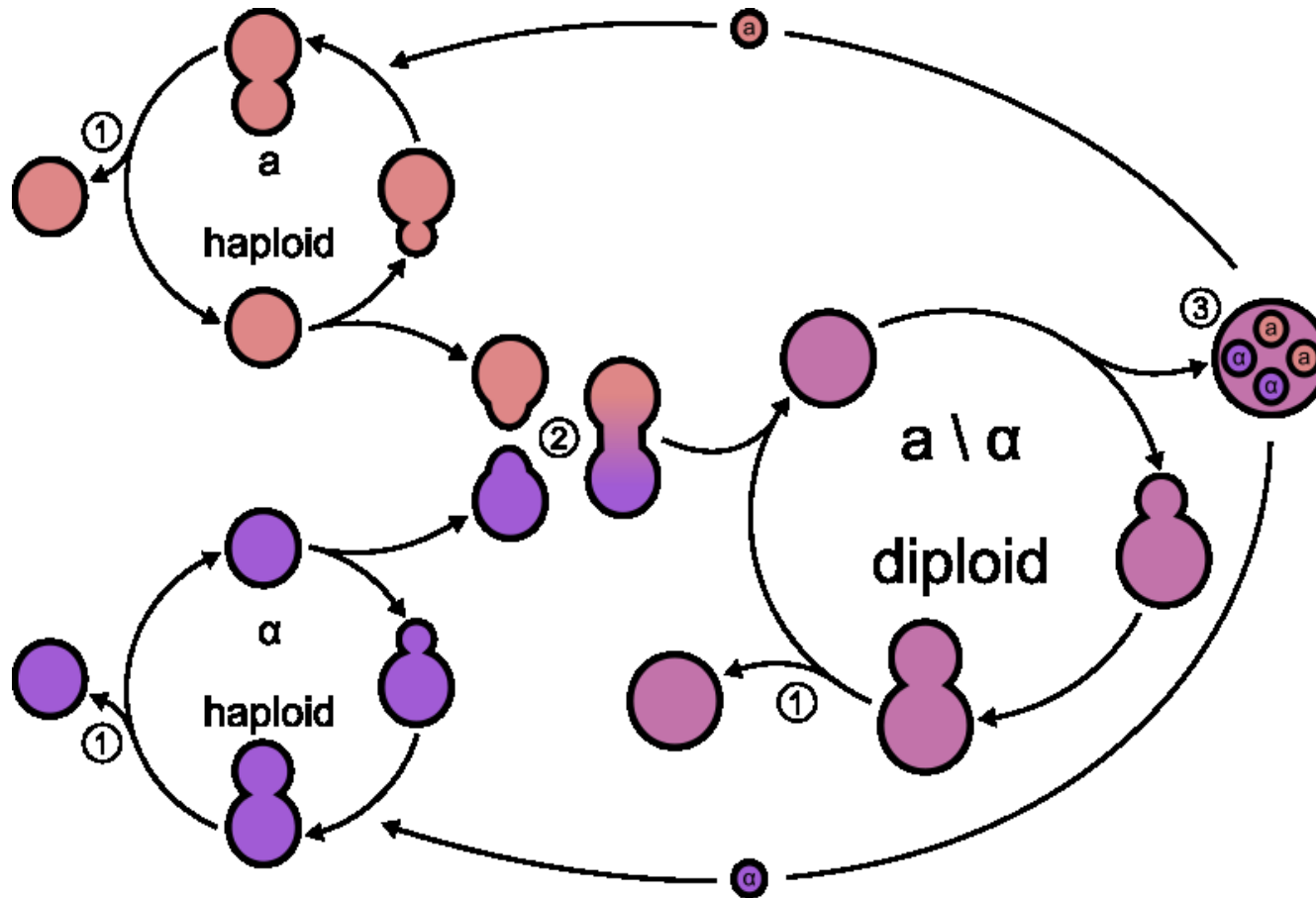


Párování/mating *S. cerevisiae*



párovací typ je
geneticky
determinován

Heterothalické – stabilní
Homothalické – přepínají párovací typ

Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

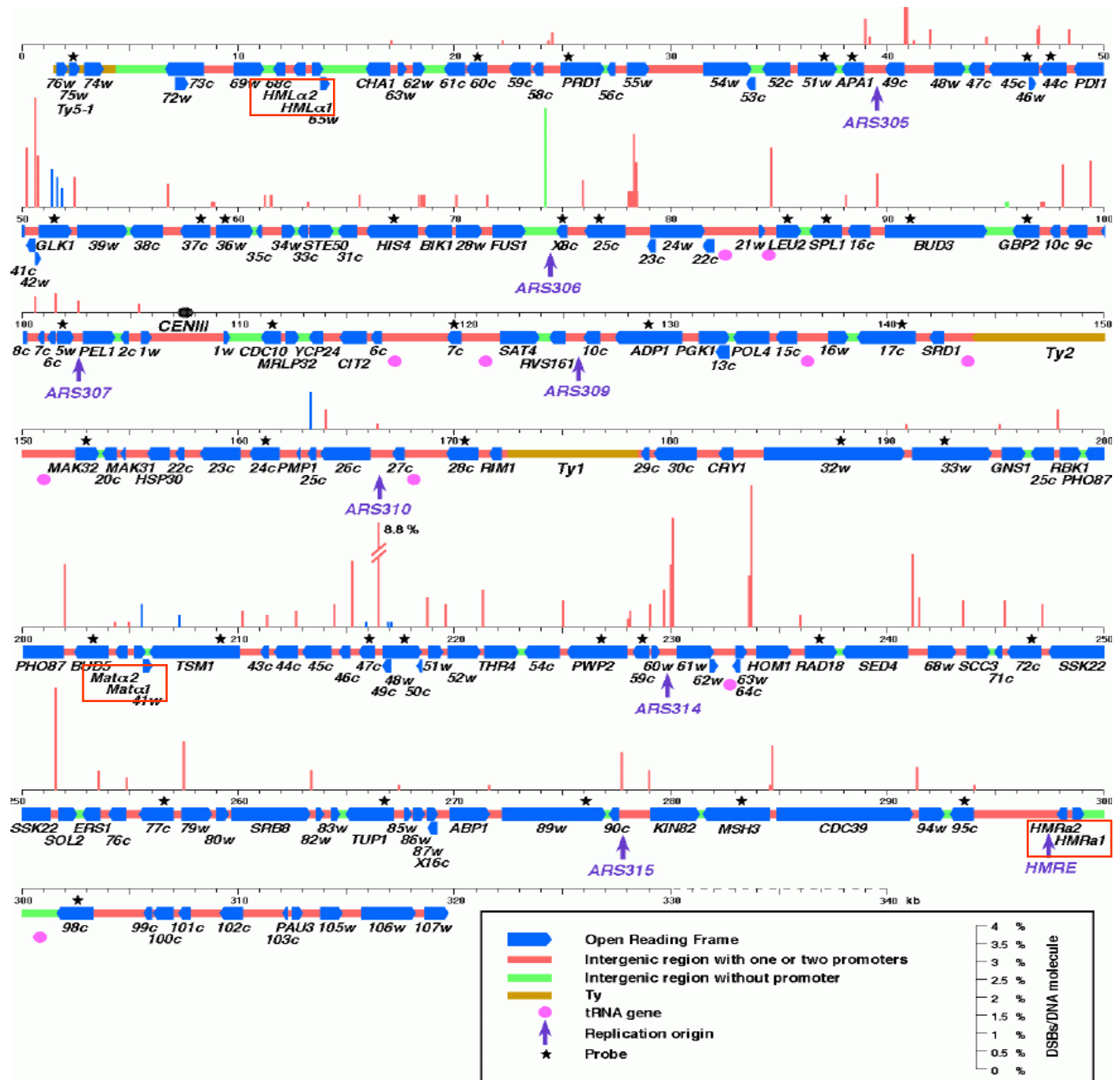
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

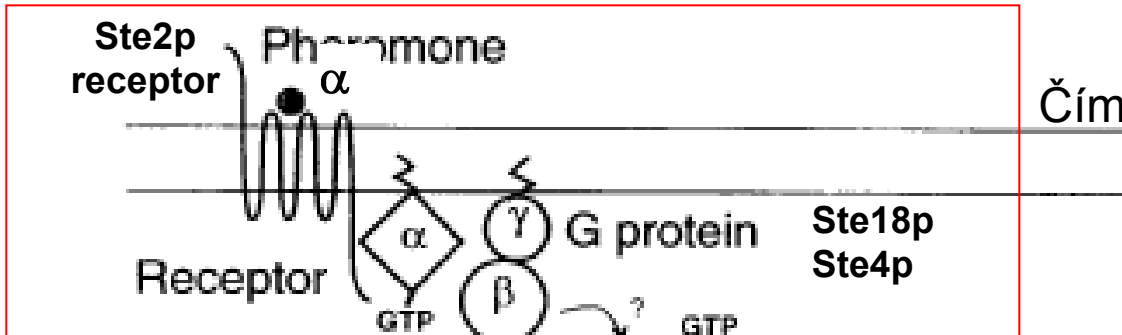
Co $\alpha 1$, $\alpha 2 + \alpha 1$, $\alpha 2$ kódují? (transkripční faktory)

HO endonukleasa – výměna kazet v MAT lokusu (rozeznává specifické sekvence)

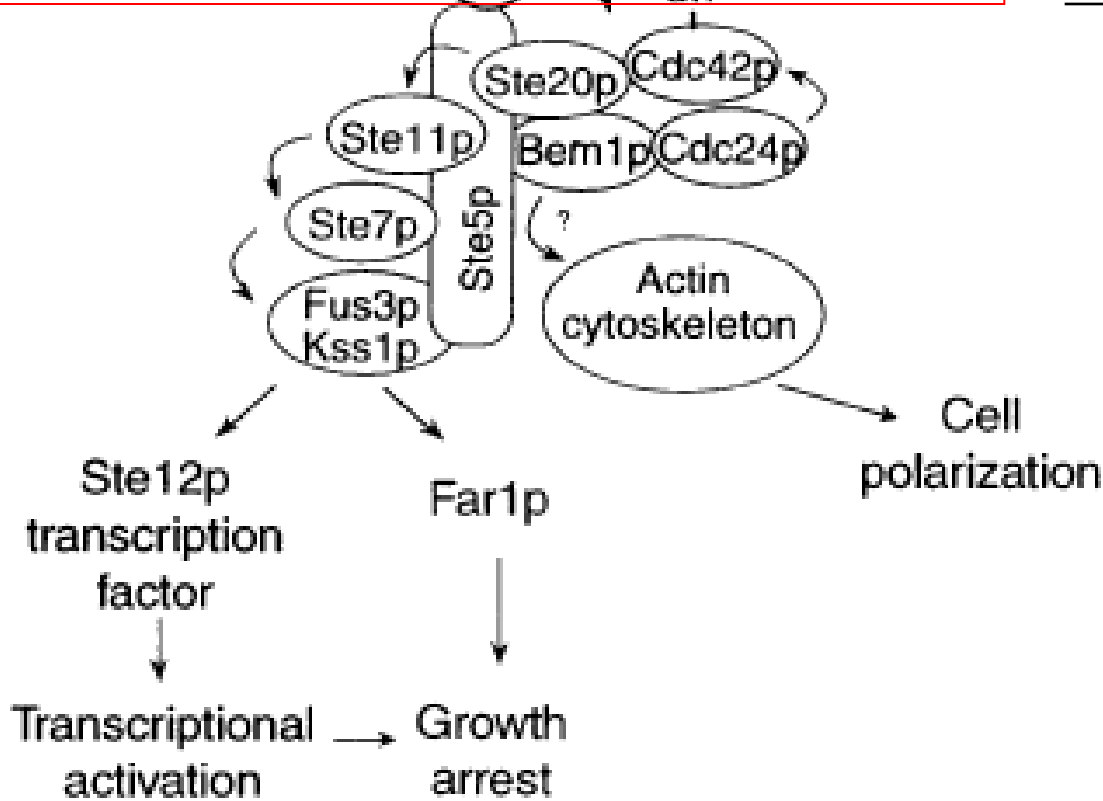
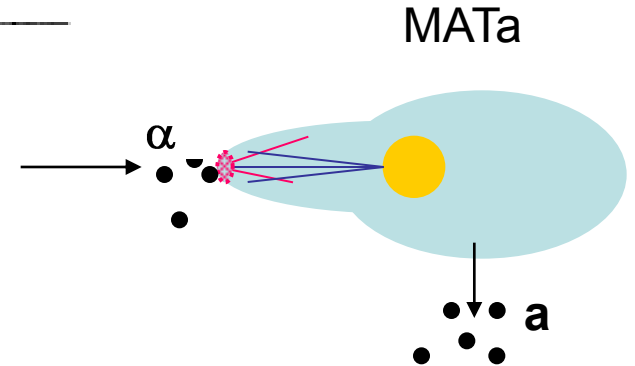
Heterothalické – stabilní
Homothalické – přepínají párovací typ



Signální feromonová dráha



Čím se buňky MAT α x MAT α liší?



Zastavení buněčného cyklu
Morfologické změny (aktin)
Aktivace transkripce

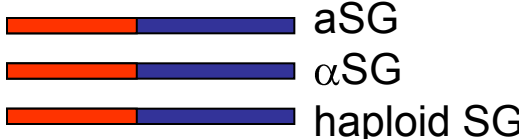
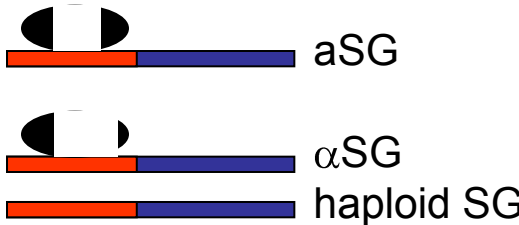
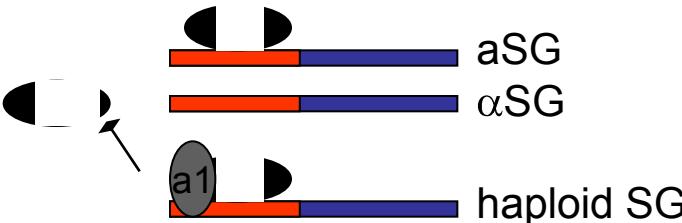
Regulace transkripce v haploidních buňkách

a1, a2 + α 1, α 2 kódují transkripční faktory, které ovlivňují transkripci 3 skupin genů

a-spec.= *MFA*1,2 (a-feromon), *STE*2 (α -receptor), *STE*6, 14 (úprava a sekrece feromonu)

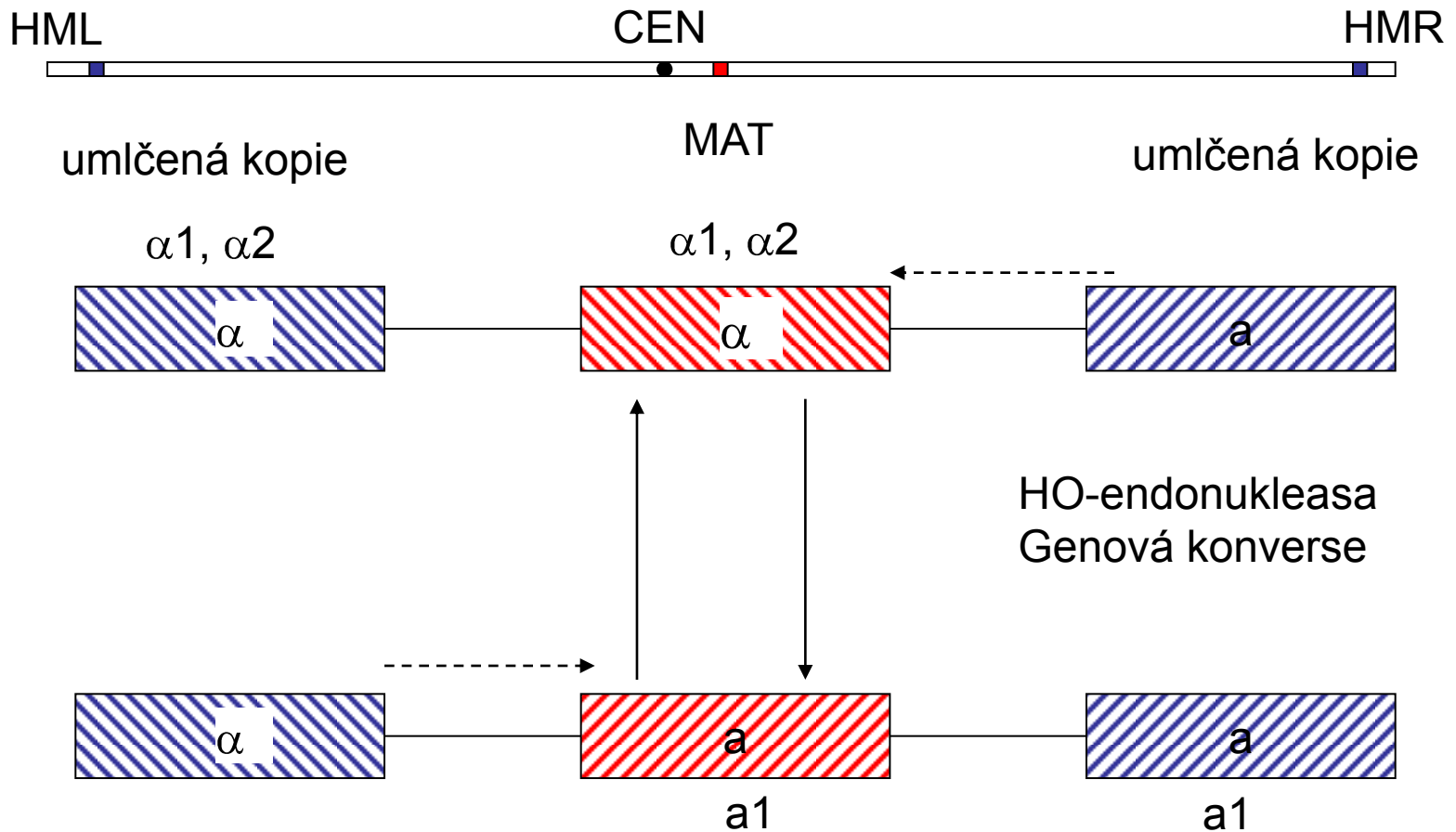
α -spec.= *MF* α 1,2 (α -feromon), *STE*3 (a-receptor), *STE*13, *KEX*2 (proteasy)

haploid spec.= *STE*4,18 (podjednotky G-proteinu), *RME*1 (inhibitor meiosis)

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

Přepínání párovacího typu

Chromosom III



HO endonukleasa rozeznává a štípe specifické sekvence

Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismů opravy poškozené DNA

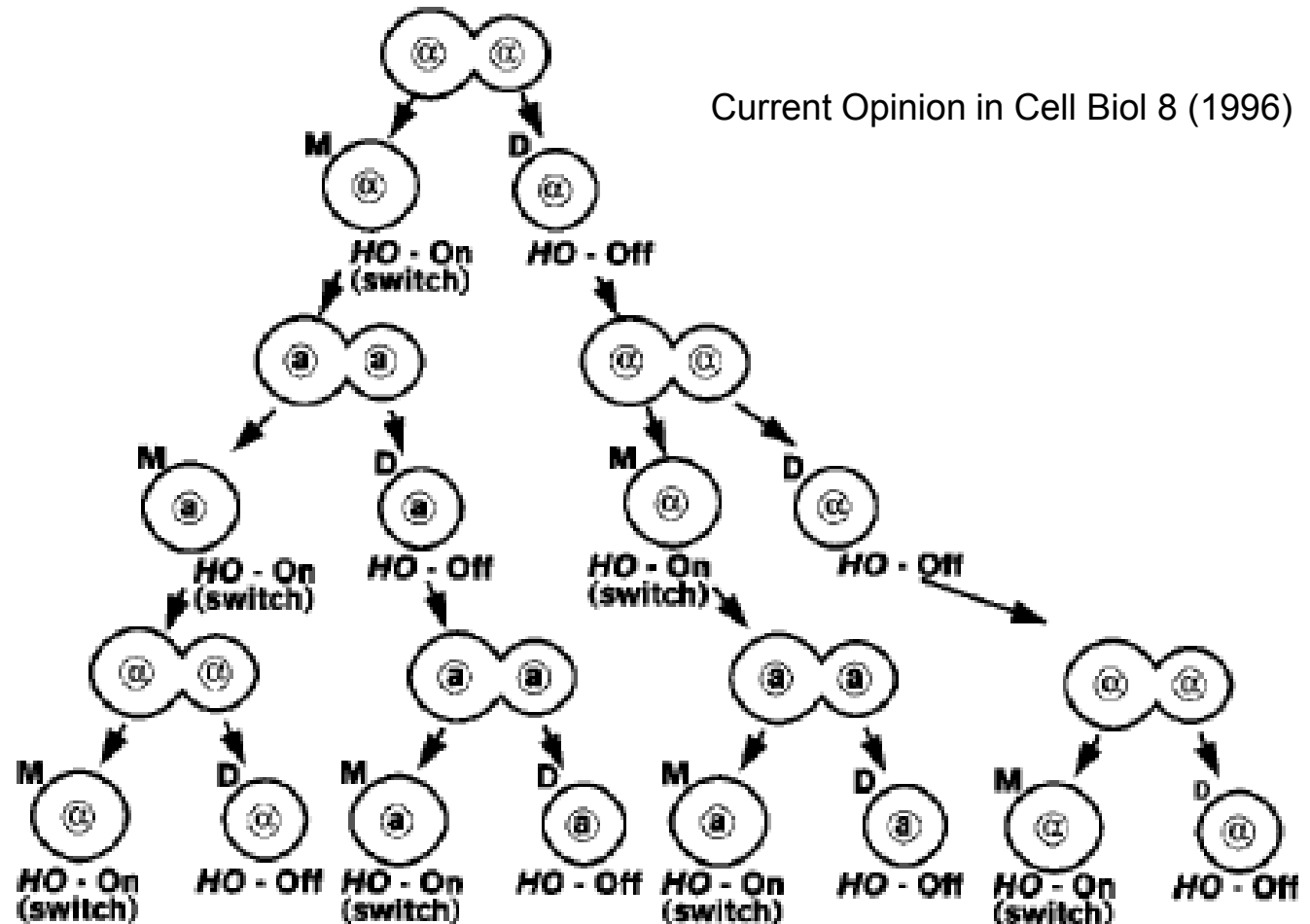
Přepínání párovacího typu

DNA z MAT lokusu je HO endonukleasou vystřižena a na její místo se překopíruje sekvence z kazety opačného páru

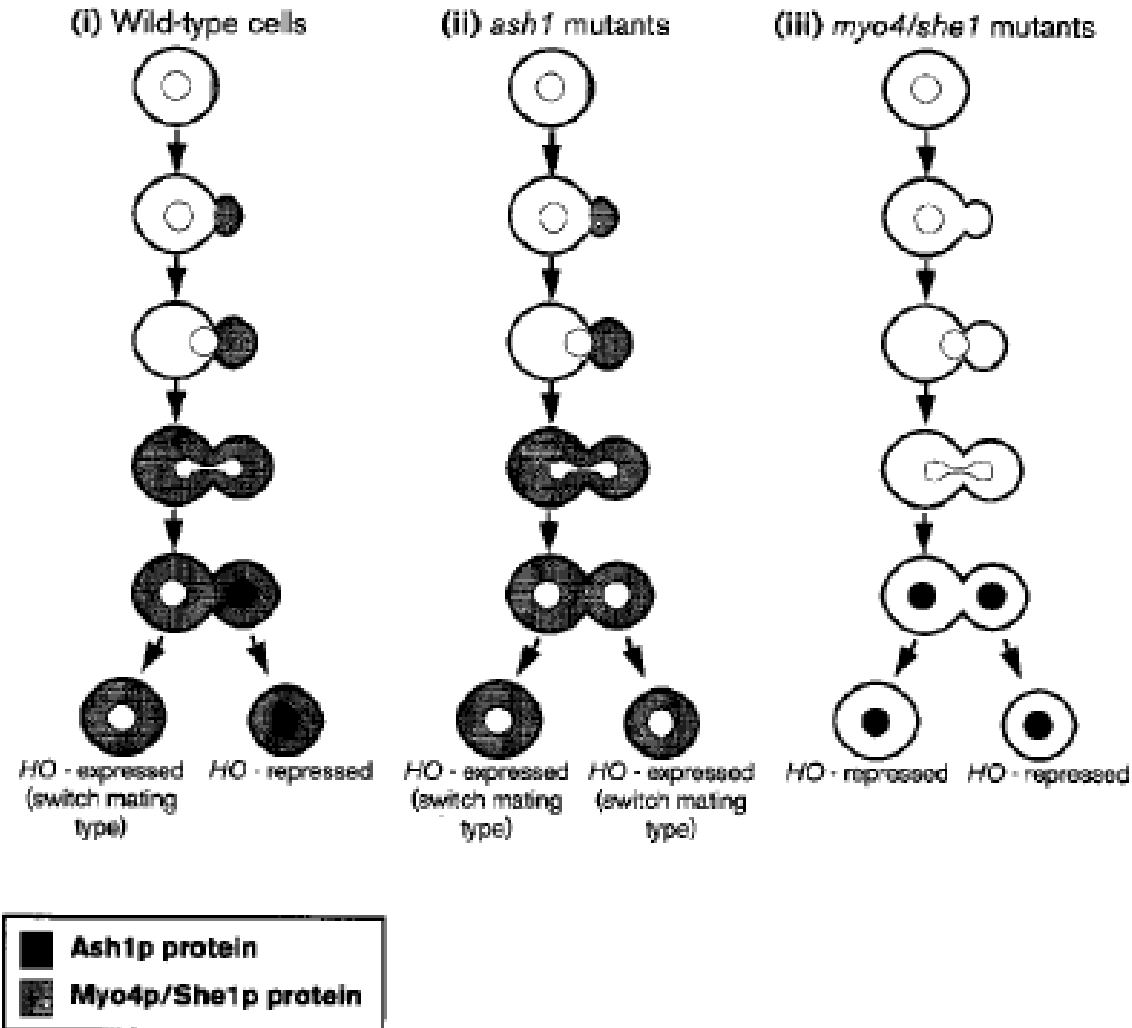
- HO endonukleasa je exprimována pouze v mateřské buňce v G1 fázi (dceřinná si uchová původní typ)

Current Opinion in Cell Biol 8 (1996)

homothalické



Asymetrická lokalizace Ash1p

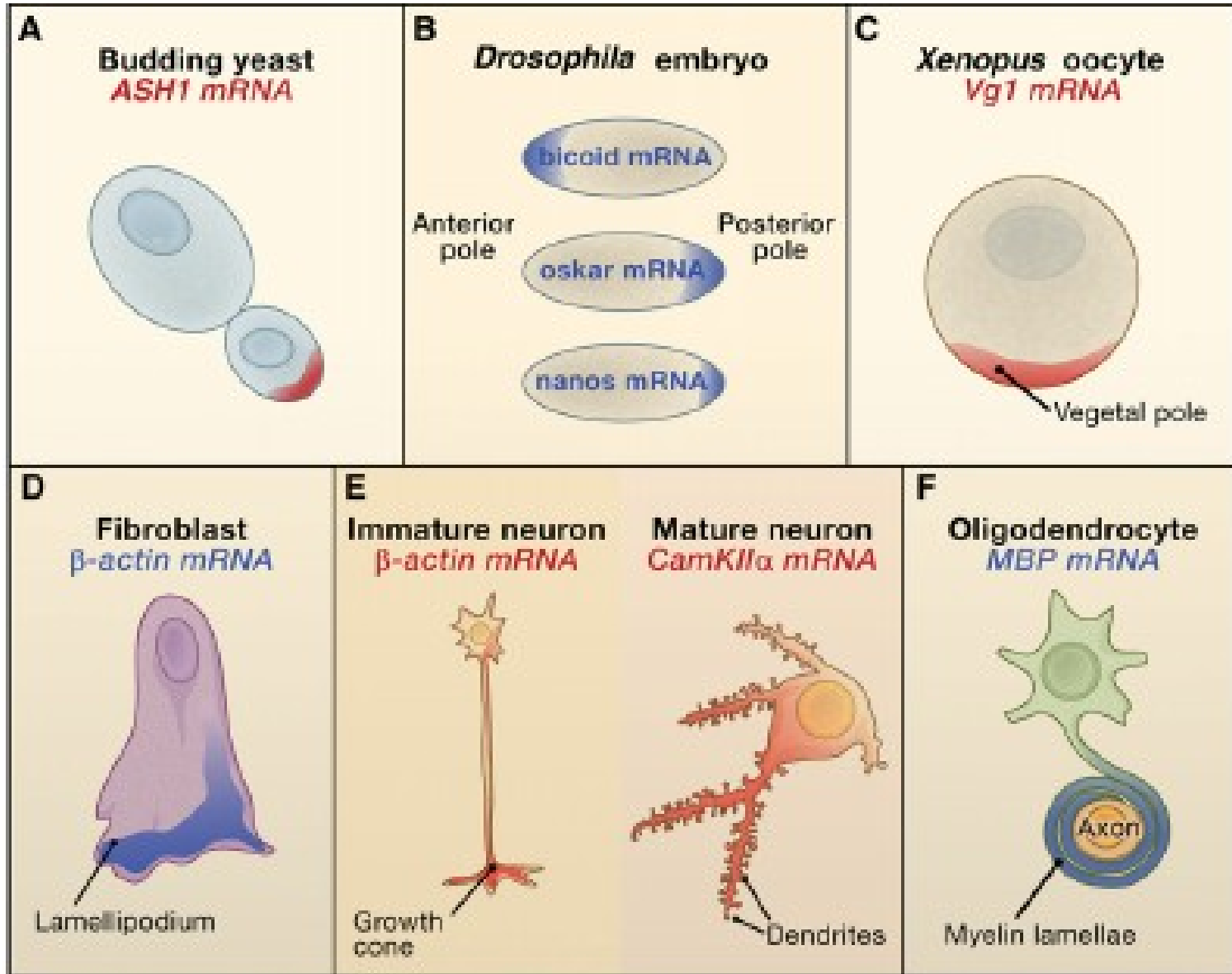


- Ash1p represor je asymetricky lokalizován do dceřiné buňky, kde blokuje transkripci *HO*-endonukleasy

- Není do ní sekretován, ale dochází k expresi (translaci) asymetricky lokalizované mRNA

- (translace RNA na specializovaných ribozomech asociovaných s cytoskeletem

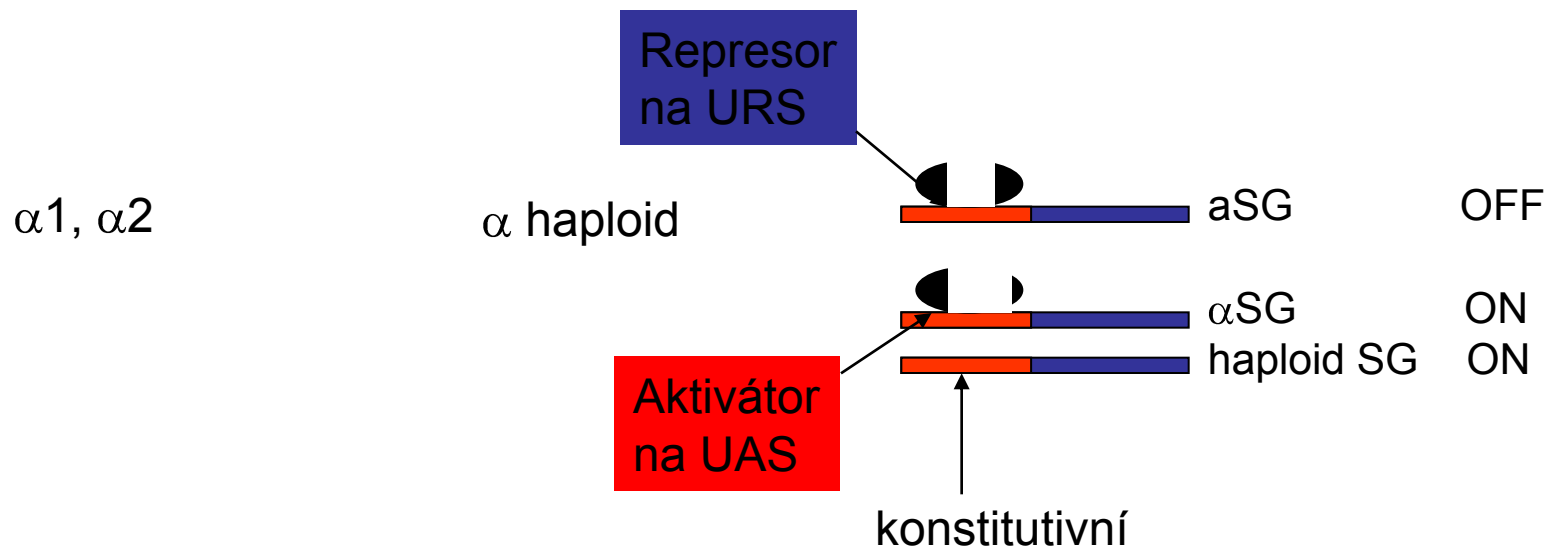
Příklady translace lokalizované mRNA



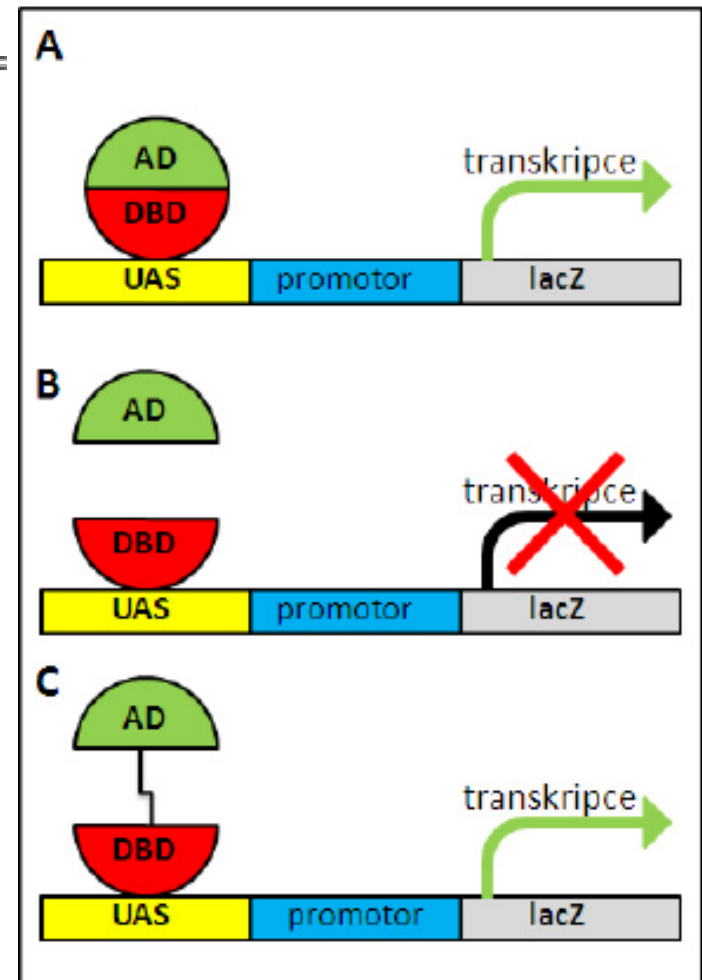
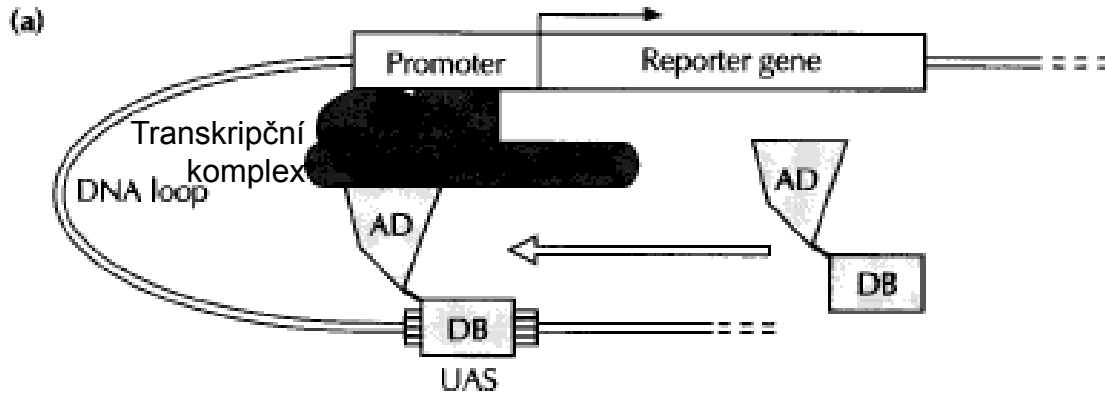
Struktura promotorů

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

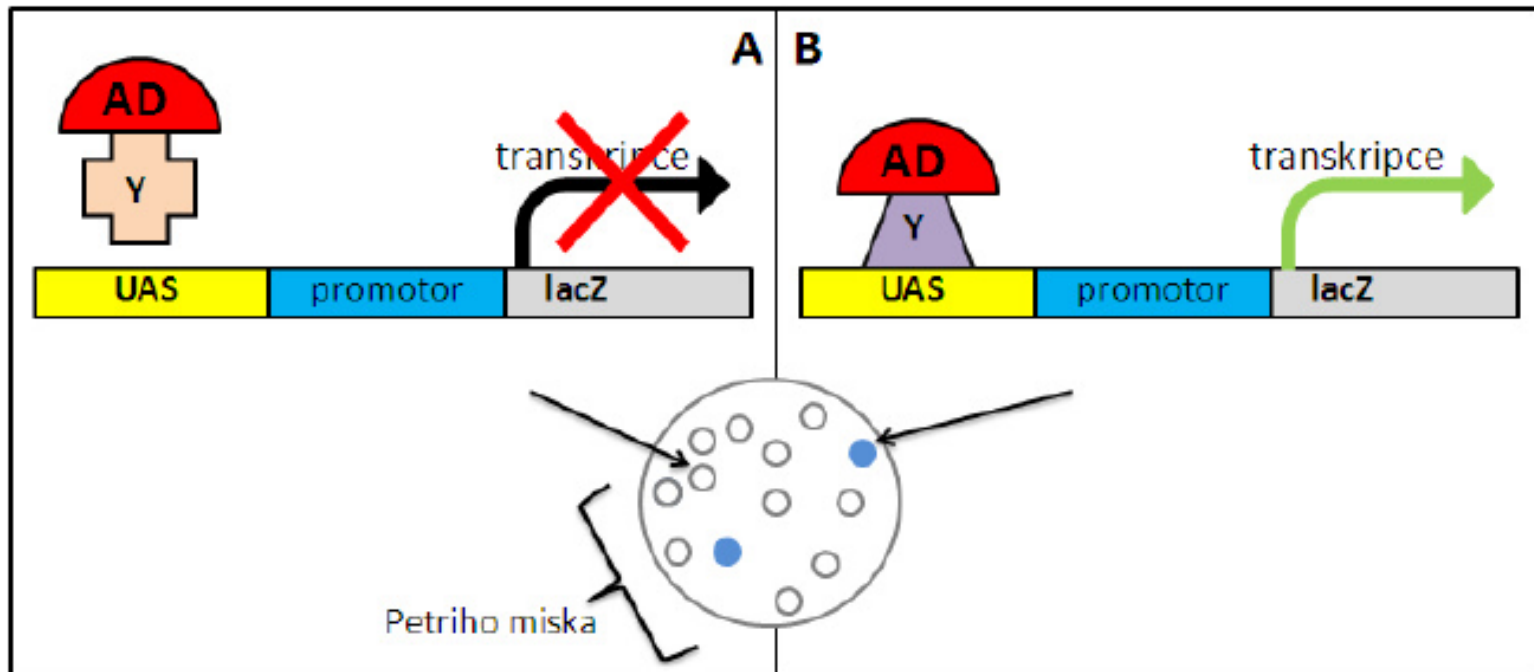
- Většina míst pro iniciaci transkripce obsahuje TC(G/A)A a PuPuPyPuPu (specifické pro kvasinky)
- TATA box (TATAT/AAT/A) je 60-120bp od iniciačního místa (podobné Pribnowovu boxu u bakterií)
- UAS (upstream activating sequences) a URS (upstream repressing sequences)
- DAS (downstream activating sequences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



Transkripční aktivátor Gal4p



Vznik 1-hybridních systémů

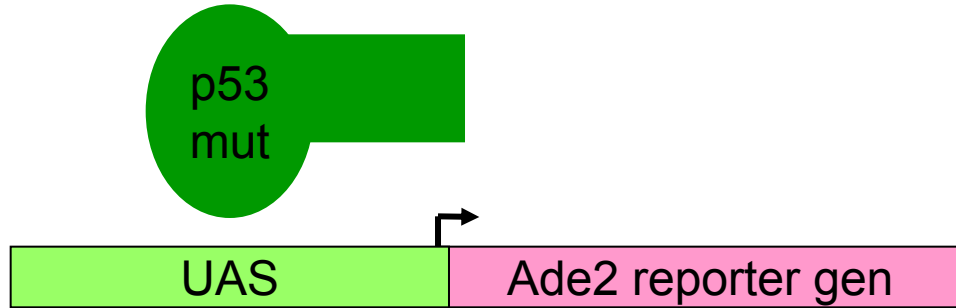
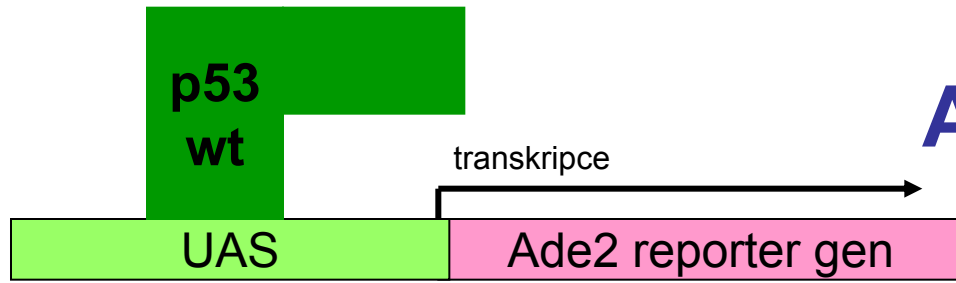


Různé transkripční faktory mají podobné domény a lze je kombinovat ...

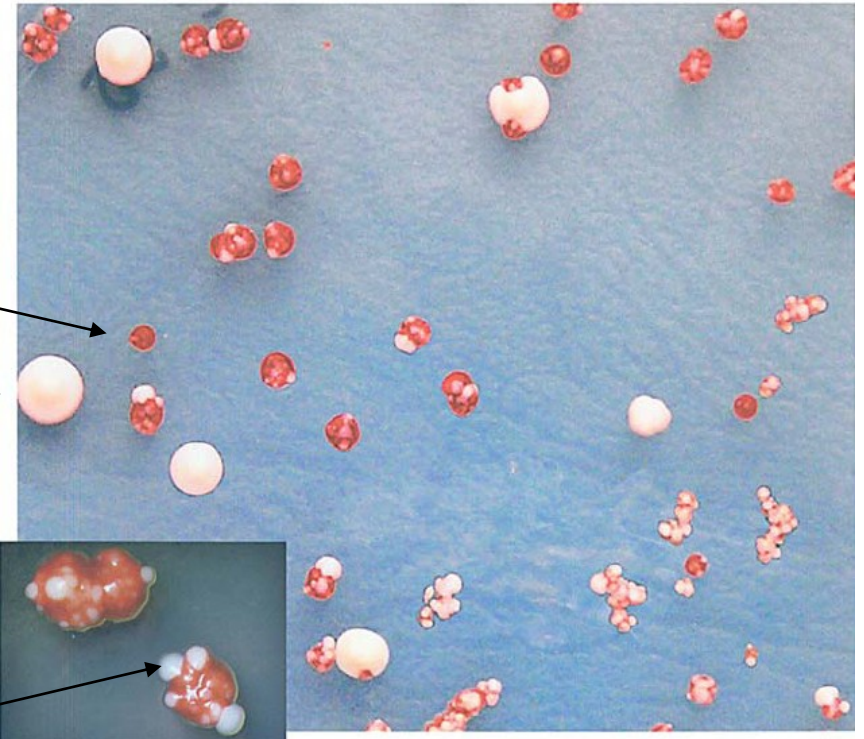
Lze hledat DNA-vazebné proteiny pro danou UAS sekvenci (AD-hybridní knihovny)

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

FASAY (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast)



Day 5

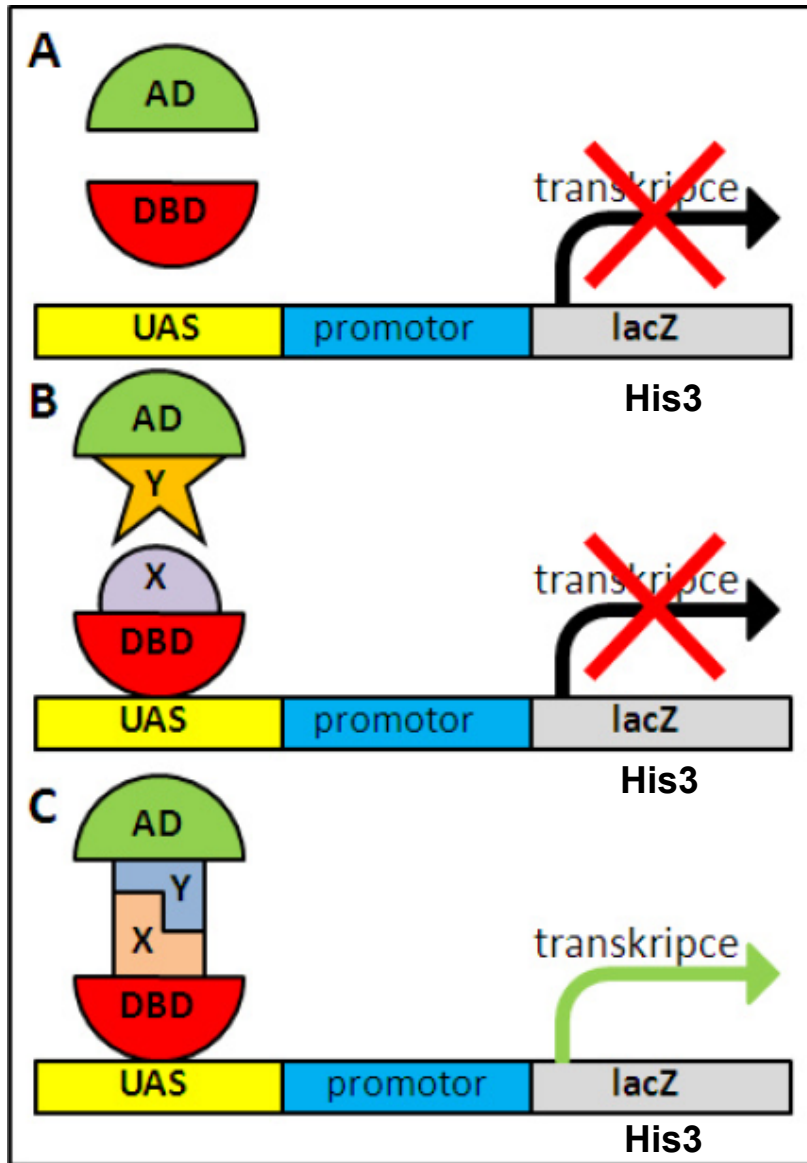


mut p53

wt p53

mut p53 (duplikace 30bp)
kvasinka opravila

2-hybridní systém



60 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
30 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
20 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
15 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
10 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
5 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
Kontrola (- Leu, Trp)			
	BD-Nse3 + V1AD	BD-Nse3 + AD-Nse1 (1-116)	VBD + AD-Nse1 (1- 116)

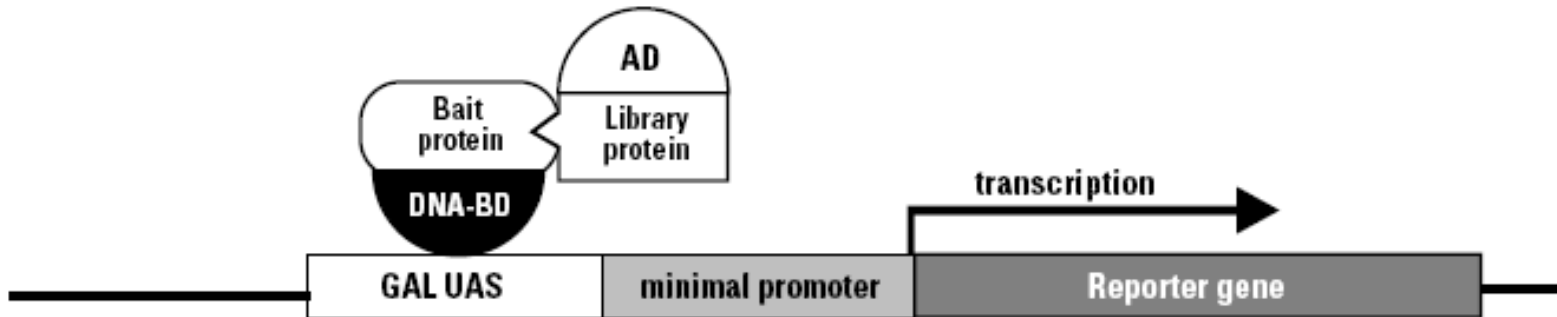
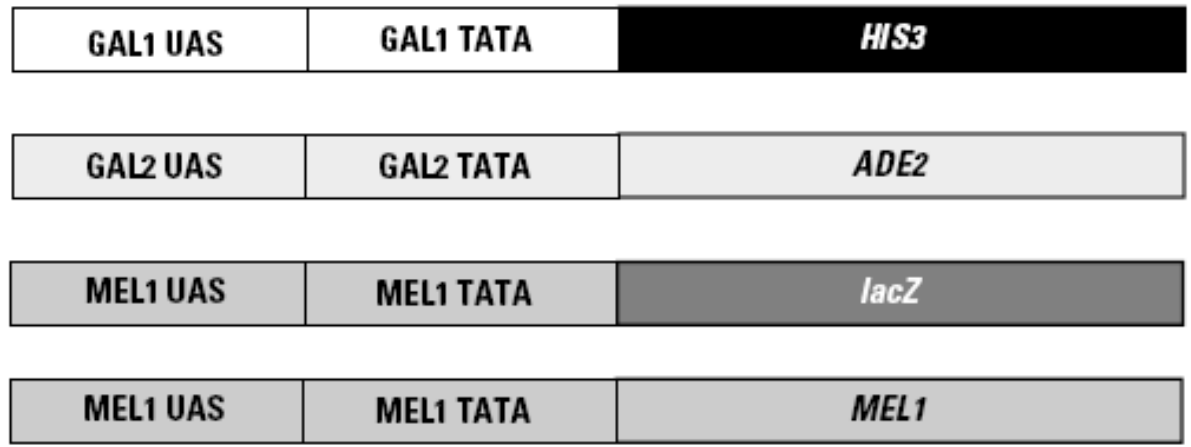


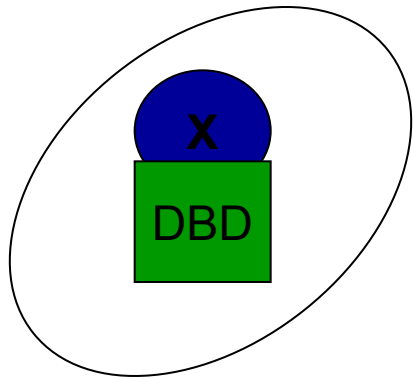
Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

AH109

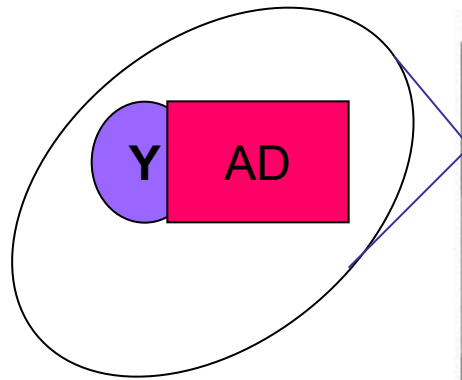
MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200,
gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,
GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,
URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ



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

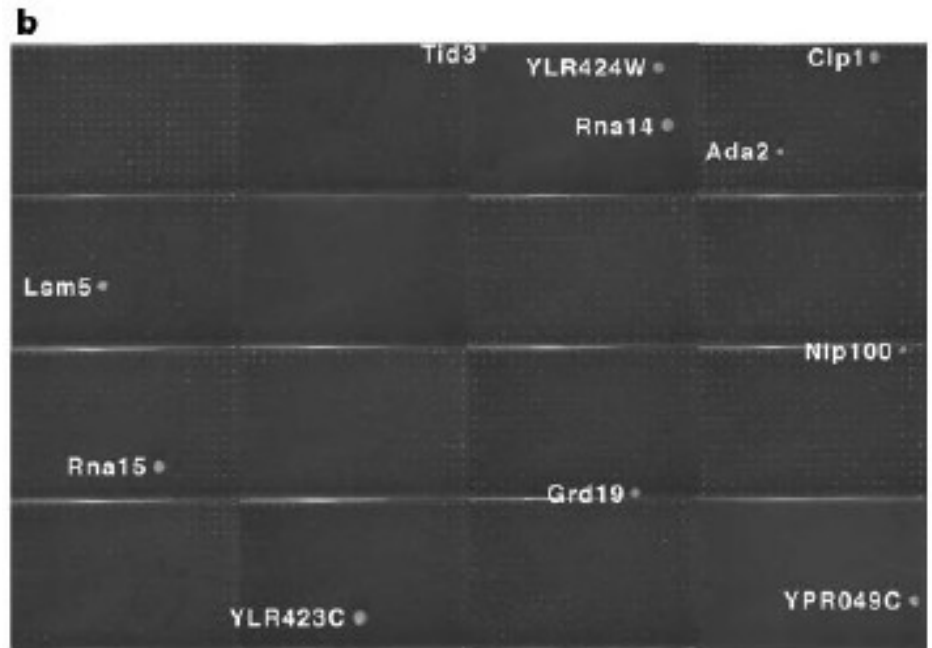
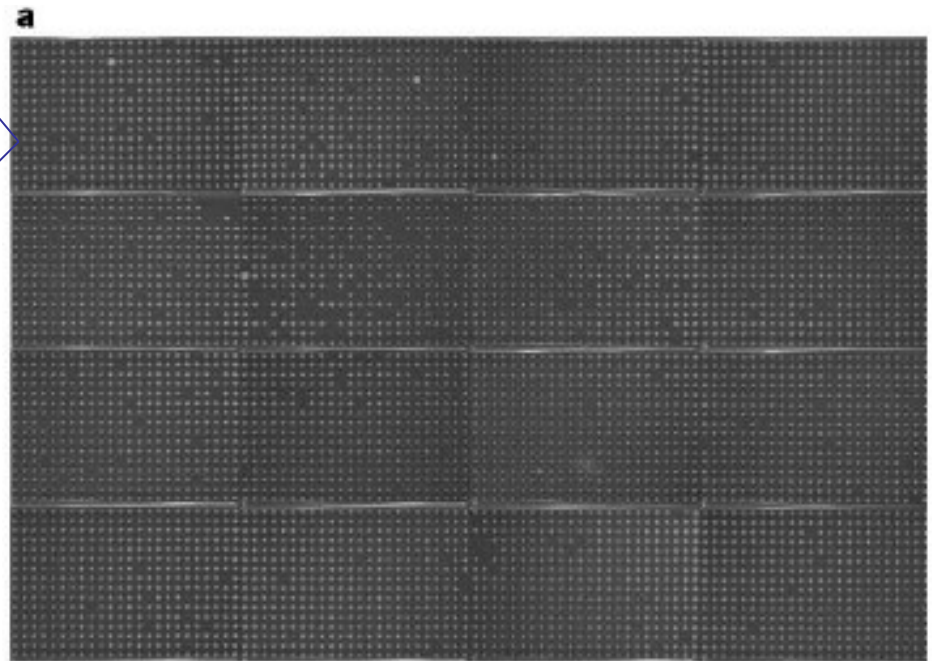


Mat α buňky

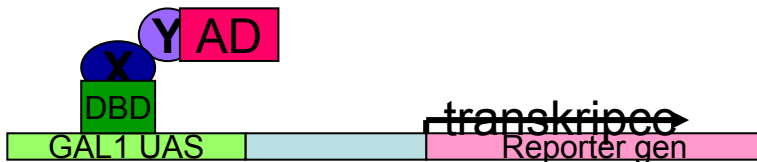


Mat a buňky

8x12 jamek
(96 na misku)
Všechny ORF



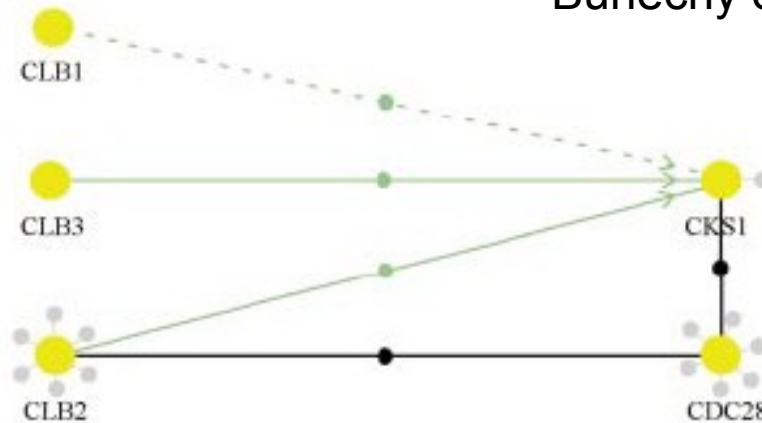
Kvasinkový „INTERACTOME“



Protein „networks“

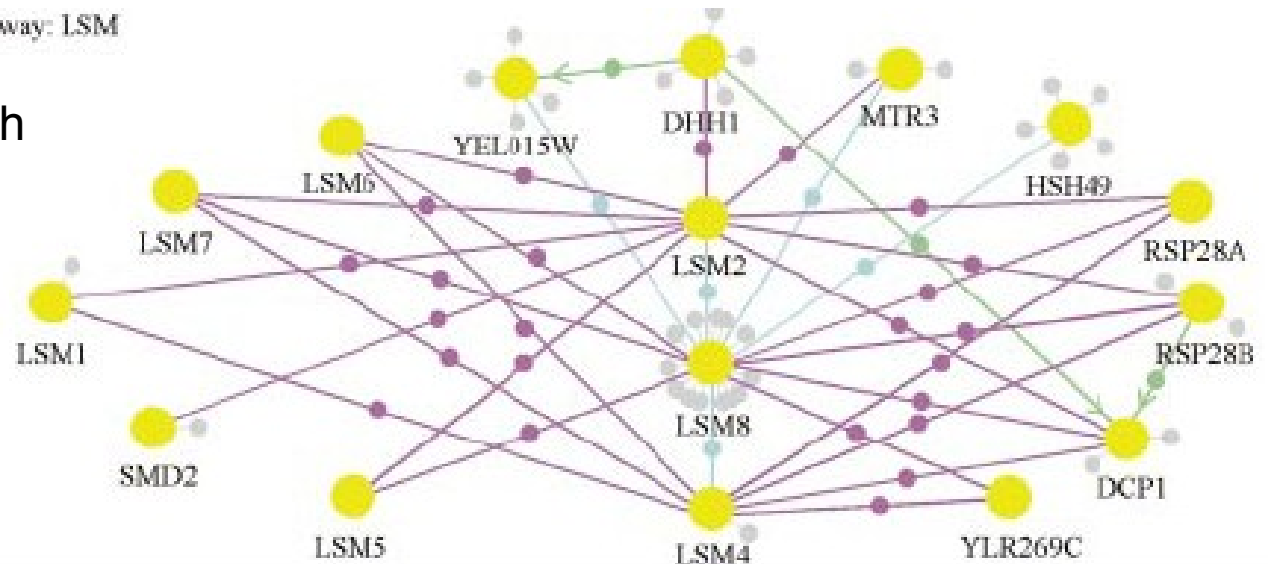
Pathway: CLB/CDC28/CKS1

Buněčný cyklus

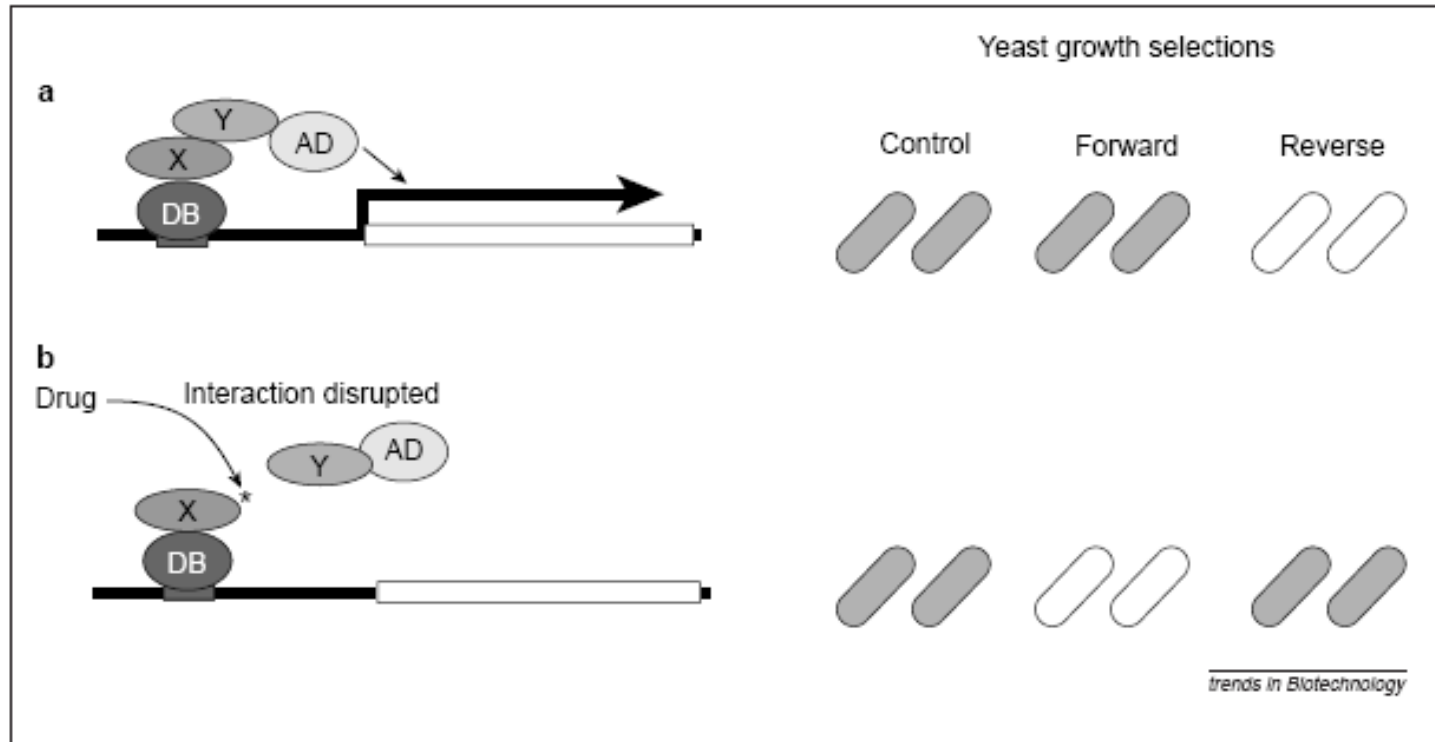


Pathway: LSM

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

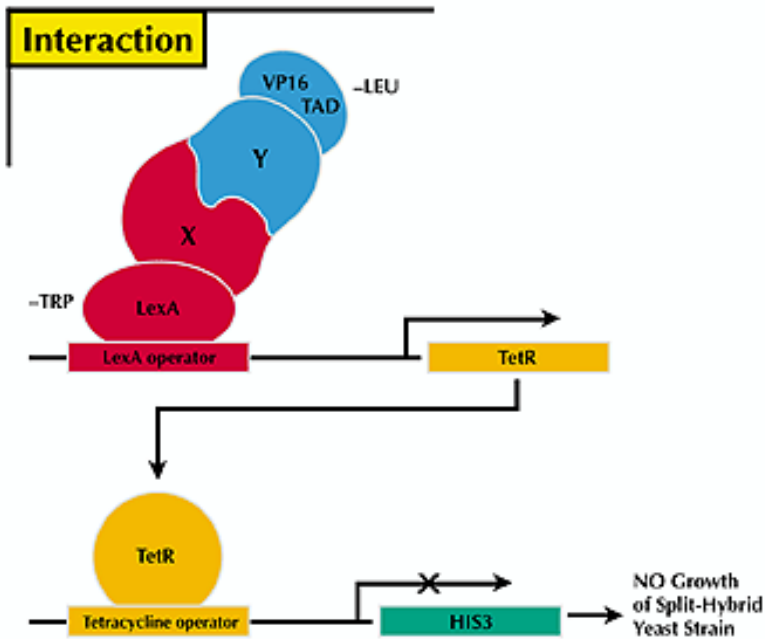


Fig. 1
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells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

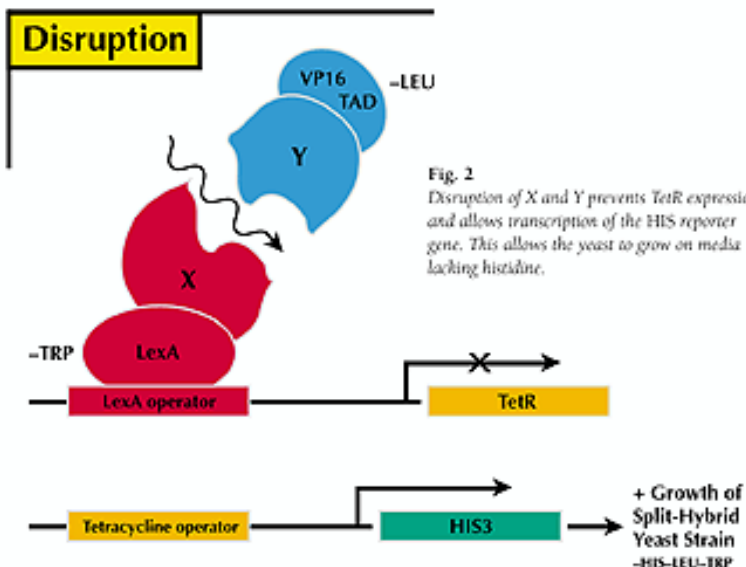


Fig. 2
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.



PCR mutagenesis

Mutated library

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

-5,000 Growth(+)

PNAS (1996) p. 13896

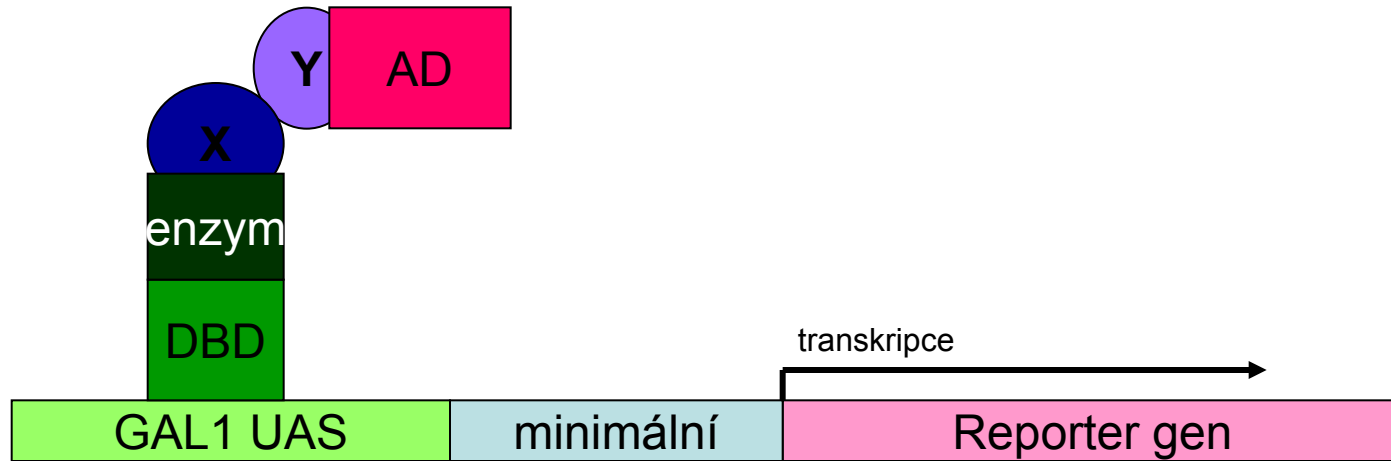
536 X-gal(+)

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

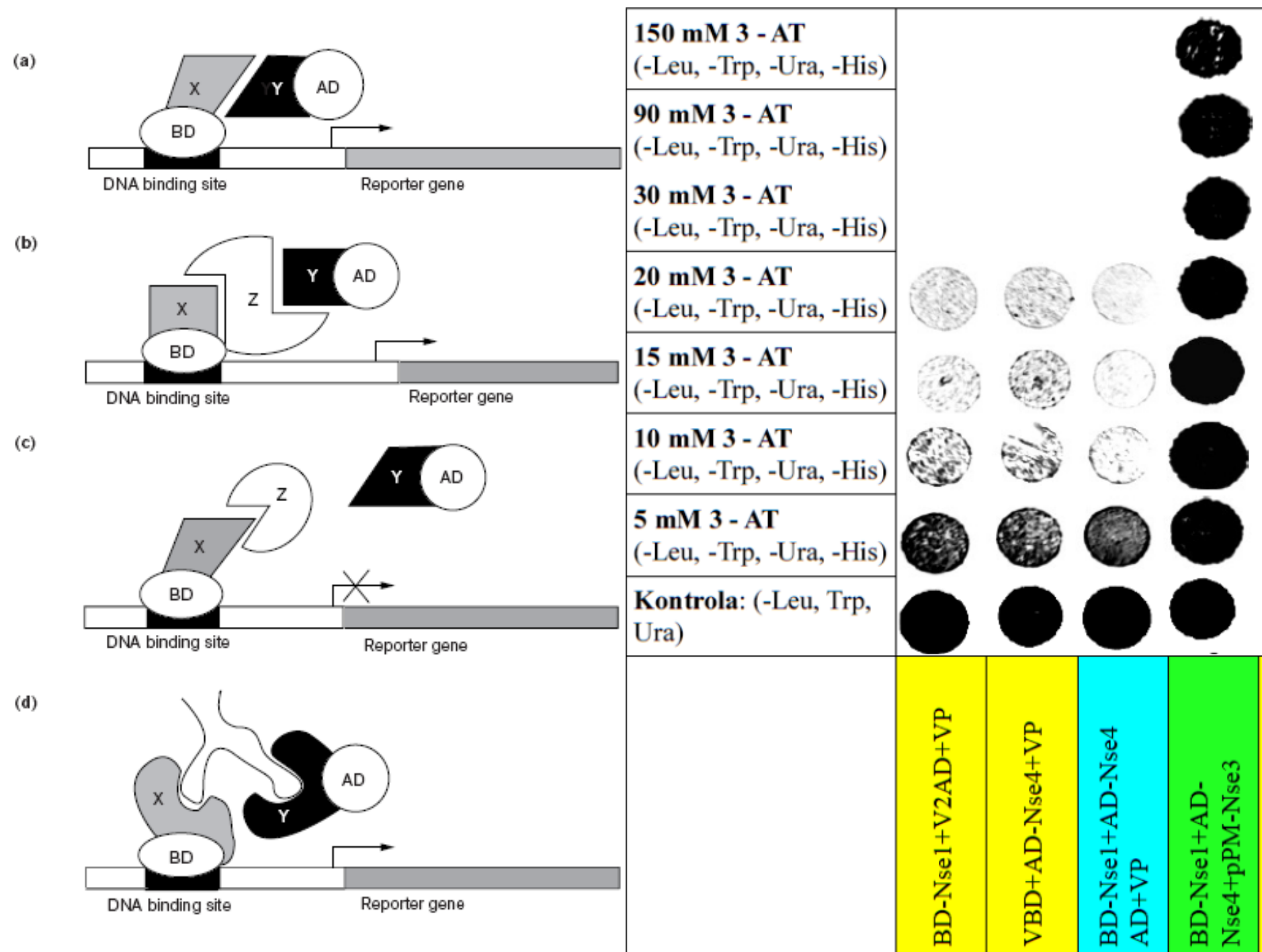
Growth: 152 split-hybrid (+), two-hybrid (-)

70 mutants contained single amino acid mutations

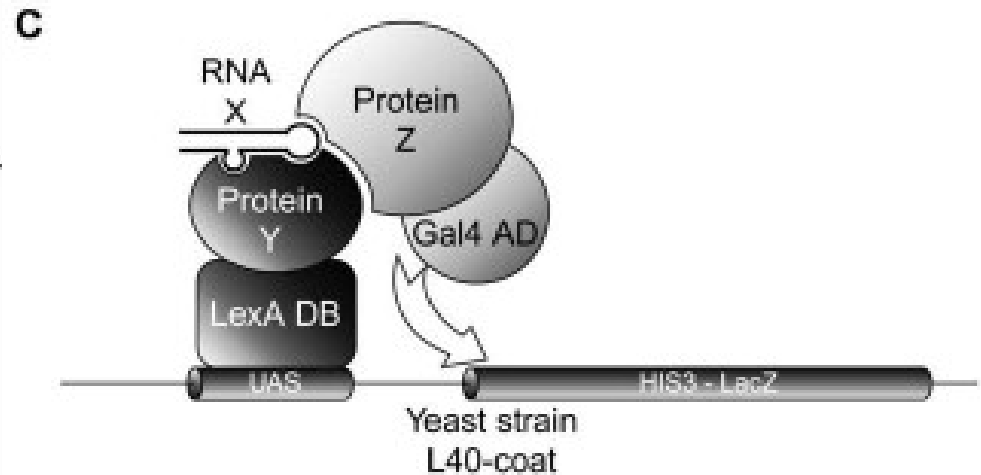
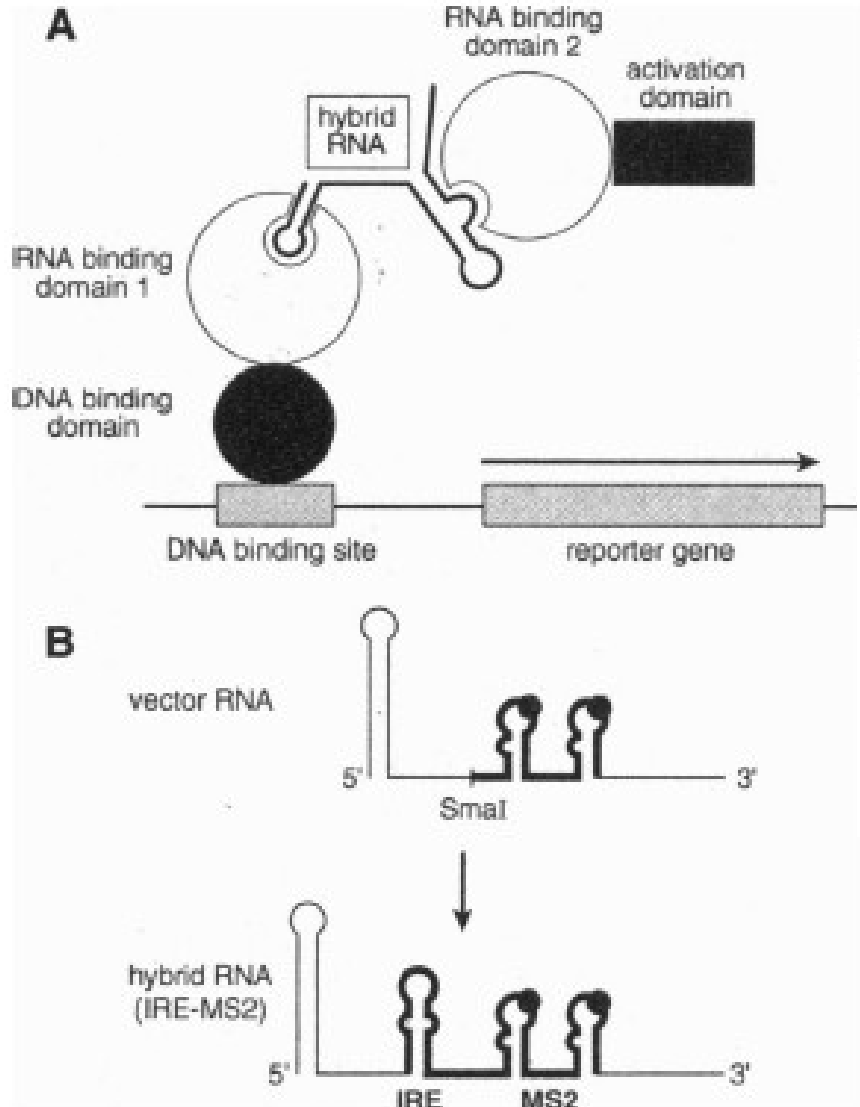
Interakce vyžadující post-translační modifikace



- 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)



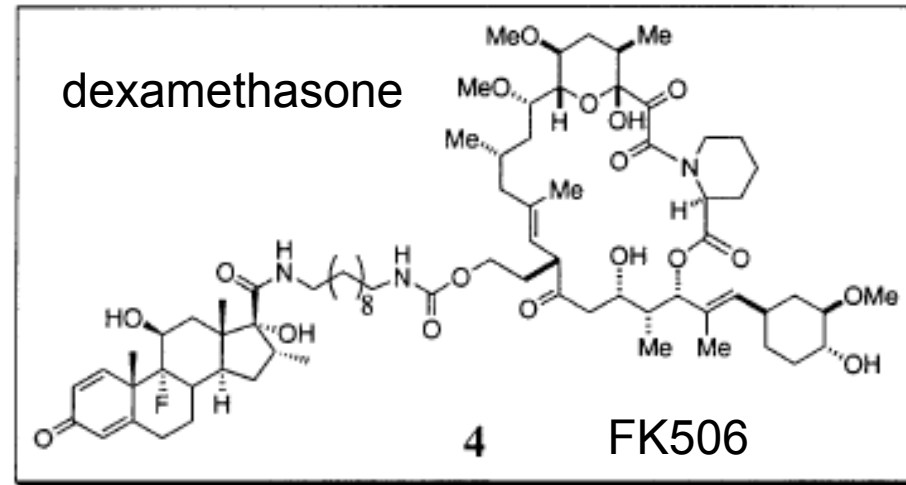
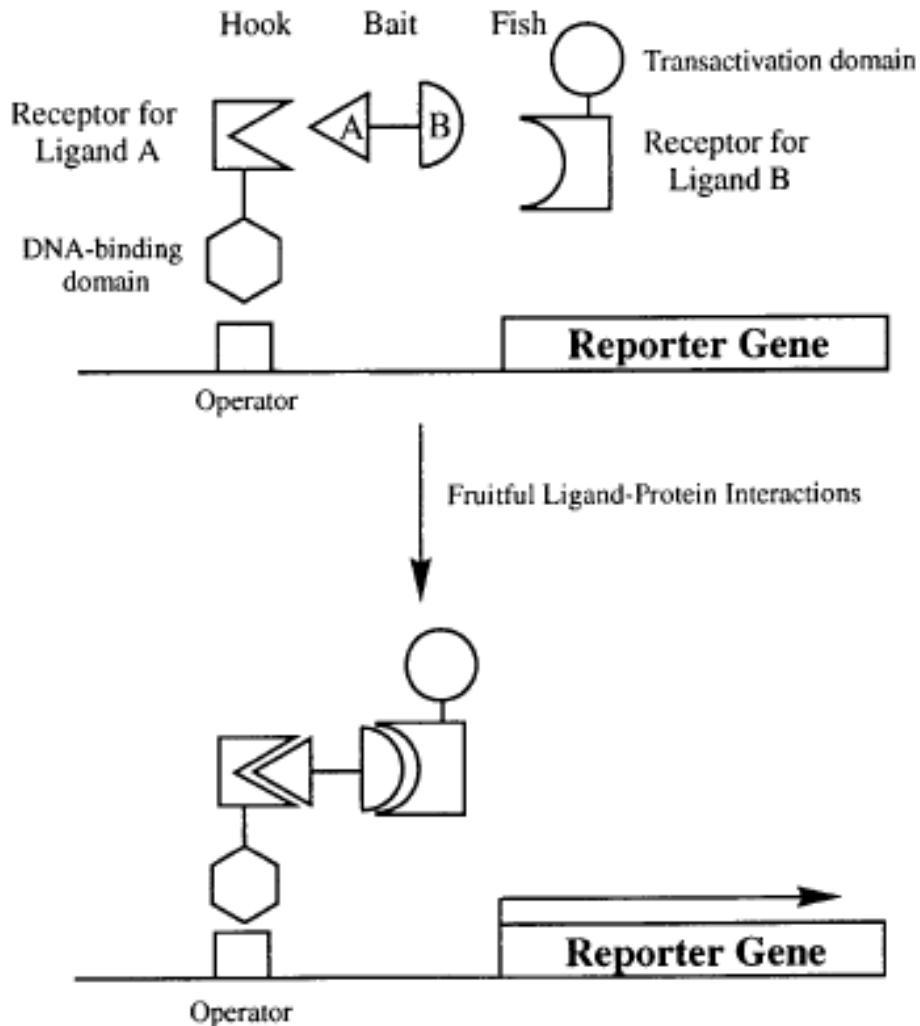
Analýza vazby protein-RNA (Y3H)



FEBS letters (2004) p. 7

Vazba ligand-receptor (Y3H)

glucocorticoid receptor - FKBP12



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

