

Osnova

3. Přednáška

Buněčný cyklus

Párování haploidních buněk

Regulace transkripce

Přepínání párovacího typu

4. Přednáška

Regulace transkripce

Promotory










Transkripční faktory

Gal4p

Hybridní systémy

Regulace transkripce

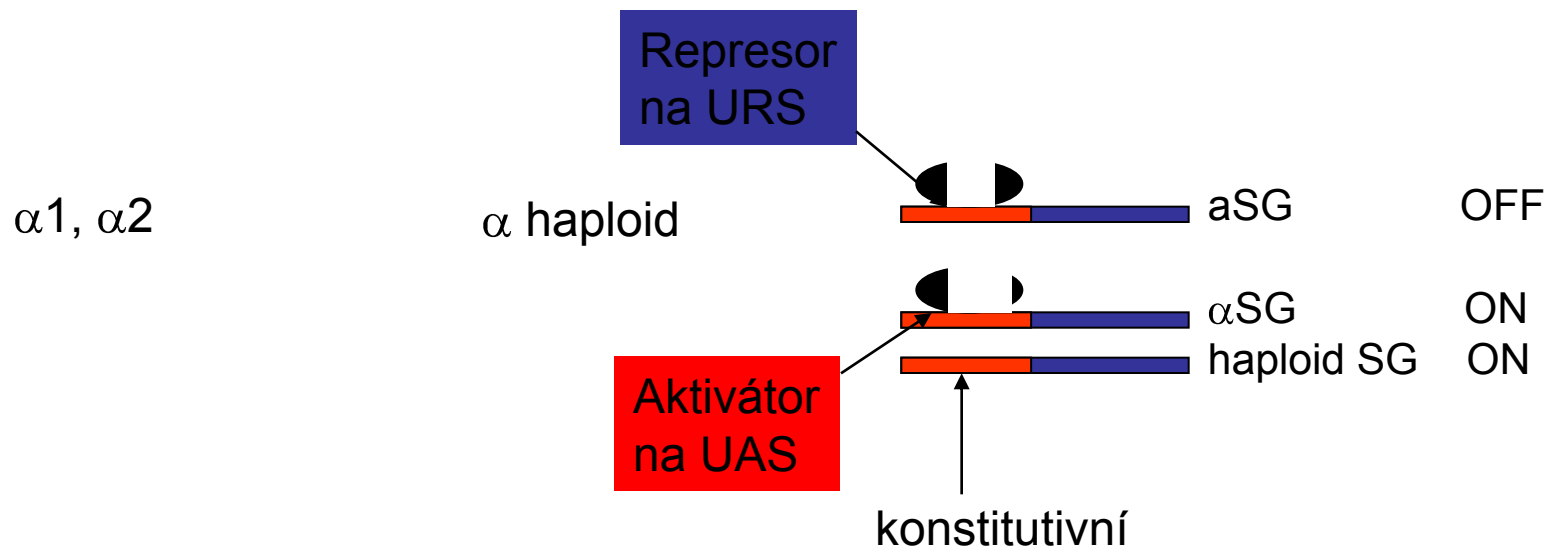
- vnitřní metabolismus např. transkripce genů důležitých pro jednotlivé fáze buněčného cyklu
- signální dráhy regulují transkripci specifických „genových souborů“ (aktivace haploid specifických genů)
- reakce na vnější vlivy např. využití galaktózy jako zdroje uhlíku v nepřítomnosti glukózy (historicky + GAL1 promotor je velmi silný)

MAT lokus	Typ buňky	Geny kontrolované MAT lokusem
a1, a2	a haploid	 aSG ON
		 α SG OFF
		 haploid SG ON
α 1, α 2	α haploid	 aSG OFF
		 α SG ON
		 haploid SG ON
α 1, α 2 a1, a2	diploid	 aSG OFF
		 α SG OFF
		 haploid SG OFF

Struktura promotorů

Kvasinkové promotory se liší od bakteriálních a vyšších eukaryot (kvasinky netranskribují z takových promotorů)

- Většina míst pro iniciaci transkripce obsahuje TC(G/A)A a PuPuPyPuPu (specifické pro kvasinky)
- TATA box (TATAT/AAT/A) je 60-120bp od iniciačního místa (podobné Pribnowovu boxu u bakterií)
- UAS (upstream activating sequences) a URS (upstream repressing sequences)
- DAS (downstream activating sequences – přímo v sekvenci genu)



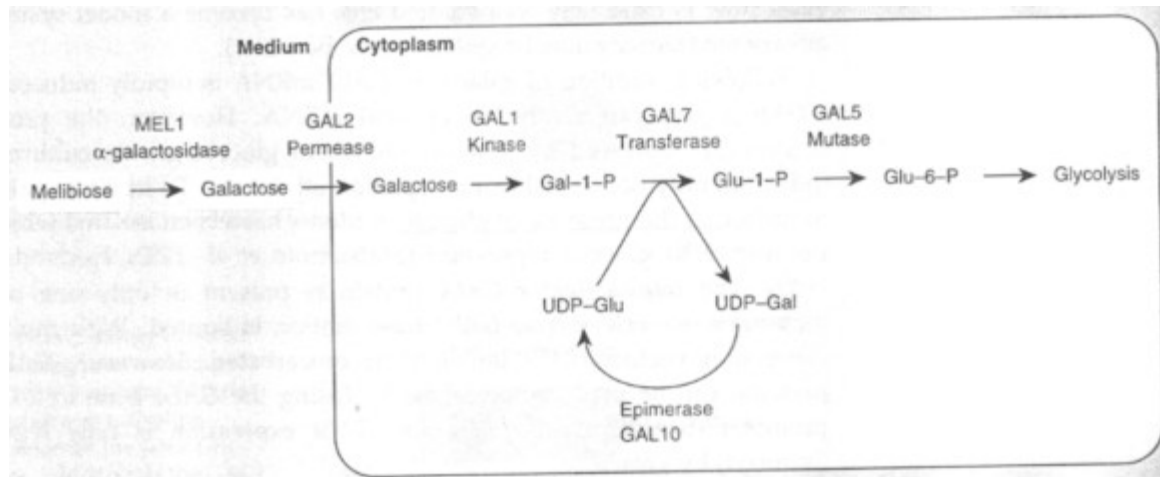
Fosfoglycerat kinasa (*PGK*)
Galaktokinasa (*GAL1*)

Kyselá fosfatasa (*PHOS*)
Alkohol dehydrogenasa I (*ADH1*)
Alkohol dehydrogenasa II (*ADH2*)
Cu metalothionein (*CUP1*)
Metionin (*MET1*)

20x indukován glukózou
1000x indukován galaktózou, ale reprimován glukózou
200x reprimován anorg. fosfátem
konstitutivní
100x reprimován glukózou
20x indukován mědí
reprimován metioninem

Promoter	Regulation/ Relative Protein Expression Level	Signal Strength on Western blot ^b
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>ADH1</i> (410 bp+) ^c	Constitutive/medium	++
<i>ADH1</i> (410 bp)	Constitutive/low	+/- (weak)
	Constitutive/ very low	(not detectable)
<i>ADH1</i> (700 bp)	Constitutive/high	+++
<i>GAL1</i> (full-length)	Repressed by glucose; induced (high-level) by galactose	(not detectable) ^d +++ ^d
<i>GAL1</i> (minimal)	Not regulated by glucose or galactose	(no data)

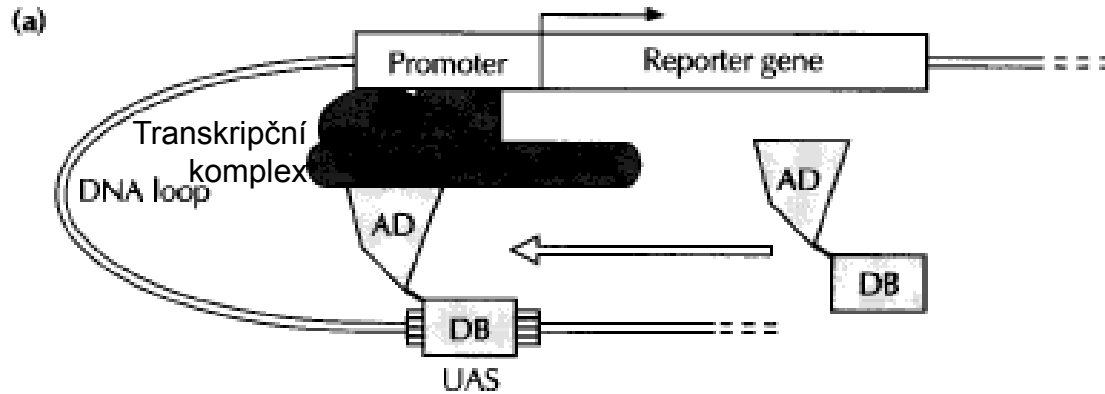
Regulace metabolické dráhy galaktózy



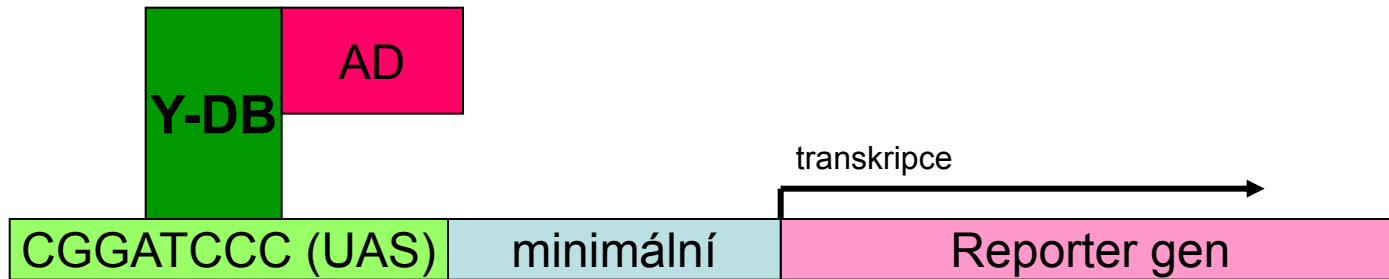
- Pouze *GAL5* gen je konstitutivně exprimován (potřebný pro metabolismus glukózy)
- všechny ostatní jsou indukovány růstem na galaktóze a reprimovány glukózou
- *GAL1*, *GAL7* a *GAL10* geny jsou v klastru na chromosomu 2
- *GAL4* gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS těchto genů
- Gal80p se váže na Gal4p a reprimuje/inhibuje transkripci
- Gal3p přemění galaktozu na induktor (váže se na Gal80p a blokuje vazbu na Gal4p)

- *GAL1* promotor je rychle indukovaný a velmi silný – 1000x se zvýší mRNA (až 1%)
- používá se pro overexpresi

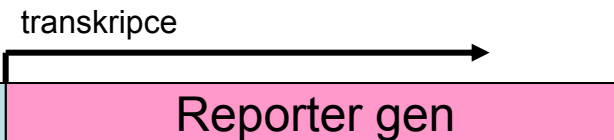
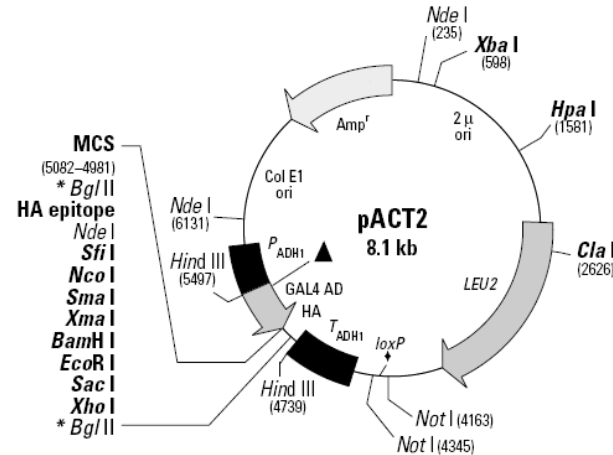
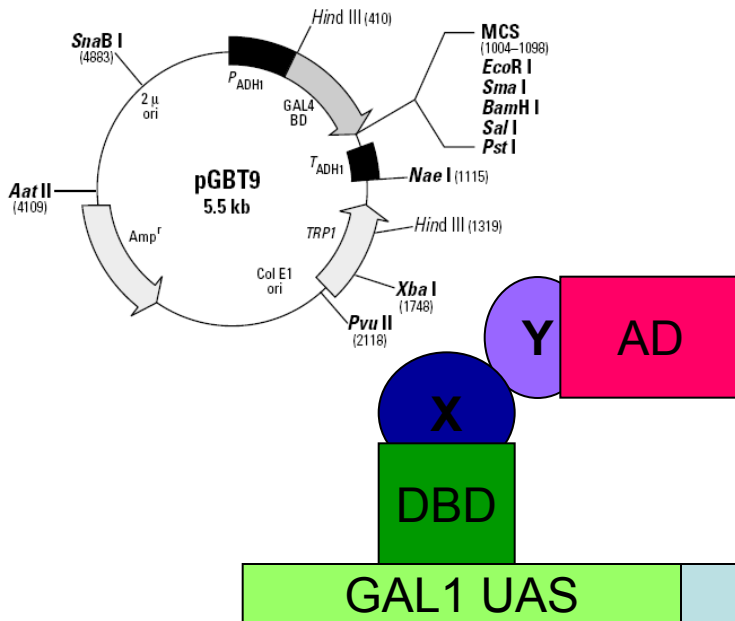
Transkripční aktivátor Gal4p



Vznik 1- a 2-hybridních systémů



- Takto funguje např. i FASAY (**F**unctional **A**nalysis of **S**eparated **A**lleles in **Y**east) pro testování mutantních p53 (transkripční faktor)



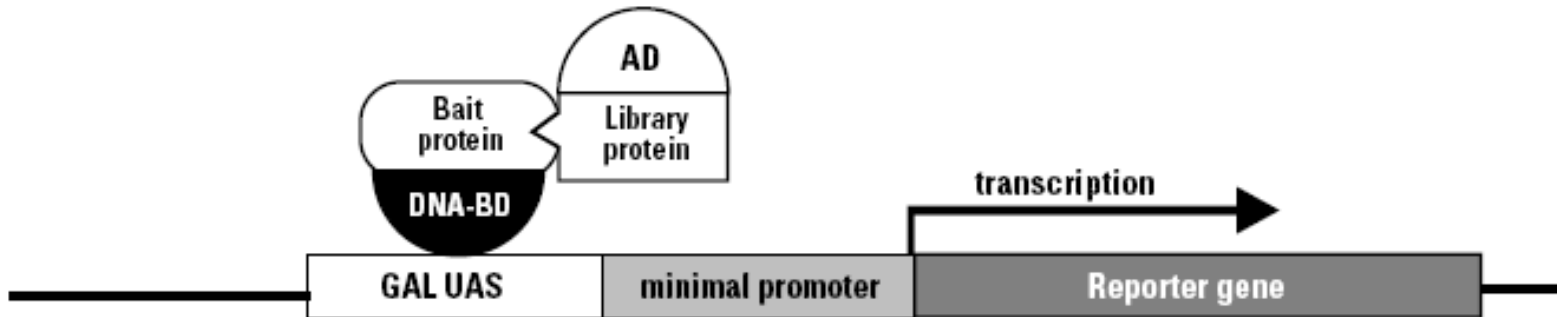
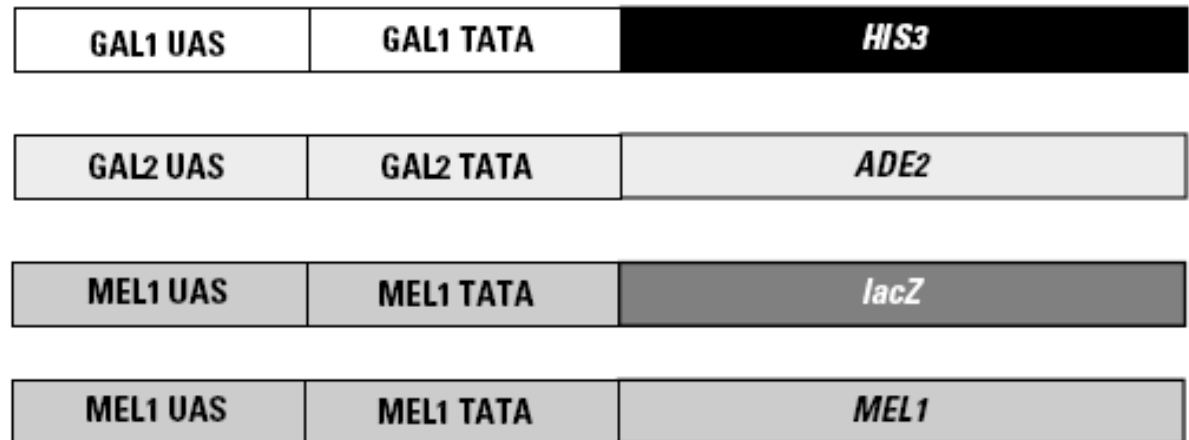


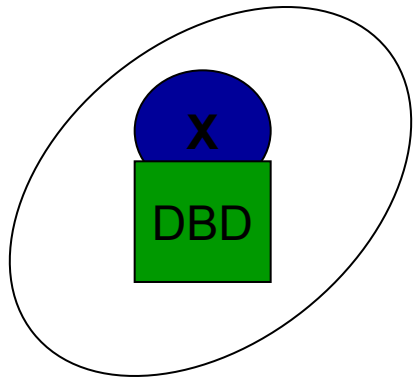
Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

AH109

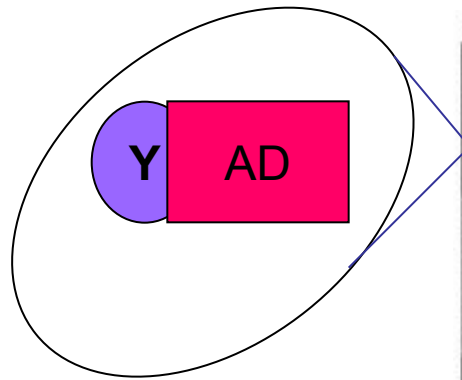
MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200,
gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,
GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,
URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ



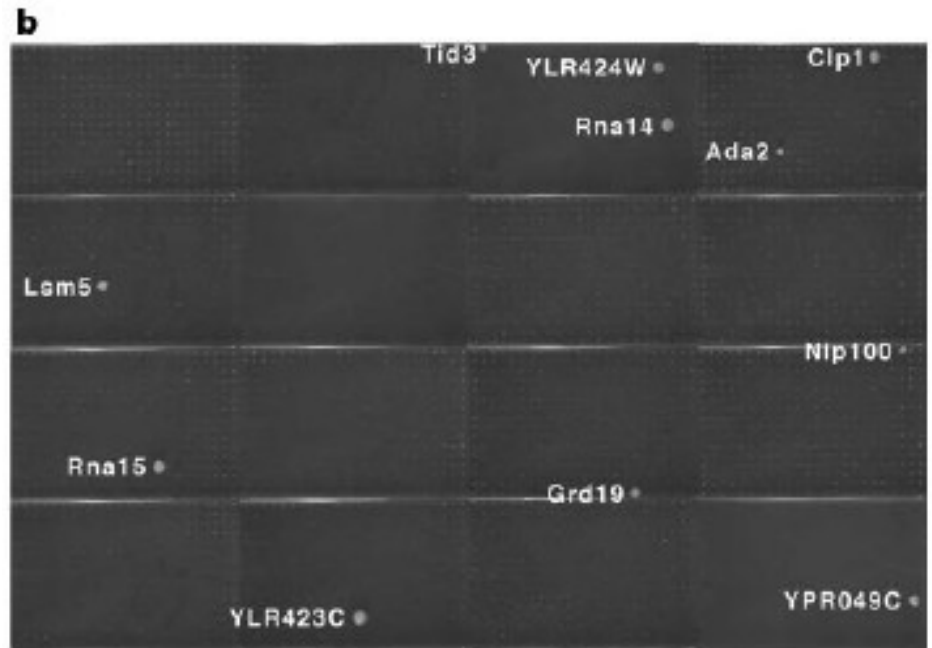
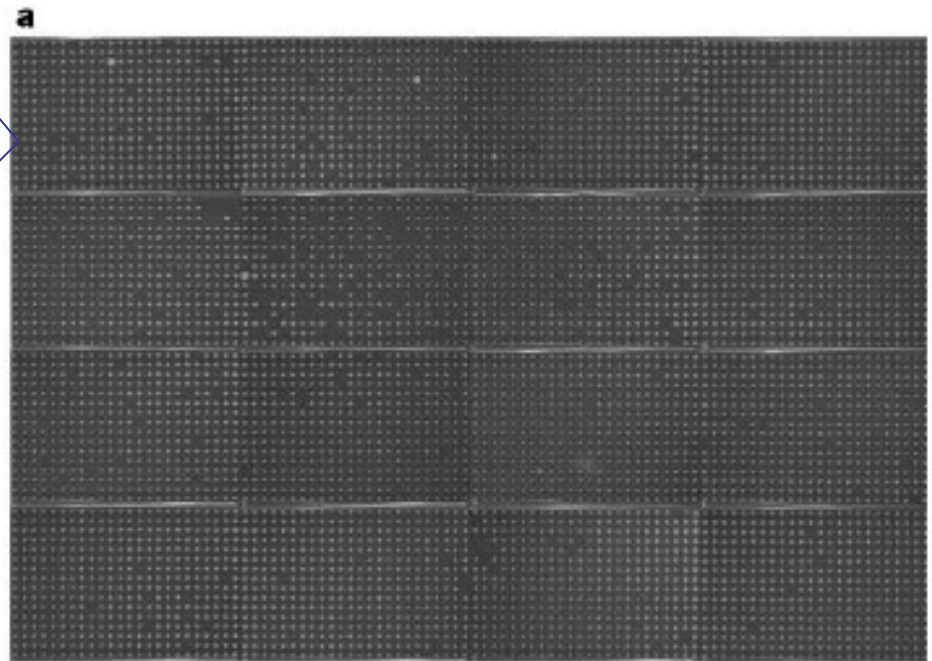
MaV203 kmen navíc obsahuje URA3 reporter gen – lze tedy selektovat na uracilovou auxotrofii + reversní systém tj. mutanty disruptující interakce (na FOA)



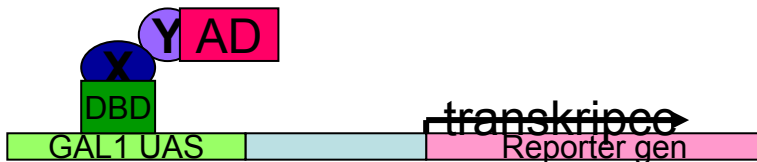
Mat α buňky



Mat a buňky
8x12 jamek
(96 na misku)
Všechny ORF



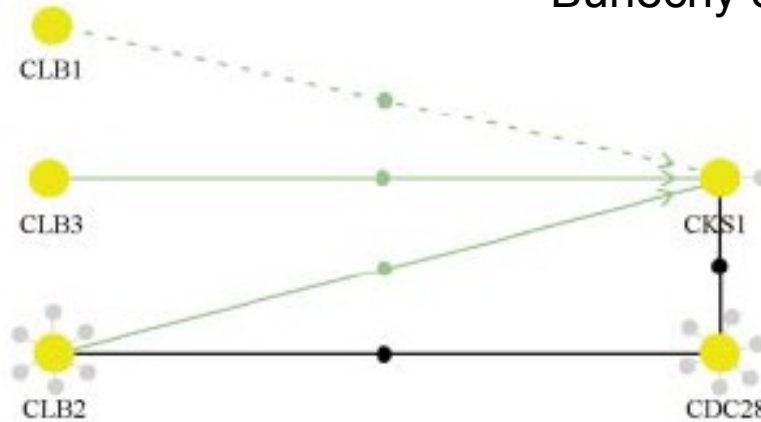
Kvasinkový „INTERACTOME“



Protein „networks“

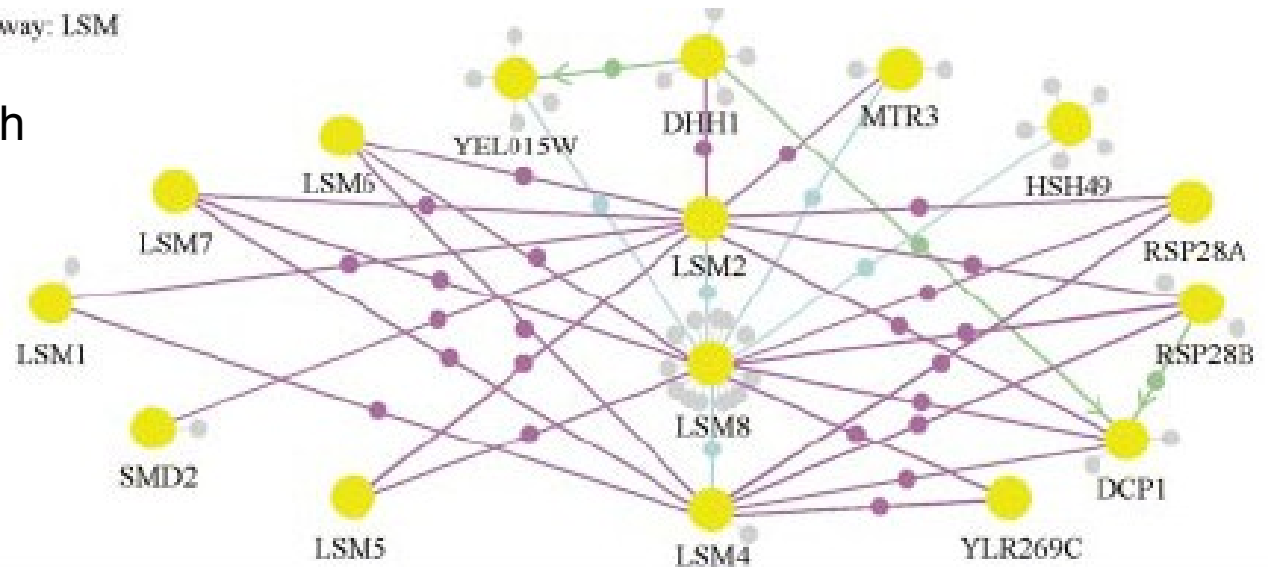
Pathway: CLB/CDC28/CKS1

Buněčný cyklus

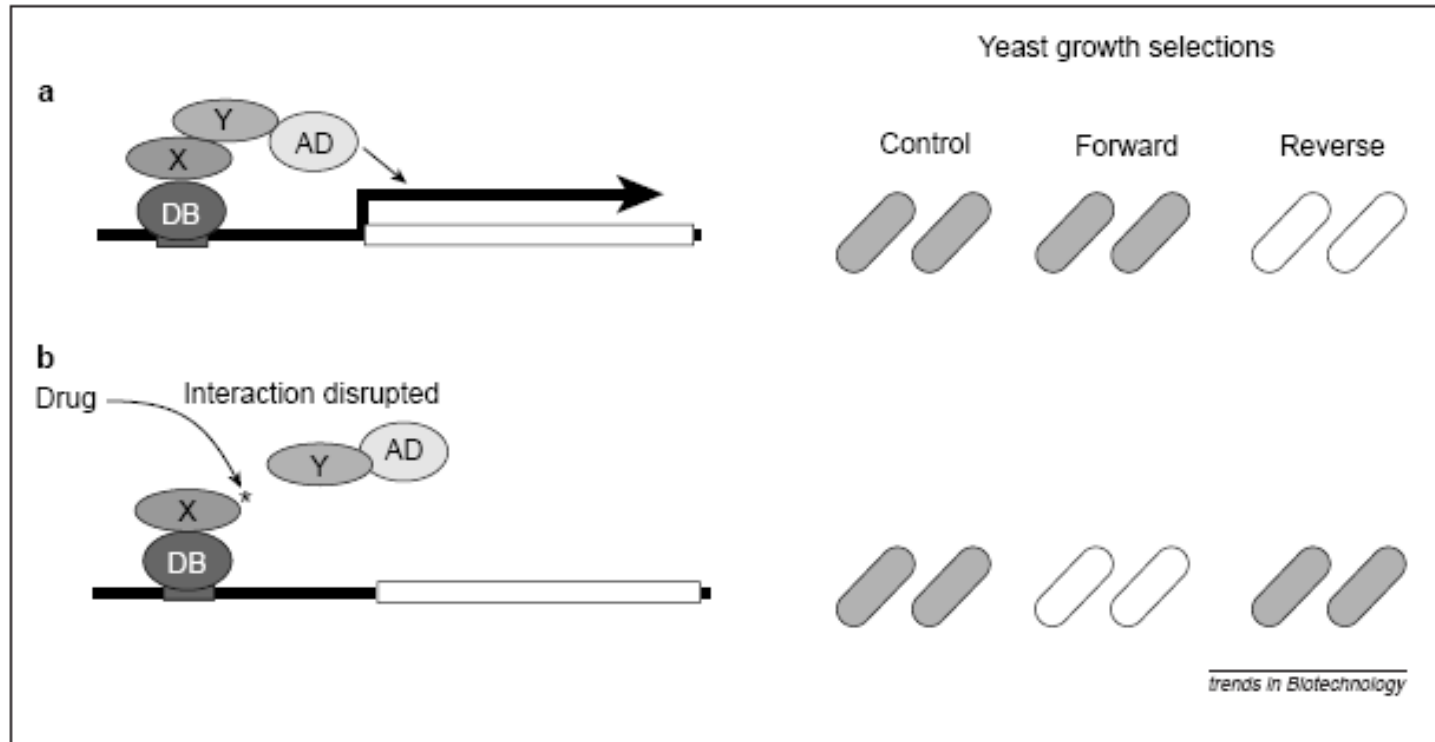


Pathway: LSM

RNA sestřih



Reversní systém (Y2H)



-Při použití *URA3* reportéru lze použít toxickou 5-fluoro-orotátovou kyselinu (5-FOA) k negativní selekci tj. interakce povede k záhubě kvasinek, zatímco mutanty neschopné interakce na FOA plotnách porostou (mutanty nebo syntetické látky)

Split-hybrid systém

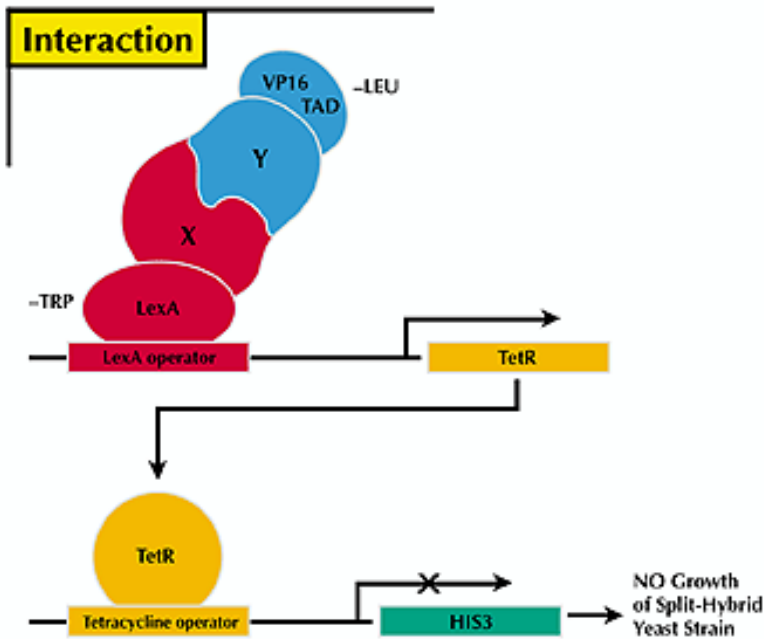


Fig. 1
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells unable to grow on media lacking histidine.

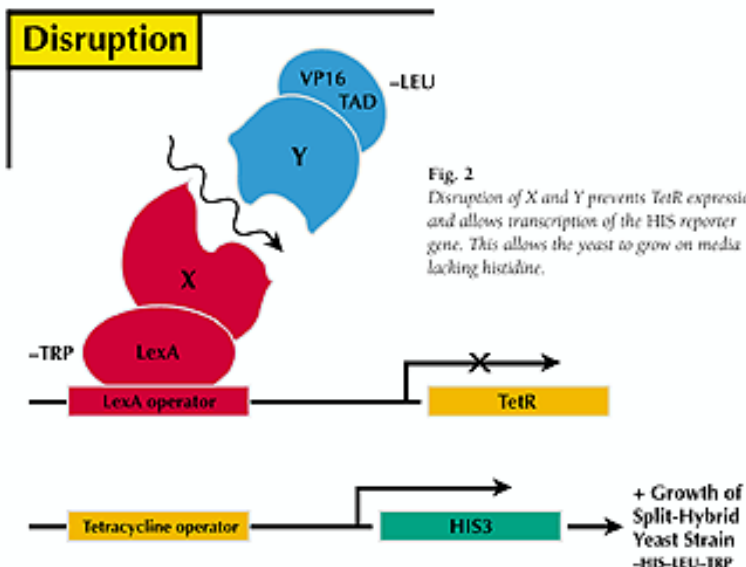


Fig. 2
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.



PCR mutagenesis

Mutated library

27,000 yeast transformants screened in the split-hybrid system with LexA-CBD

-5,000 Growth(+)

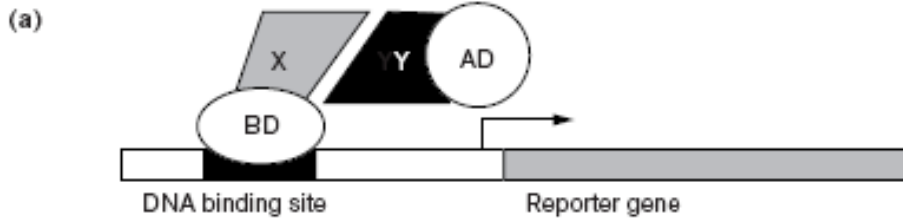
PNAS (1996) p. 13896

536 X-gal(+)

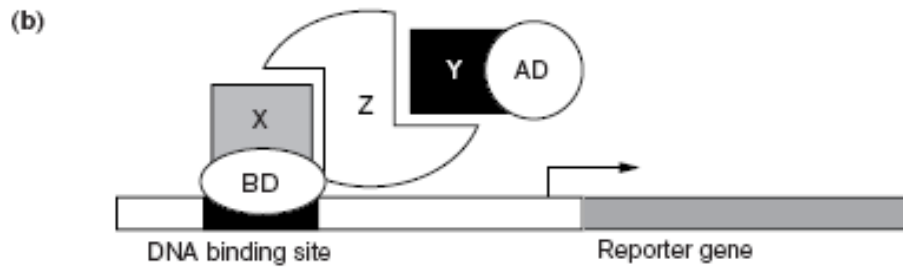
193 mutant DNAs were isolated and re-screened in the split-hybrid and two-hybrid strains

Growth: 152 split-hybrid (+), two-hybrid (-)

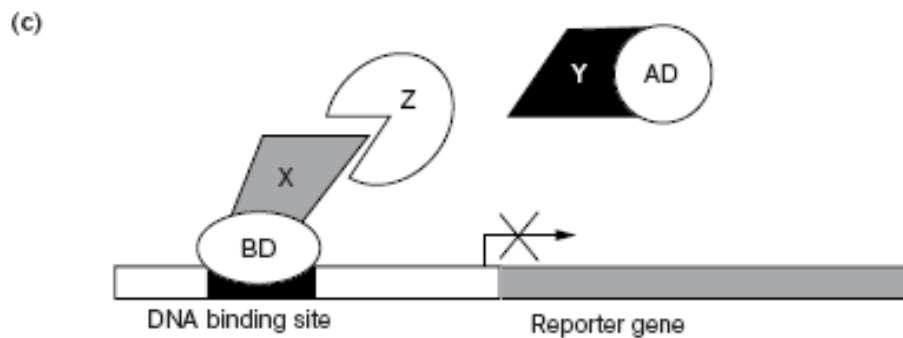
70 mutants contained single amino acid mutations



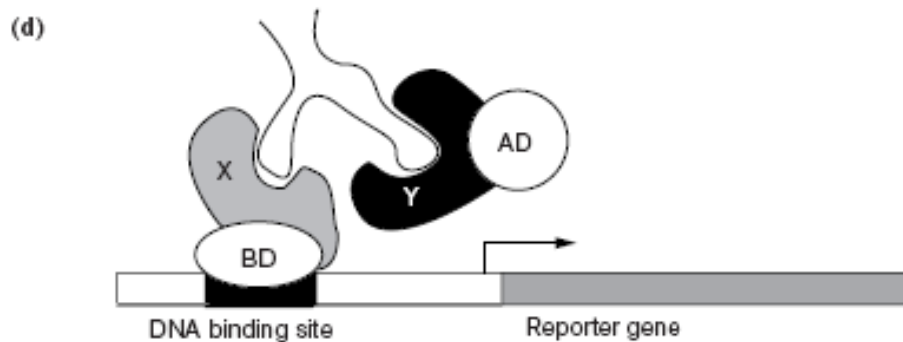
Klasický dvojhybridní systém



Trojhybridní systém
– heterotrimerní proteinové komplexy
- posttranslační modifikace

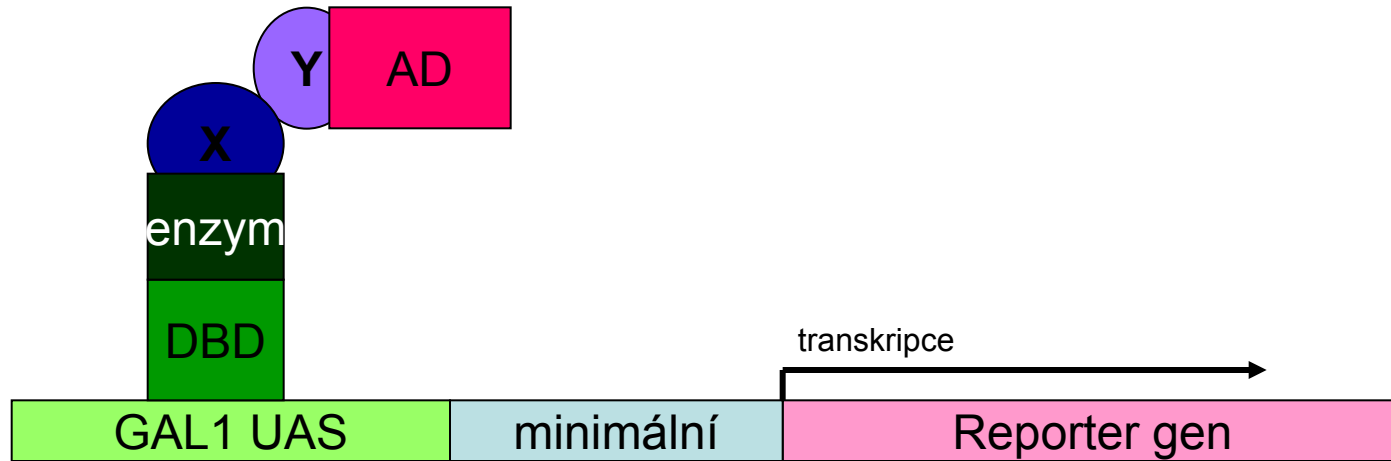


Trojhybridní systém
- proteinový inhibitor interakce



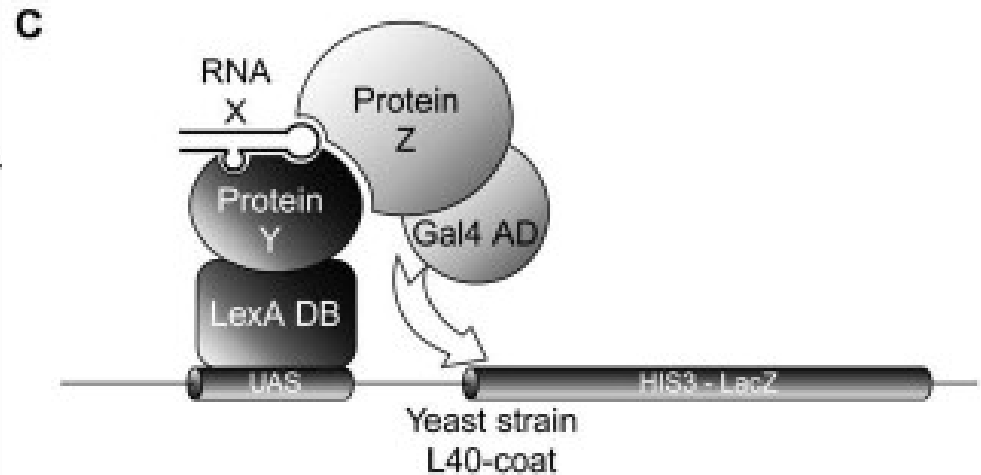
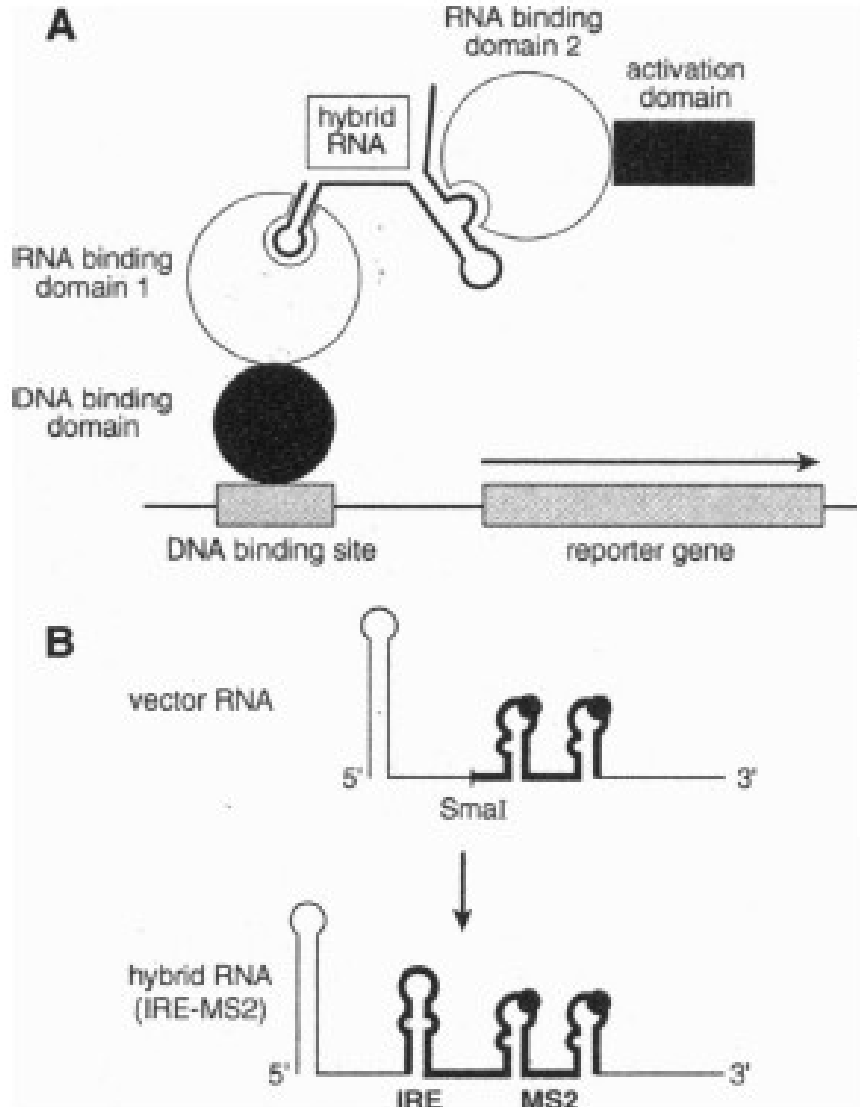
Trojhybridní systém
– RNA interakce
- ligand/receptor

Interakce vyžadující post-translační modifikace



- Některé protein-proteinové interakce jsou závislé na post-translačních modifikacích
- v buňce jsou přítomny např. acylasy i deacylasy, ale nemusí docházet k acylaci hybridního proteinu – řešením je „připojení“ příslušného enzymu k hybridu
- konstitutivní modifikace a každý enzym ve stechiometrickém poměru k substrátu (nejsou nutné kofaktory regulující interakci/modifikaci)

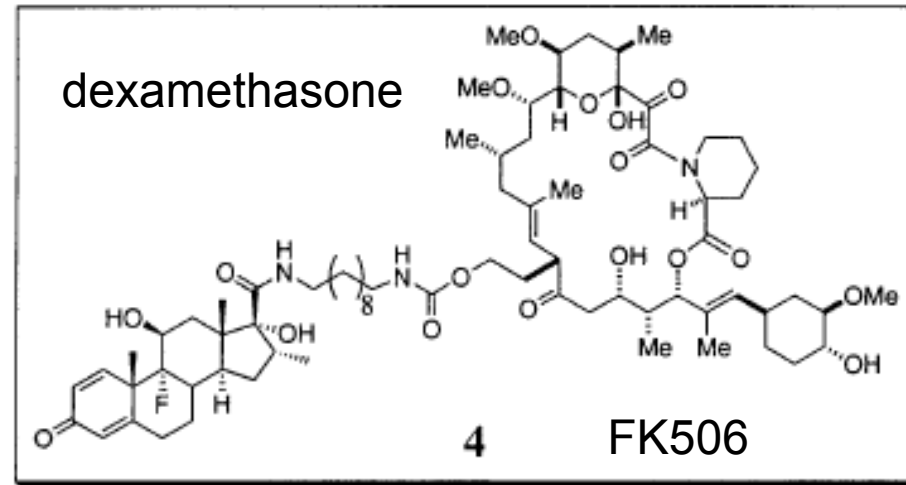
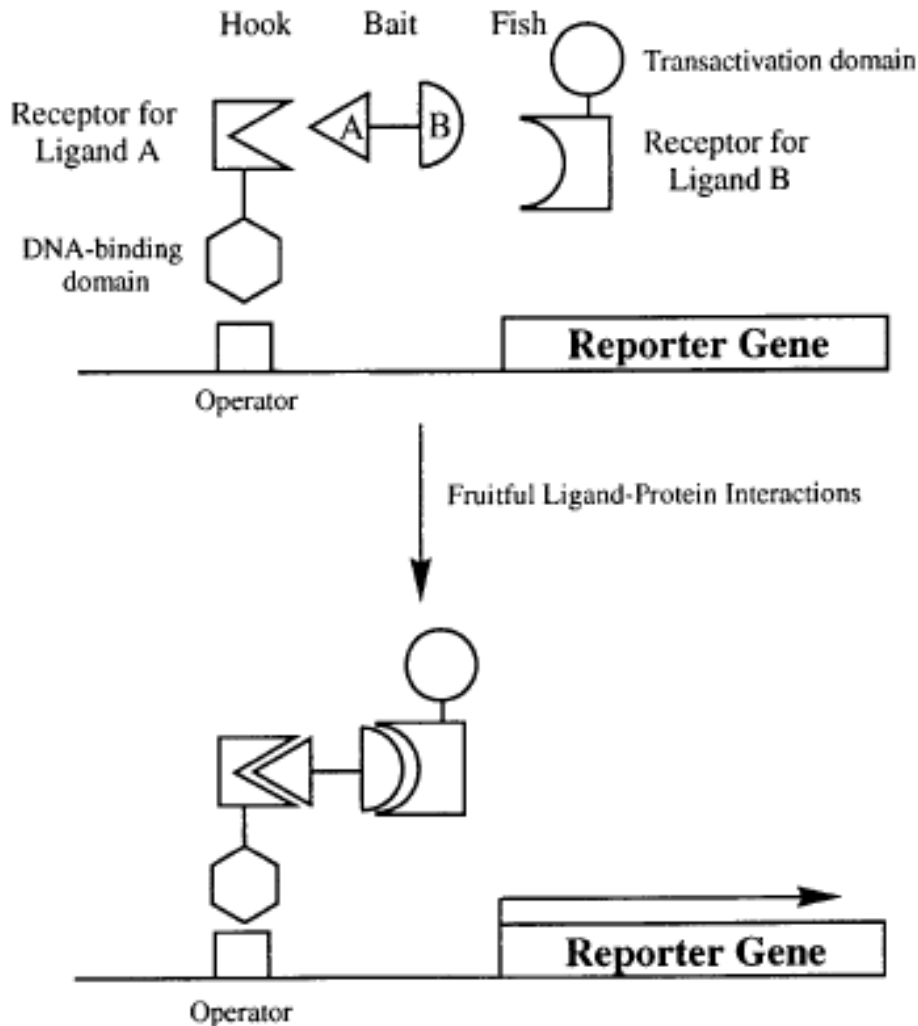
Analýza vazby protein-RNA (Y3H)



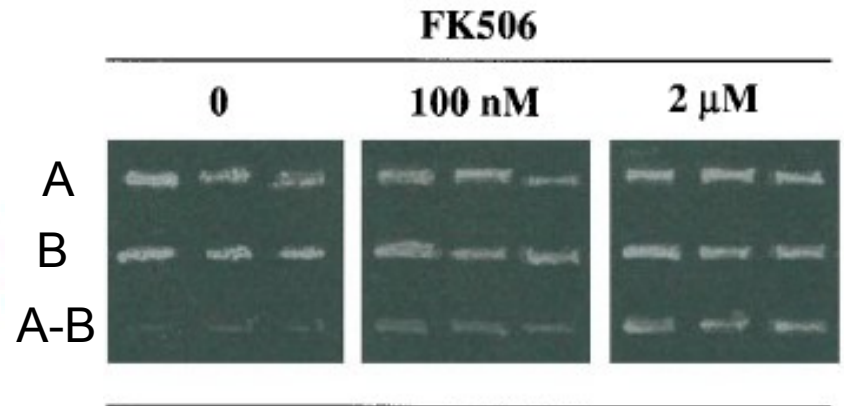
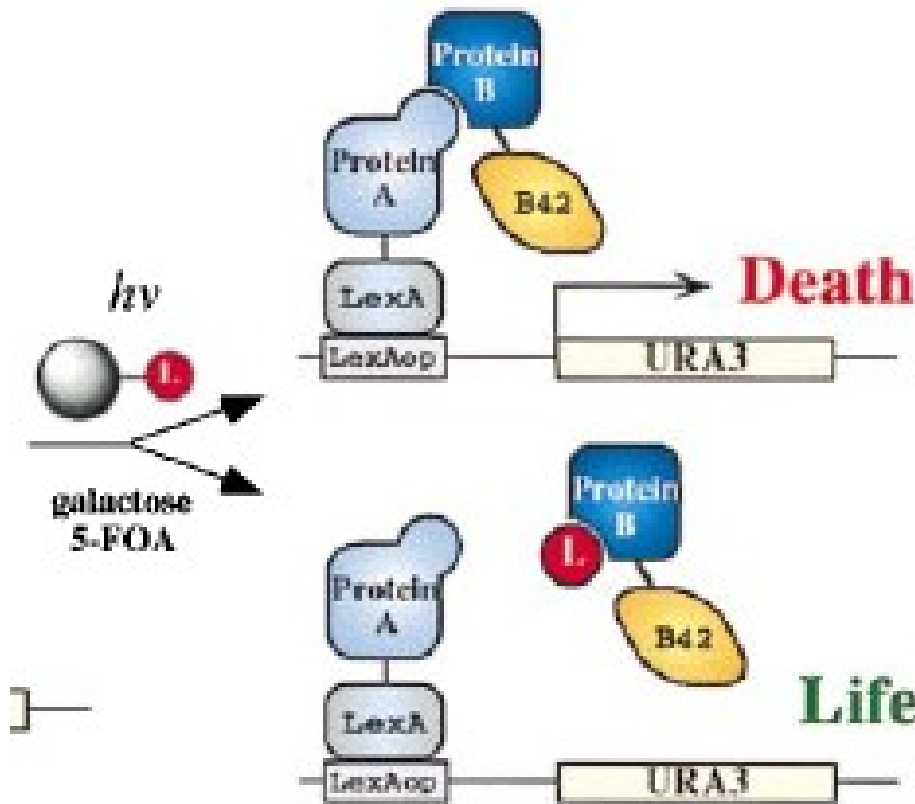
FEBS letters (2004) p. 7

Vazba ligand-receptor (Y3H)

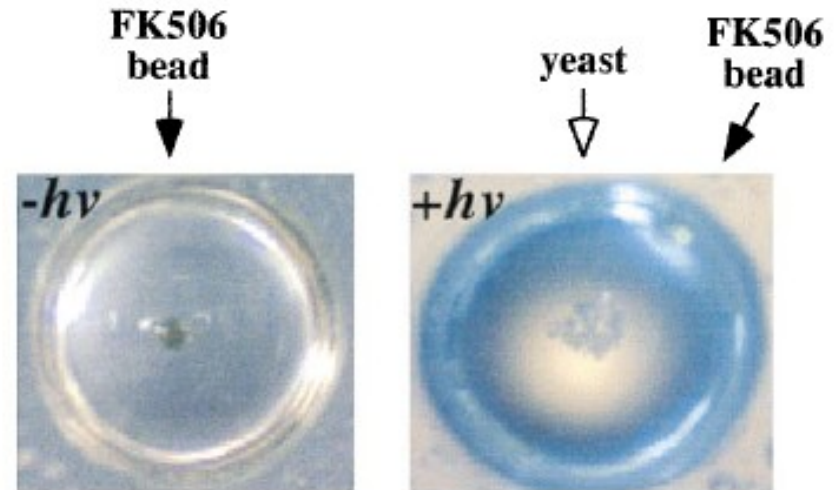
glucocorticoid receptor - FKBP12



Inhibitory proteinových interakcí

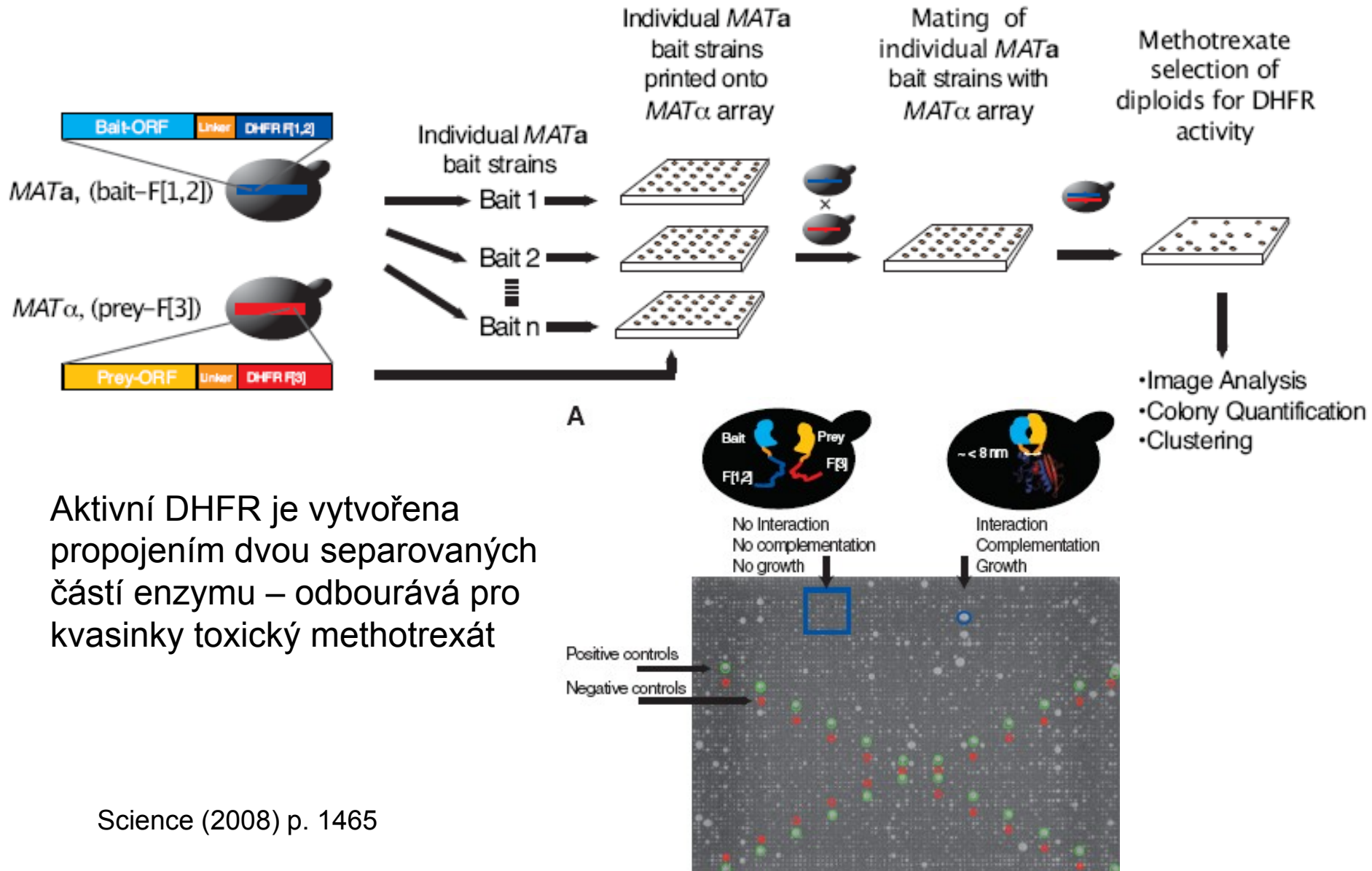


Sc^{*}-H-W, gal/raf,
0.1 % 5-FOA



nano-kapky
FK506 připojen na kuličky přes fotolabilní
raménko - po uvolnění začínají kvasinky růst

Dihydrofolát reduktáza/methotrexát



Aktivní DHFR je vytvořena propojením dvou separovaných částí enzymu – odbourává pro kvasinky toxický methotrexát

CytoTrap 2-hybridní systém

Kvasinkový *cdc25-2 ts* mutant - hSOS (guanine exchange factor) aktivuje RAS pokud je ukotven na membránu v jeho blízkosti
- jeden partner je myristylován a ukotven na membránu a druhý (interakční) partner je fuzován k hSOS

