IPTG -isopropyl- β -D-thiogalaktosid – není metabolisován
- LacI se váže na tři místa operátoru o^1 , o^2 , o^3
- o^1 – nejdůležitější
- delece o^2 a o^3 snižuje efektivitu transkripce 50 x
- represor se váže zároveň na dva operátory ve formě homotetrameru
- zároveň regulován katabolickou represí – reprimace v přítomnosti glukosy –
- CAP protein (catabolite activator protein) a cAMP- vazebné místo v blízkosti o^1
- LacI represor – používán jako represor i v jiných bakteriích
- je velmi stabilní
- LacP – používán v mnoha expresních vektorech – řízená exprese
- mutace UV5 ztráta sensitivity ke glukosě

Genetický důkaz gal operonu



- důkaz, že mutace v *o₁* (uvnitř strukturního genu *galE*) je mutace v operátoru
 - ▣ průkaz schopnosti vázat GalR
 - DNA obsahující *galE* je naklonována do multikopiového plasmidu
 - transformována do buněk pak tyto buňky obsahují mnoho kopií *galE* genu
 - pokud je operátorové místo – vyváží se všechny molekuly galR – nereprimuje se transkripce – konstitutivní transkripce
 - titrace – metoda, kdy se syntetizuje operon neboť je operon „osvobozen „ od vlivu represoru (escaping synthesis)
 - v gal operonu pouze částečně konstitutivní mutanty
 - ještě jeden operátor – obě oblasti na jednom plasmidu
 - záleží na vzdálenosti