

Cvičení: 8. a 15.12., A7 (2.17) - pláště, psací a kreslicí potřeby

## Souhrn předchozích přednášek (IS)

- Genetické metody
  - mutageneze/“screen“
  - komplementace **sekrece**
  - identifikace
- Buněčný cyklus
  - Průběh a regulace BC
  - Synchronizace buněk
  - Mechanismy regulace párování - **transkripce**
  - Homothalické kmeny

# Osnova přednášky

- Regulace transkripce
  - Gal4 transkripční faktor
    - transkripční hybridní systémy
  - alternativní kvasinkové systémy
    - hybridní – G-proteiny
    - komplementační – DHFR, ubikvitin










# Regulace transkripce v haploidních buňkách (konstitutivní)

a1, a2 +  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 - transkripční faktory, které ovlivňují transkripci 3 skupin genů

a-spec.= *MFA1,2* (a-feromon), *STE2* ( $\alpha$ -receptor), *STE6*, 14 (úprava a sekrece feromonu)

$\alpha$ -spec.= *MFA $\alpha$ 1,2* ( $\alpha$ -feromon), *STE3* (a-receptor), *STE13*, *KEX2* (proteasy)

haploid spec.= *STE4,18* (podjednotky G-proteinu), *RME1* (inhibitor meiosy)

MAT lokus	Typ buňky	Geny kontrolované MAT lokusem
a1, a2	a haploid	 aSG ON
		 $\alpha$ SG OFF
		 haploid SG ON
-----		
$\alpha$ 1, $\alpha$ 2	$\alpha$ haploid	 aSG OFF
		 $\alpha$ SG ON
		 haploid SG ON
-----		
$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a1, a2	diploid	 aSG OFF
		 $\alpha$ SG OFF
		 haploid SG OFF
-----		

# Struktura promotorů

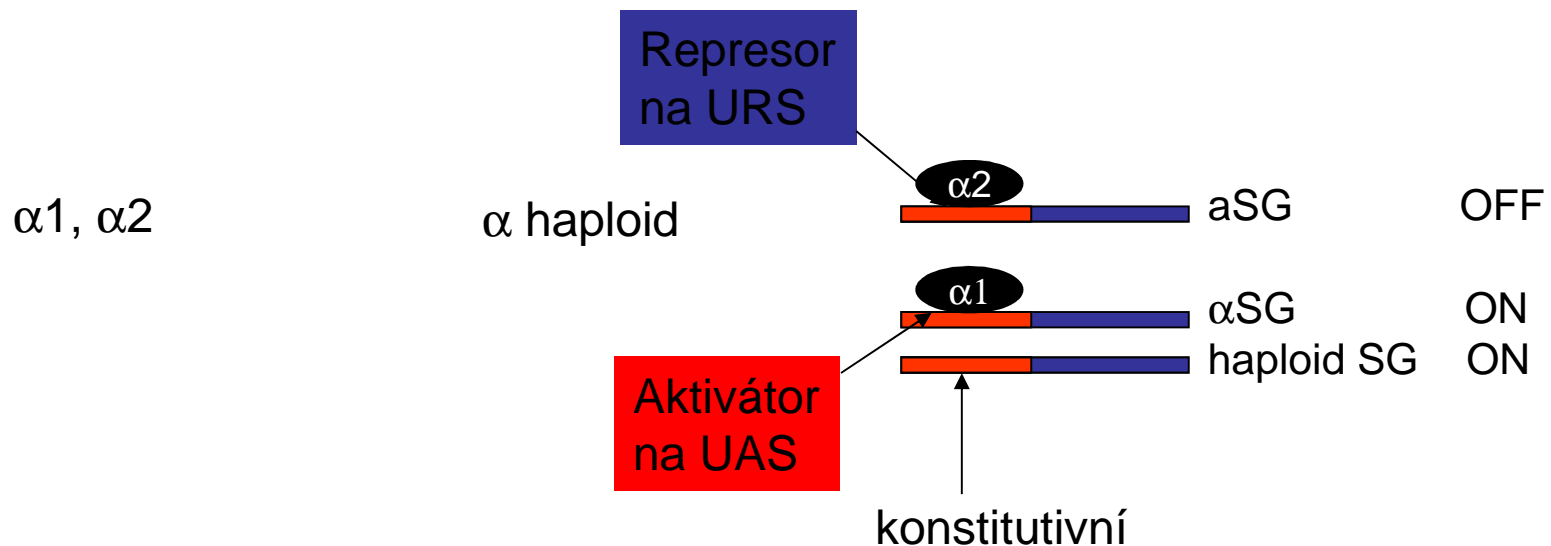
Kvasinkové promotory se liší od bakteriálních a vyšších eukaryot (kvasinky netranskribují z takových promotorů – kvasinkové plasmidy ...)

-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 bakterii)

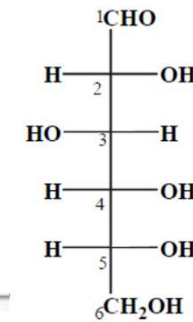
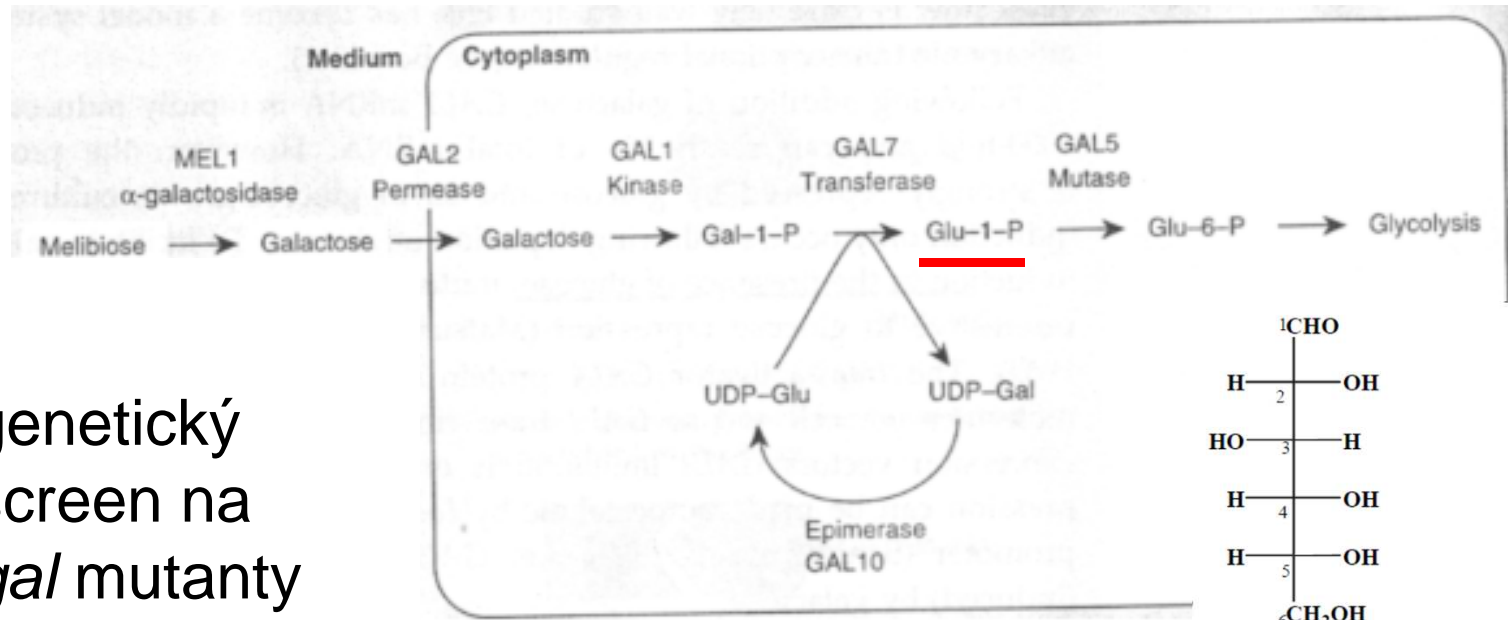
- UAS (upstream activating sequences) a URS (upstream repressing sequences)

- DAS (downstream activating sequences – přímo v sekvenci genu)

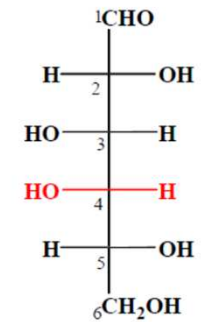


# Regulace metabolické dráhy galaktózy

Různé kvasinky využívají různé cukry (viz přednáška o určování kvasinek)



D-glucose

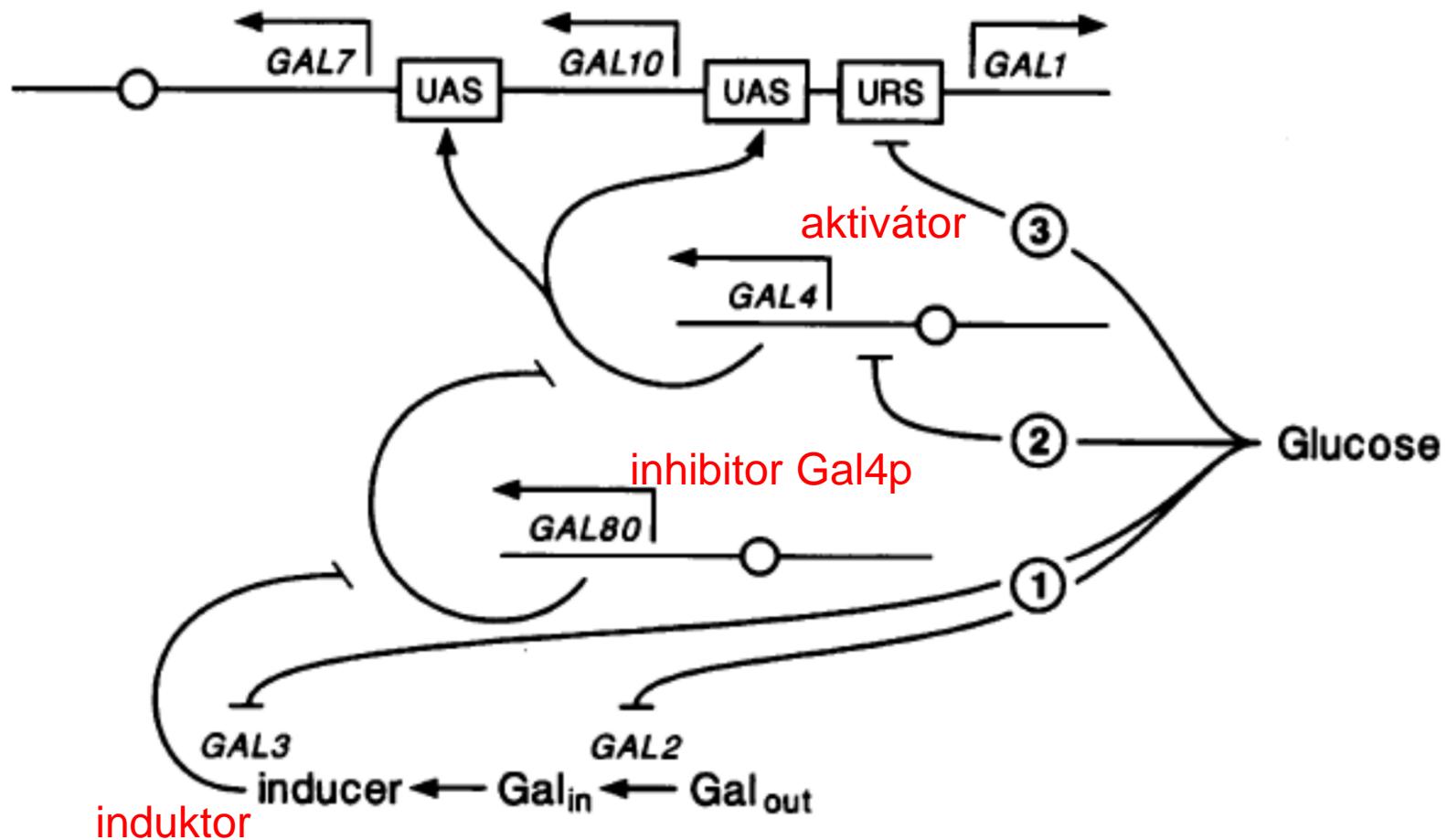


D-galactose

genetický  
screen na  
*gal* mutanty

- 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

# Regulace transkripce *GAL* genů



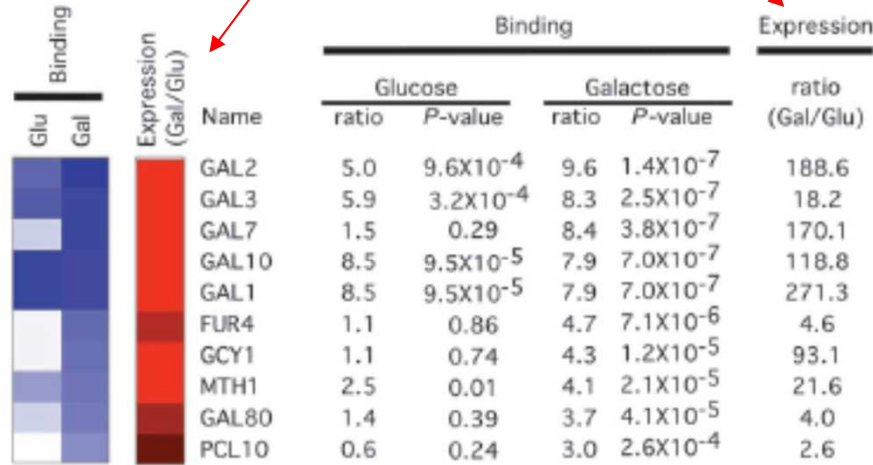
- glukosa reprimuje transkripci *GAL* genů na různých úrovních
  - URS v promotorech *GAL1* genu
  - reprimuje transkripci *GAL4* transkripčního aktivátoru
  - reprimuje *GAL3* induktor a *GAL2* permeasu



# ChIP Gal4p

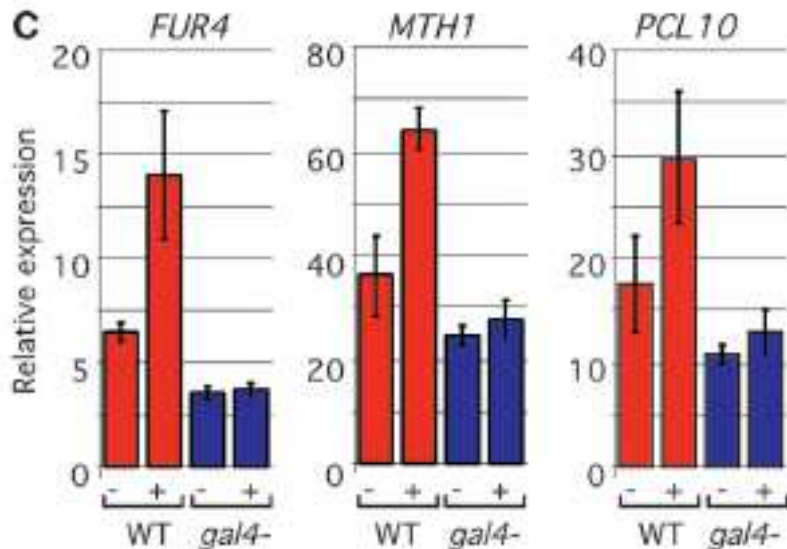
# microarray po galaktose

A

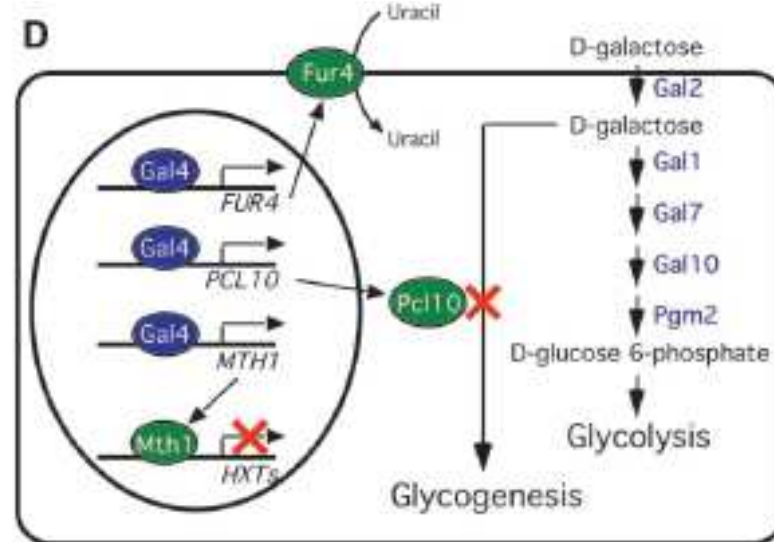


FUR4 zvyšuje množství uracilu pro UDP-Gal  
 MTH1 potlačuje transport glukosy (zlepšuje příjem gal)  
 PCL10 potlačuje glyconeogenezi (maximalizuje zisk z gal)

C

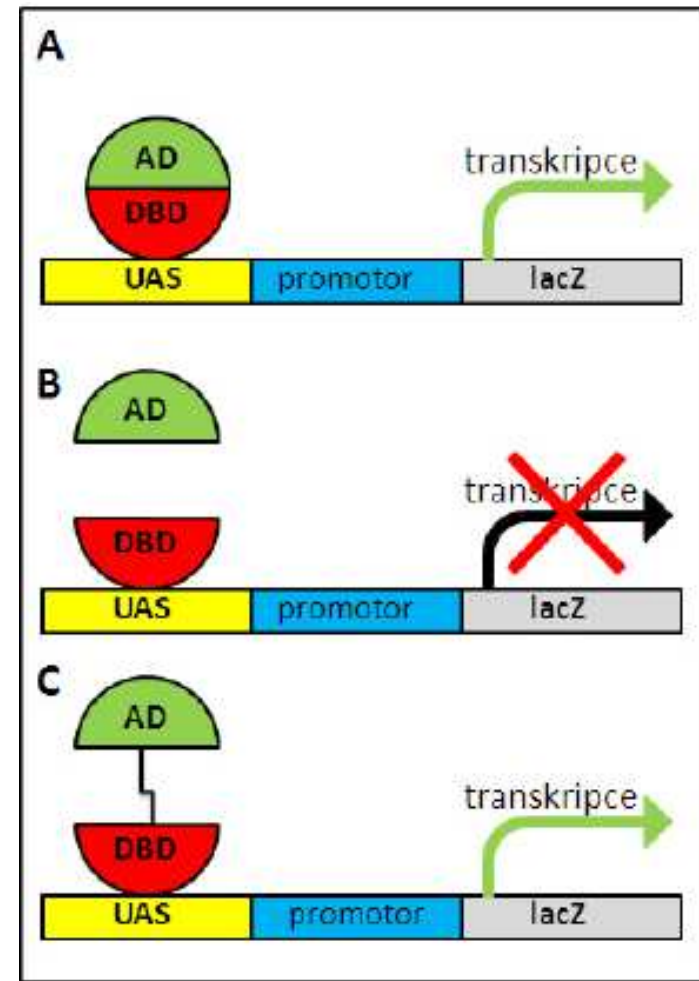
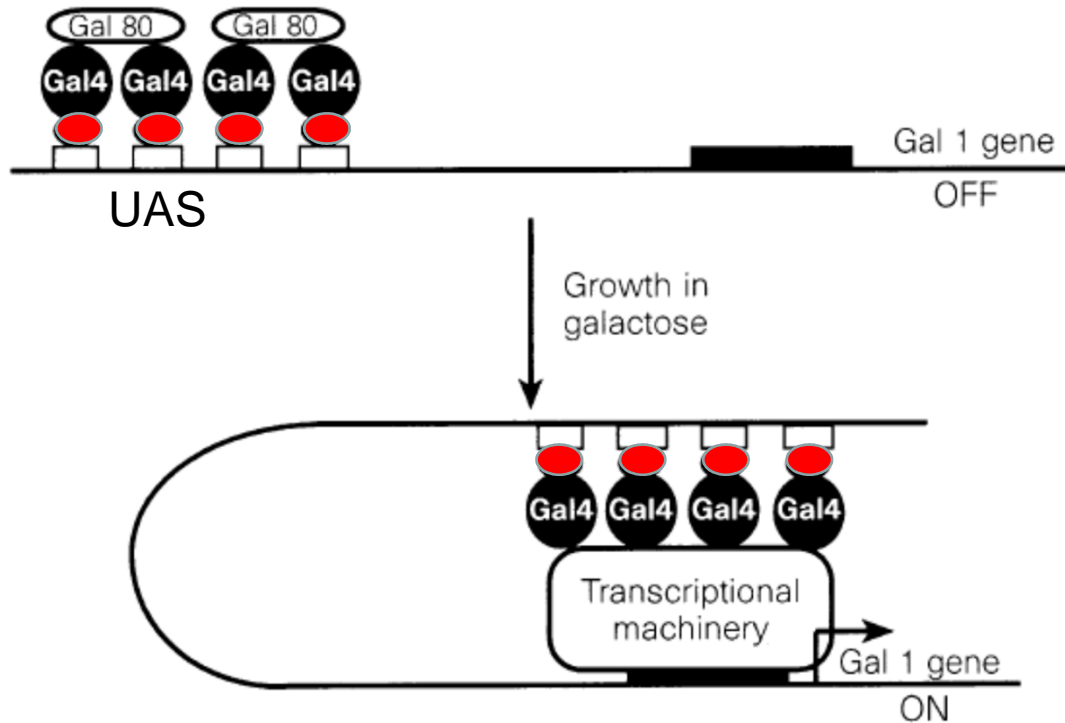


D



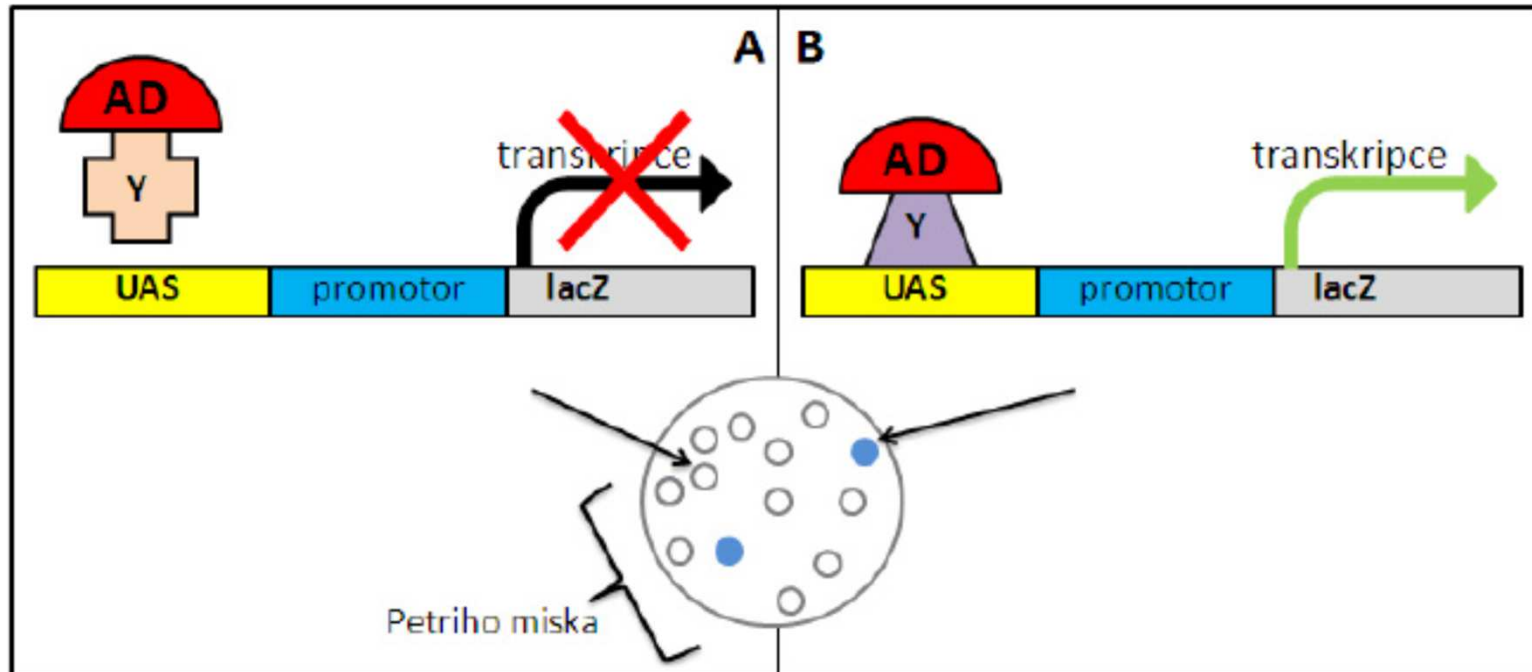


# Transkripční aktivátor Gal4p



Luban a Goff, CO Biotech, 1995  
Ptashne a Gann, Science, 1997

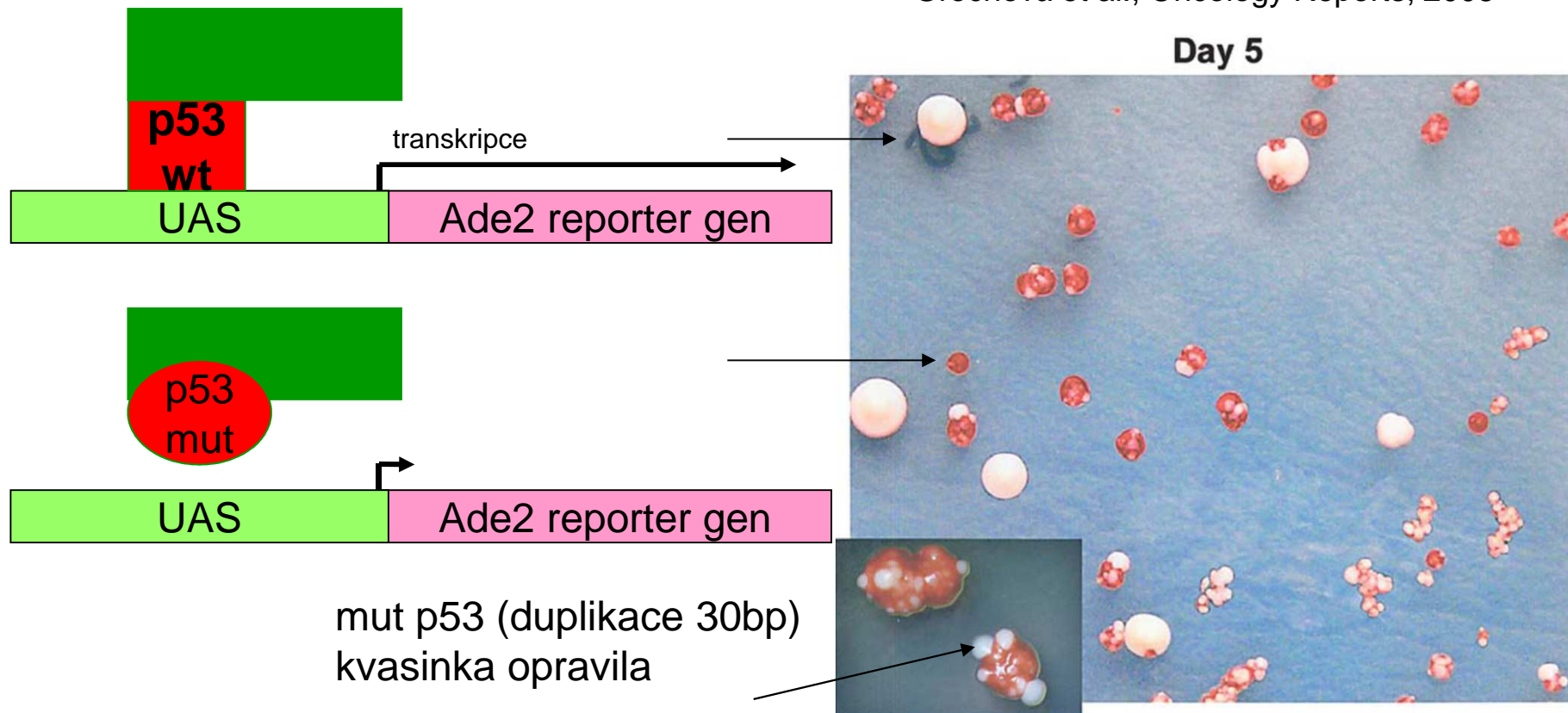
# Vznik 1-hybridních systémů



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)



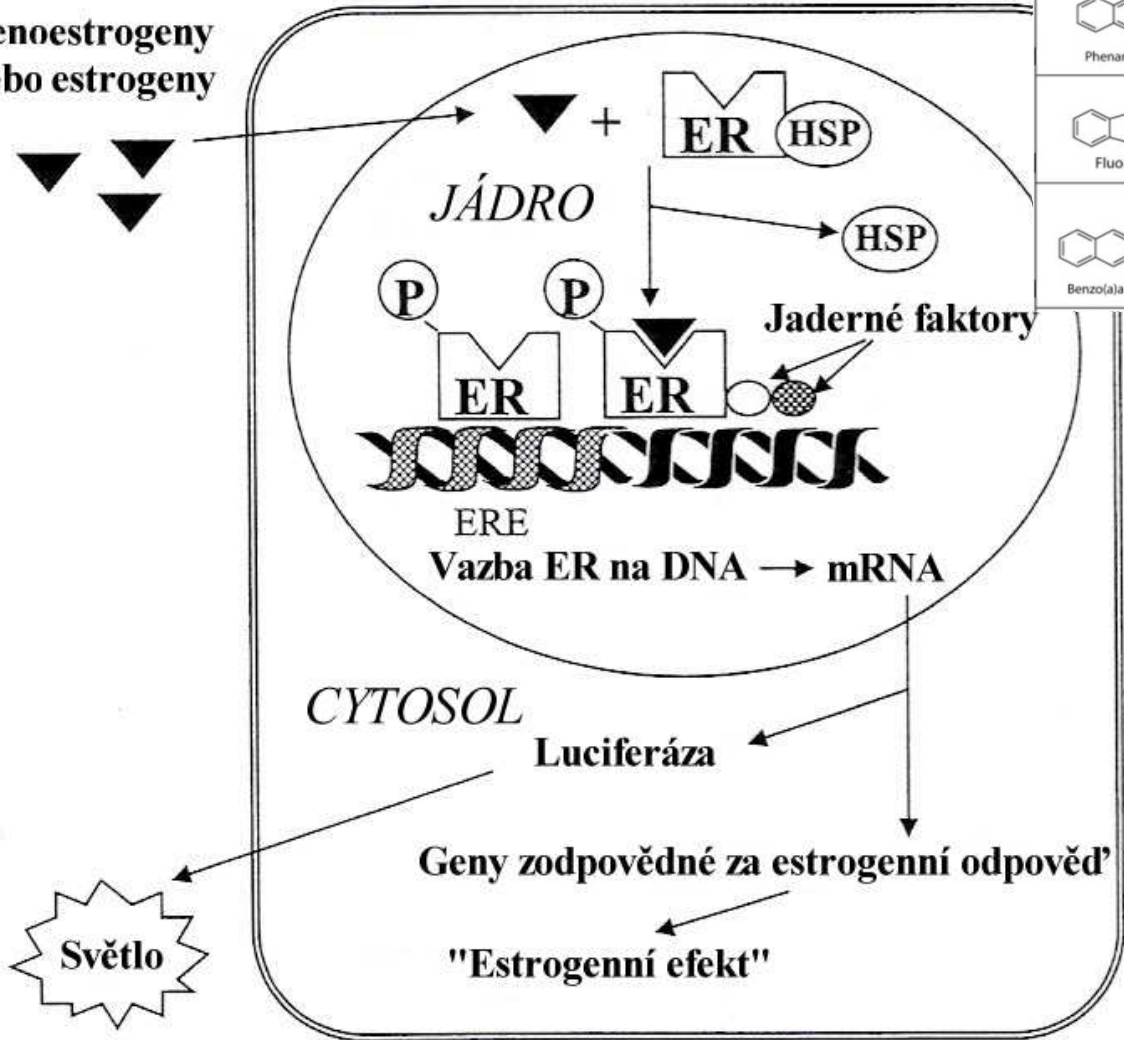
### Analýza funkčních vlastností p53

- stanovení aberací p53 v klinickém materiálu - imunoanalýza, FISH, sekvenace p53
- určení funkčního statutu - stanovení transaktivačních schopností p53 metodou **FASAY (functional analysis of separated alleles in yeast)** - stanovení transaktivačních vlastností p53 prostřednictvím speciálně upraveného kvasinkového kmene *Saccharomyces cerevisiae* yIG397



# Toxikologické aplikace

Xenoestrogeny  
nebo estrogeny



<chem>c1ccc2ccccc2c1</chem> Naphthalene	<chem>c1ccc2ncncc2c1</chem> Quinoline	<chem>Cc1ccc2ncncc2c1</chem> 6-methylquinoline	<chem>c1ccc2c(c1)cnc2</chem> Isoquinoline	<chem>c1ccc2ncncc2c1</chem> Quinazoline	<chem>c1ccc2ncncc2c1</chem> Phthalazine
<chem>c1ccc2cc3ccccc3cc2c1</chem> Anthracene	<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> Acridine	<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> Phenazine			
<chem>c1ccc2cc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Phenanthrene	<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> Benzo(h)quinoline	<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> Phenanthridine	<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> 1,10-phenanthroline	<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> 1,7-phenanthroline	<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> 4,7-phenanthroline
<chem>c1ccc2c(c1)ccc3ccccc23</chem> Fluorene			<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> Carbazole		
<chem>c1ccc2cc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Benzo(a)anthracene	<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> Benzo(a)acridine		<chem>c1ccc2c(c1)c3ccccc3n2</chem> Benzo(c)acridine		

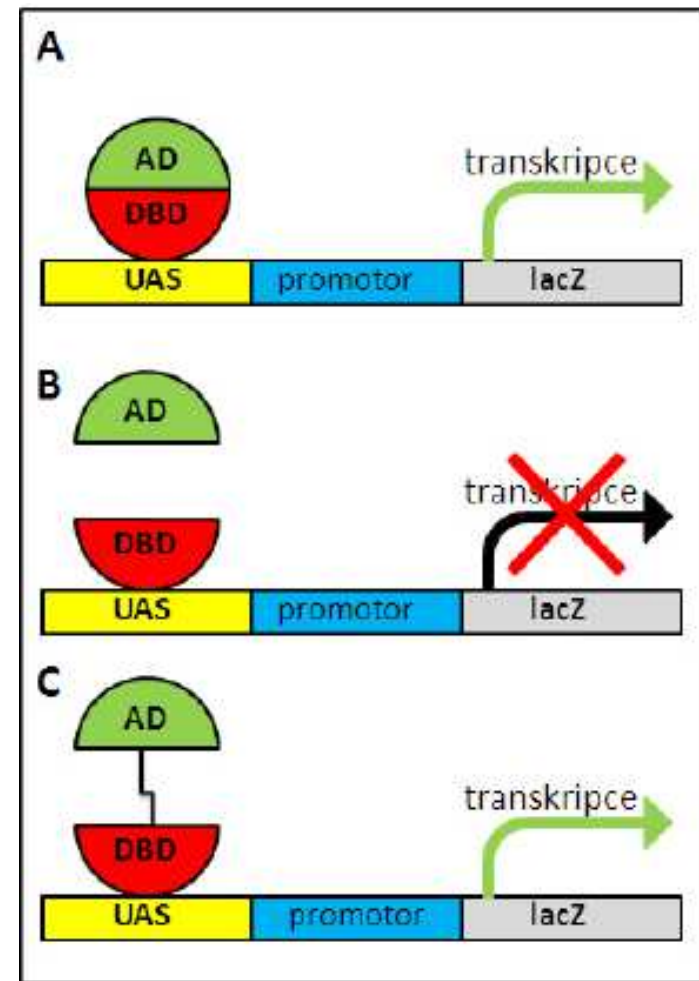
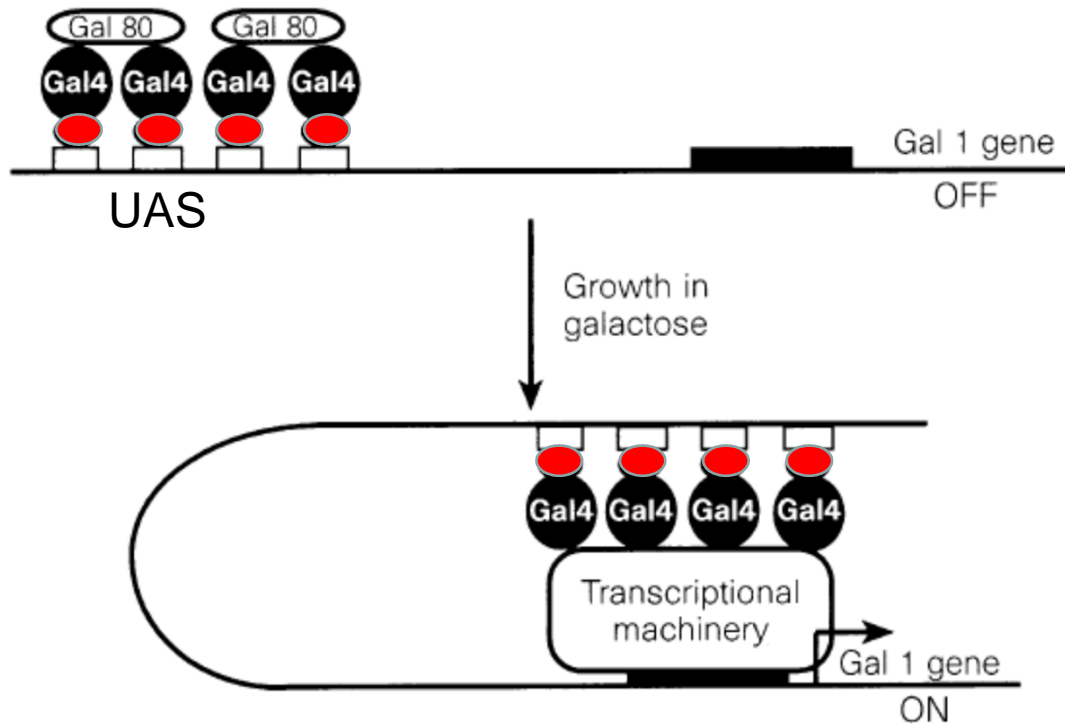
V tomto systému byly testovány různé polutanty – efekt na „estrogenní“ dráhu

RECETOX/CETOCEON  
(Dr. Čupr/prof. Holoubek)

Bartos et al, Env Tox, 2006

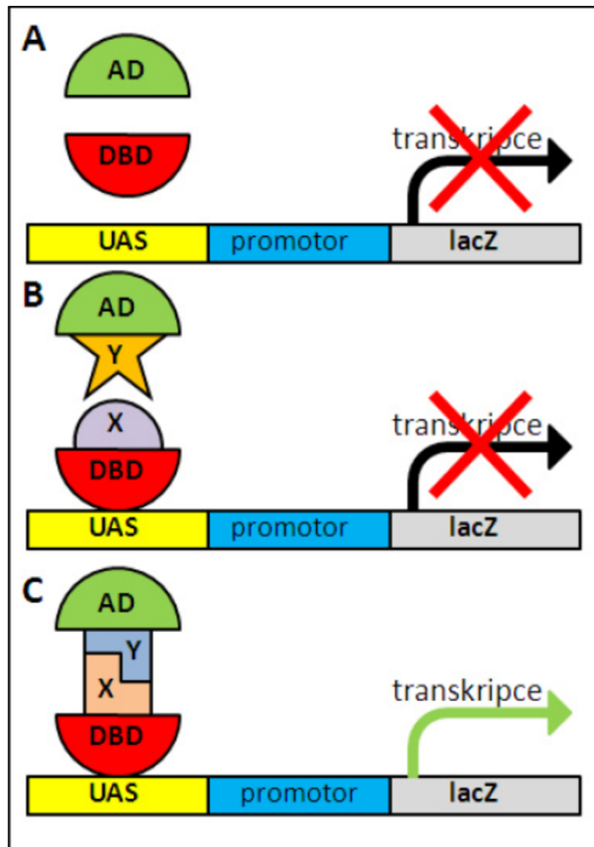


# Vznik 2-hybridních systémů



Luban a Goff, CO Biotech, 1995  
Ptashne a Gann, Science, 1997

# BD a AD domény lze zaměnit



## Prey activation domains

*S. cerevisiae* Gal4 AD

Gal4 activating region II (aa 768 to 881), moderate strength (178)

Herpes simplex virus VP16 AD

VP16 activating region (aa 413 to 490), high strength (673)

*E. coli* B42 AD

Bacterial polypeptide, weak strength (234)

## Bait DNA-binding domains

*S. cerevisiae* Gal4 DBD\*

Binds *GAL1*, *GAL2*, and *GAL7* upstream activating sequences (178)

*E. coli* repressor LexA DBD\*

Binds LexA operator sequences (234)

*H. sapiens* estrogen receptor DBD

Binds estrogen receptor elements (374)

Bacteriophage  $\lambda$  repressor cI

Binds cI operator sequences (580)

Tet repressor

Binds Tet operator sequences (716)

# Klasický Y2H systém

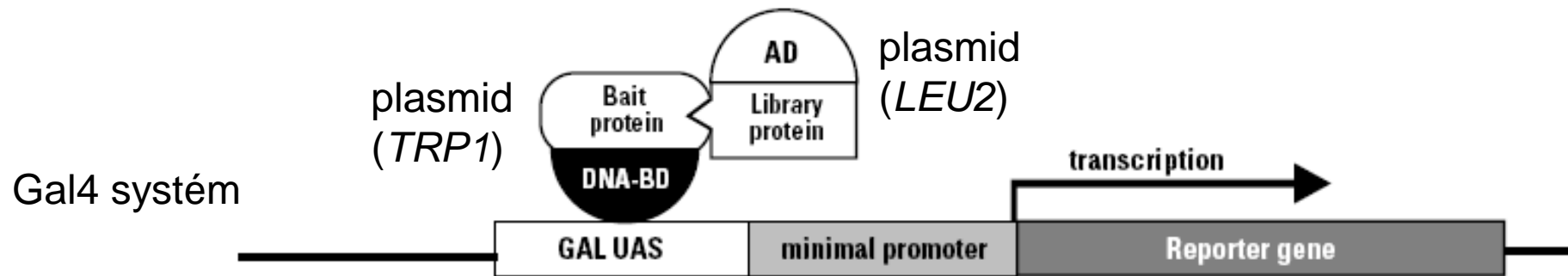


Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

AH109

*MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3 :: MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*

Nejčastěji používaný kmen PJ69-4a

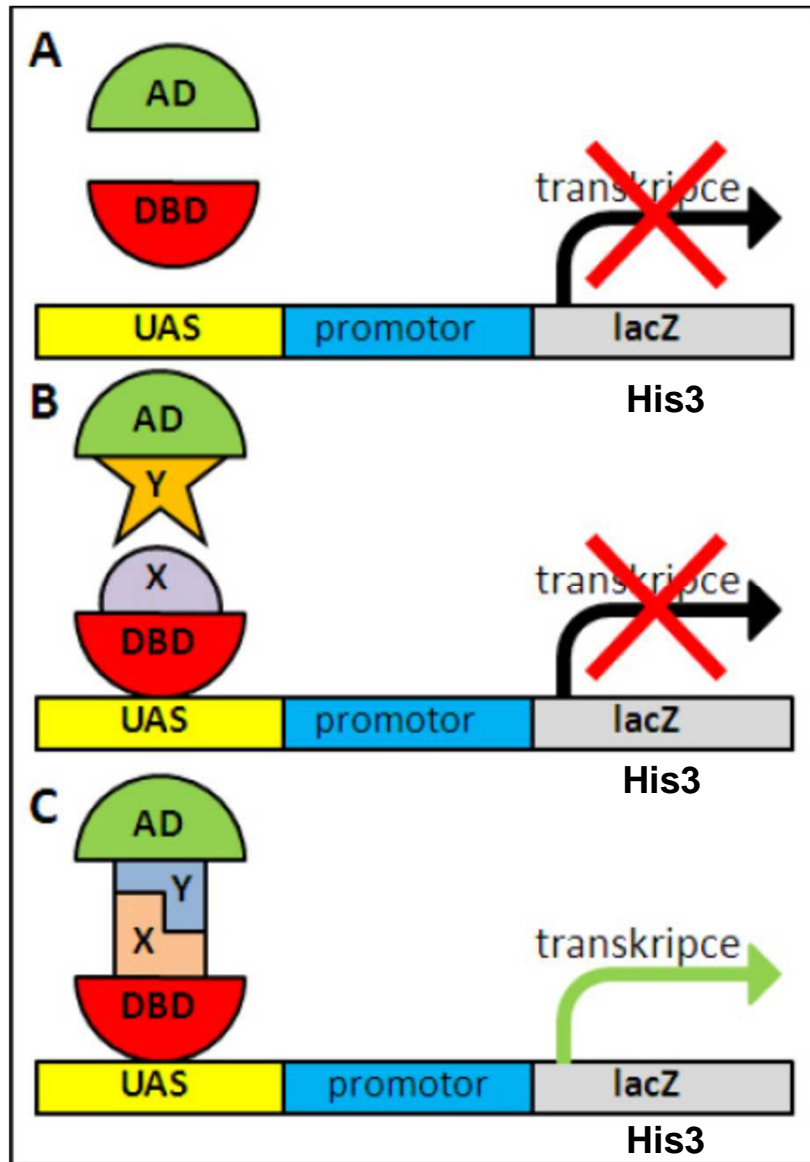
## AH109 Constructs

různé promotory

GAL1 UAS	GAL1 TATA	velmi citlivý (3AT) <b>HIS3</b>
GAL2 UAS	GAL2 TATA	velmi stringetní <i>ADE2</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	semikvanitativní (β-gal) <i>lacZ</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>MEL1</i>



# 2-hybridní systém



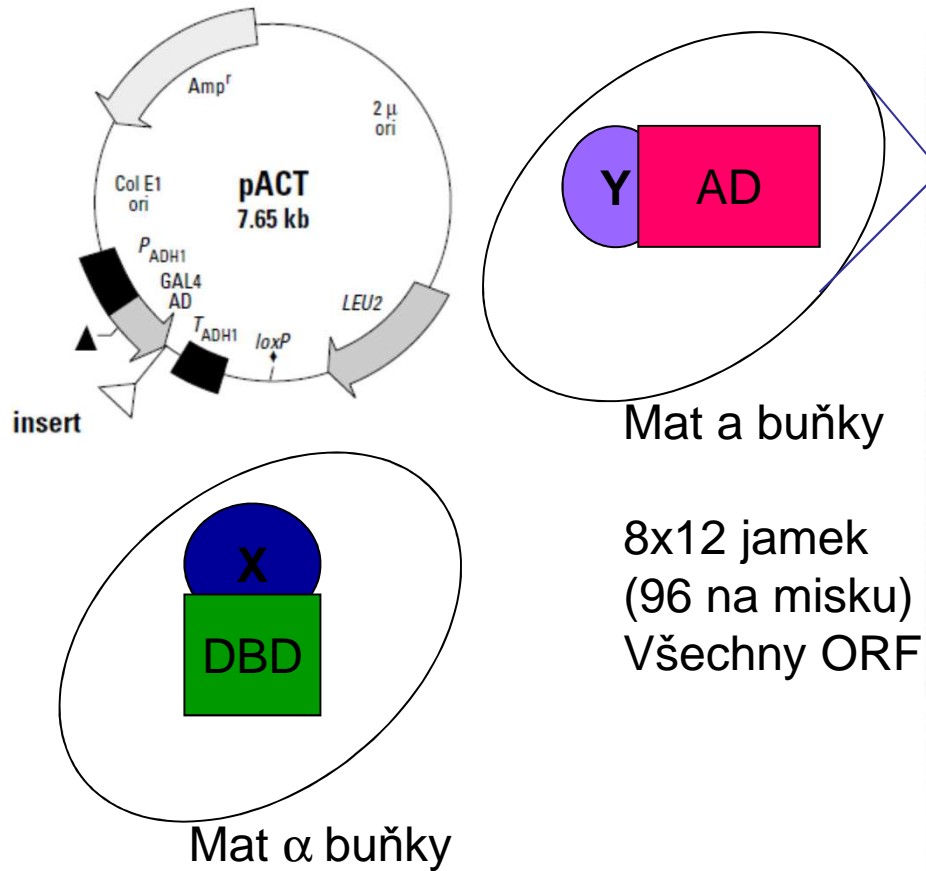
60 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
30 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
20 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
15 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
10 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
5 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
Kontrola (- Leu, Trp)			
	BD-Nse3 + V1AD	BD-Nse3 + AD-Nse1 (1-116)	VBD + AD-Nse1 (1- 116)

# Reportérové geny

## Reporter genes

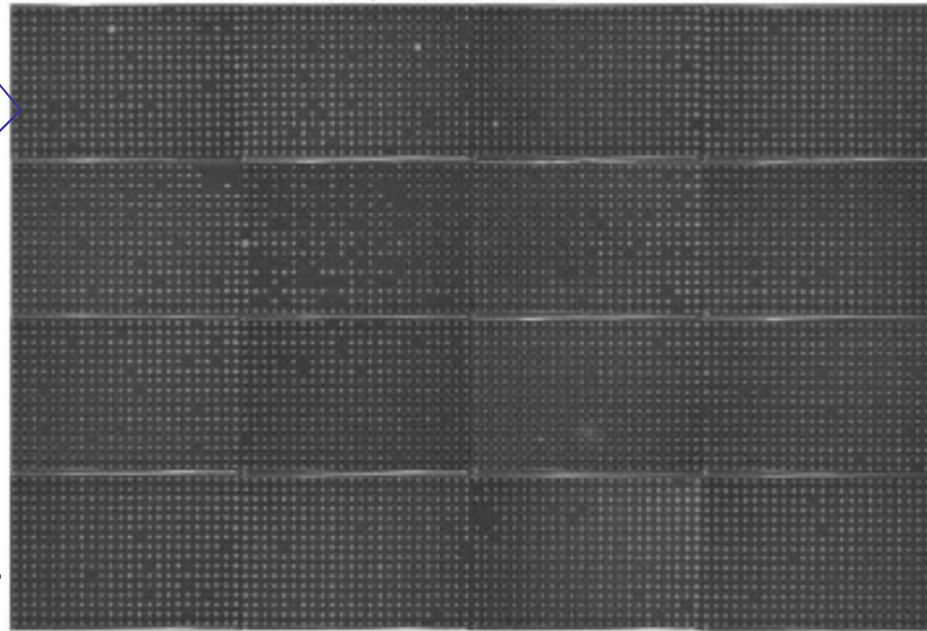
<i>E. coli lacZ*</i>	$\beta$ -Galactosidase chromogenic reporter (178)	
<i>S. cerevisiae MEL1</i>	Secretory $\alpha$ -galactosidase chromogenic reporter (5)	kvantitativní
<i>E. coli gusA</i>	$\beta$ -Glucuronidase chromogenic reporter (580)	
<i>Aspergillus oryzae lacA3</i>	Engineered secretory $\beta$ -galactosidase chromogenic reporter (318)	
<i>S. cerevisiae HIS3*</i>	Prototrophic reporter for histidine biosynthesis (673)	
<i>S. cerevisiae LEU2*</i>	Prototrophic reporter for leucine biosynthesis (234)	
<i>S. cerevisiae URA3</i>	Prototrophic reporter for uracil biosynthesis (374)	auxotrofie (media bez ...)
<i>S. cerevisiae ADE2*</i>	Prototrophic reporter for adenine biosynthesis (299)	
<i>S. cerevisiae LYS2</i>	Prototrophic reporter for lysine biosynthesis (580)	
<i>Aequorea victoria GFPuv</i>	Fluorescent reporter (107)	
<i>EGFP</i>	Fluorescent reporter (613)	FACSorting
Yeast <i>EGFP</i>	Fluorescent reporter for flow cytometry screens (88)	
<i>Aureobasidium pullulans AUR1-C</i>	Aureobasidin A resistance reporter (167)	rezistence (media s aureob)

# Kvasinkový „INTERACTOME“

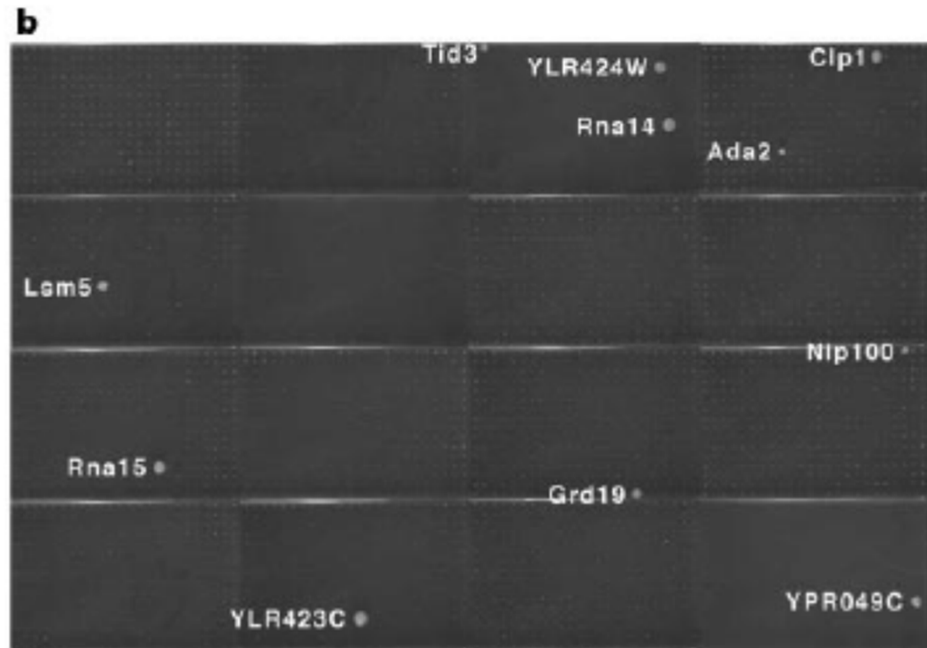
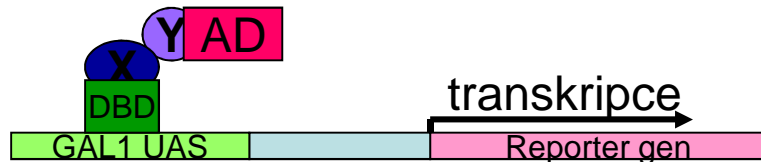


Mat a buňky

8x12 jamek  
(96 na misku)  
Všechny ORF



Místo transformací dvou plasmidů do jedné buňky byly BD plasmidy v α buňkách a AD v a buňkách – párováním byly vytvořeny jejich kombinace

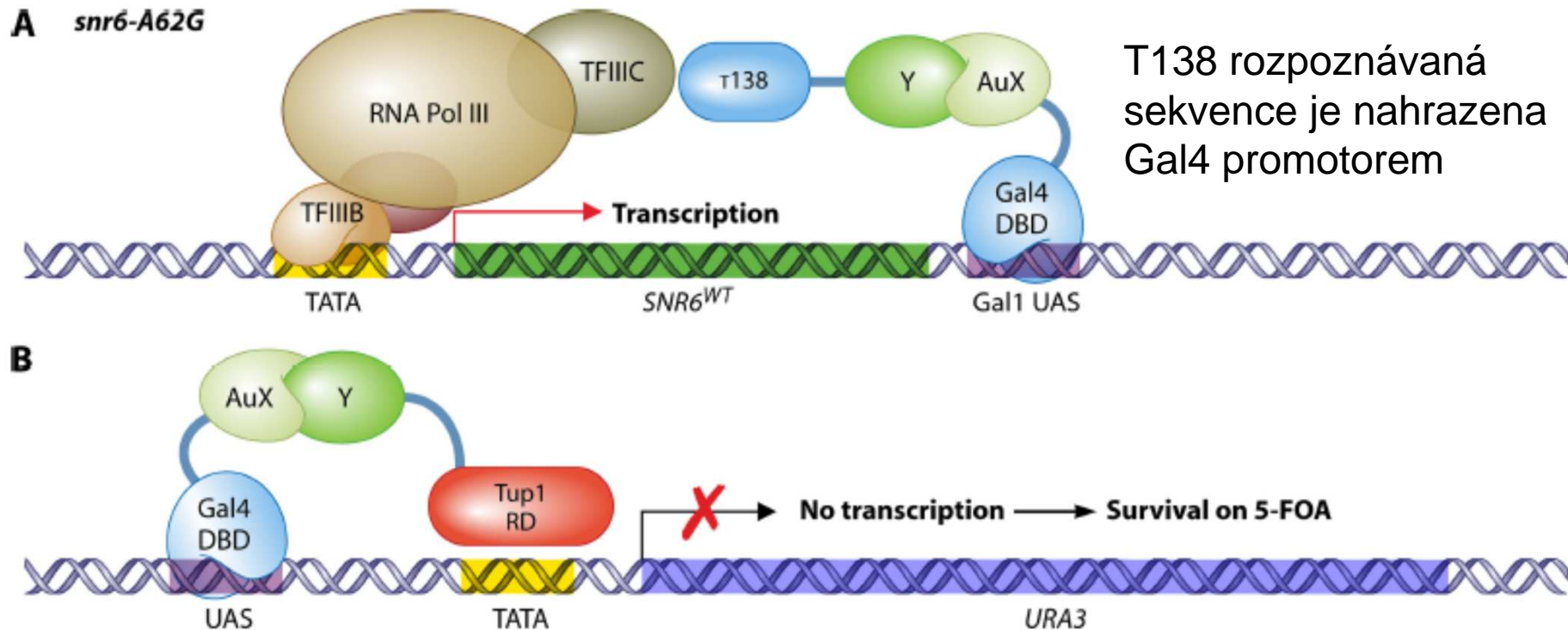


# Alternativní jaderné systémy

Pokud BD konstrukt „auto-aktivuje“ RNA pol II:

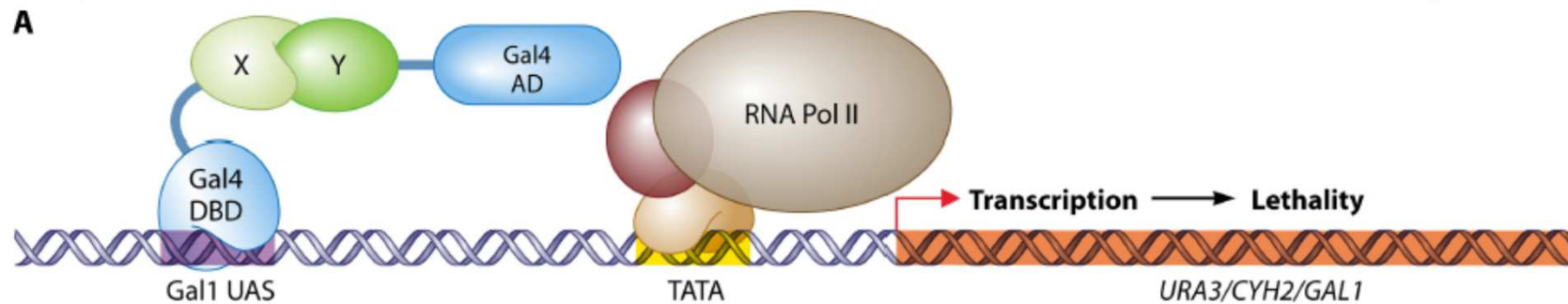
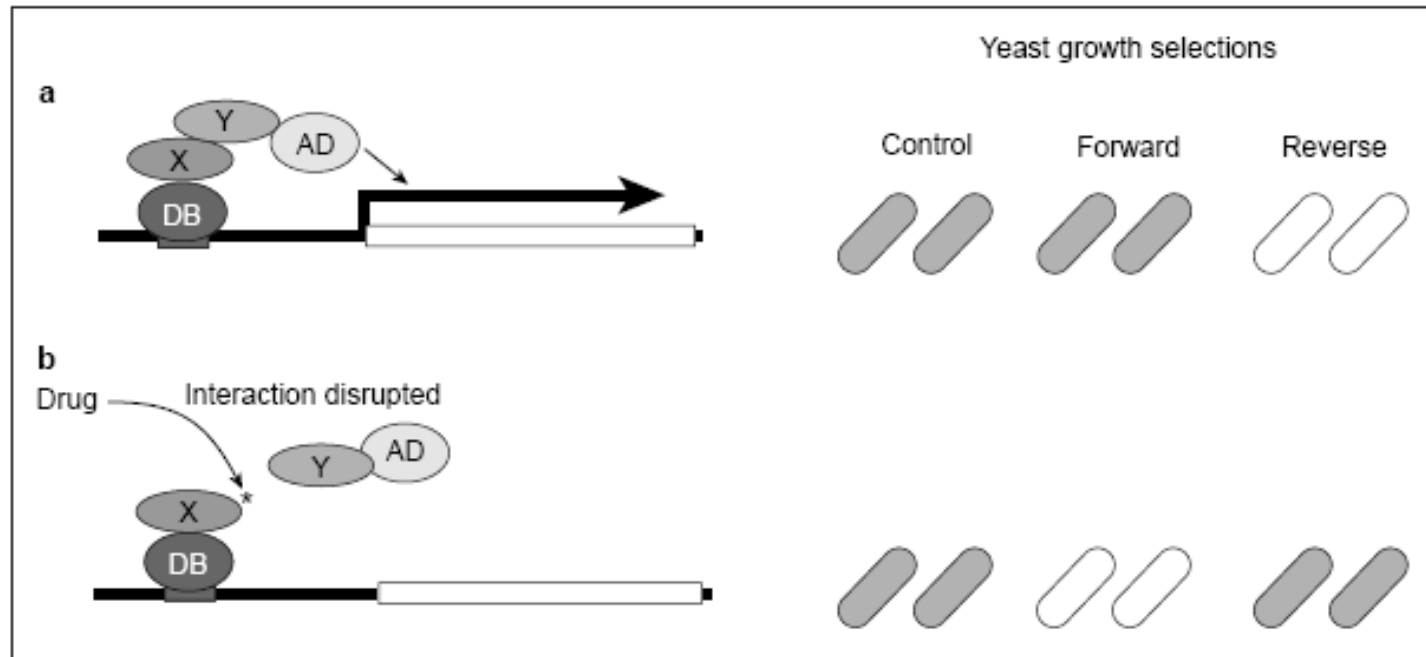
RNA pol III má odlišný mechanismus aktivace

*snr6-A62G* mutace je teplotně sensitivní (potlačení ts hybridním systémem)



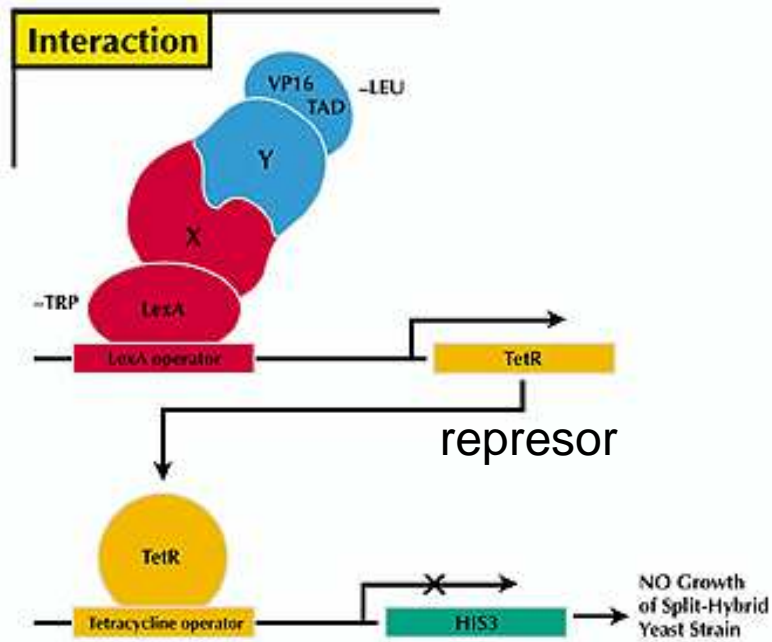
Tup1 je represor, „auto-aktivace je blokována Tup1 represorem (využití 5-FOA pro „pozitivní“ detekci interakce – viz reverzní systémy)

# Reversní systém (Y2H)

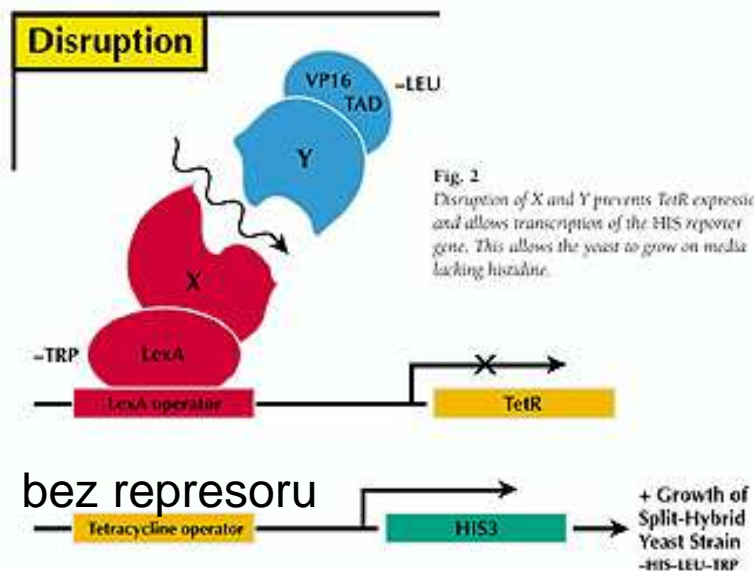


- při použití *URA3* reportéru lze použít toxickou 5-fluoro-orotátovou kyselinu (5-FOA) k negativní selekci tj. interakce povede k záhubě kvasinek, zatímco mutanty neschopné interakce na FOA plotnách porostou (mutanty nebo syntetické látky)

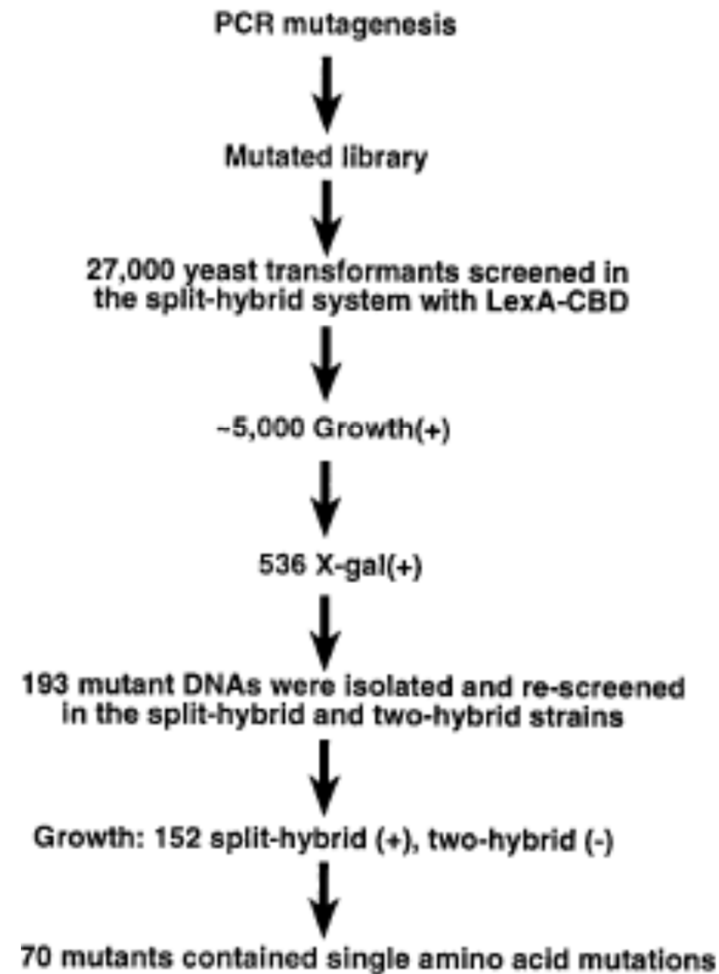
# Split-hybrid systém

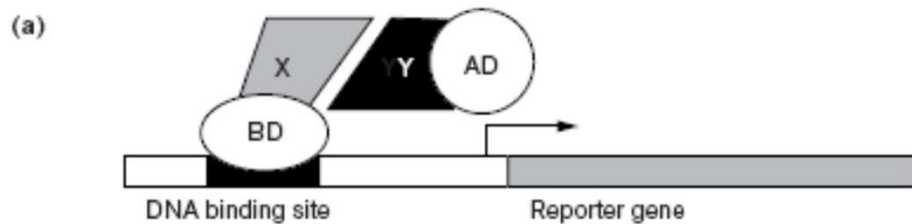


**Fig. 1**  
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making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

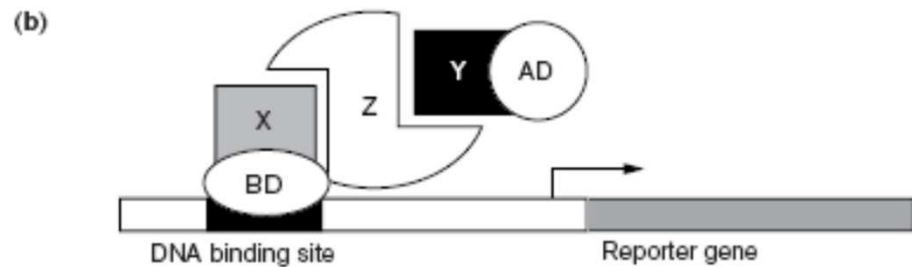


**Fig. 2**  
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.

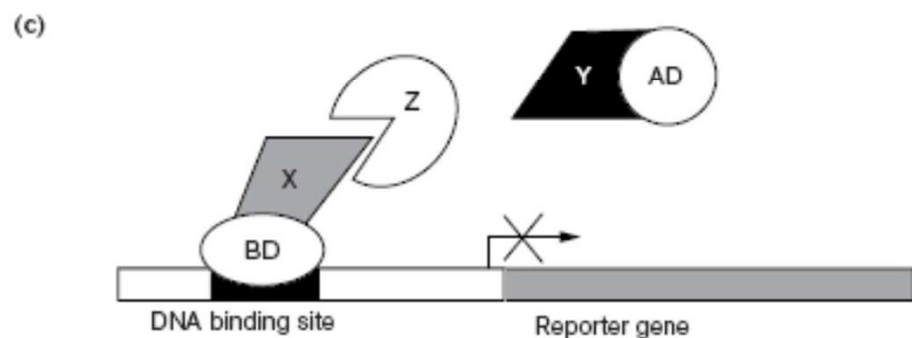




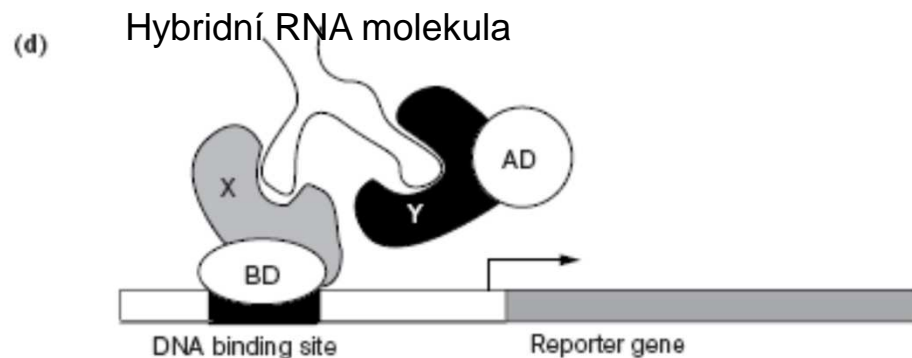
Klasický dvoj-hybridní systém



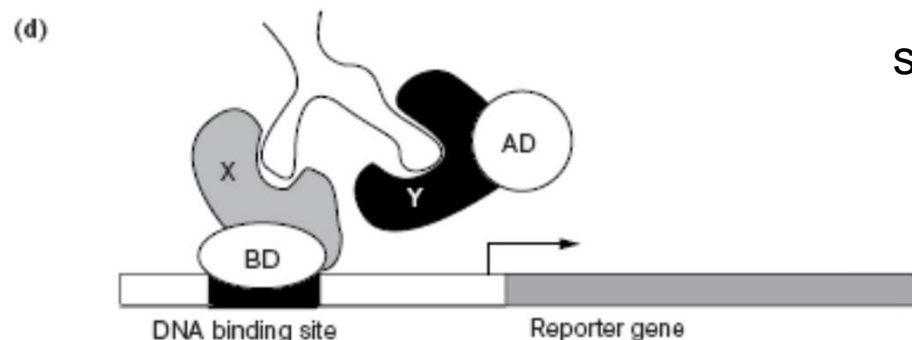
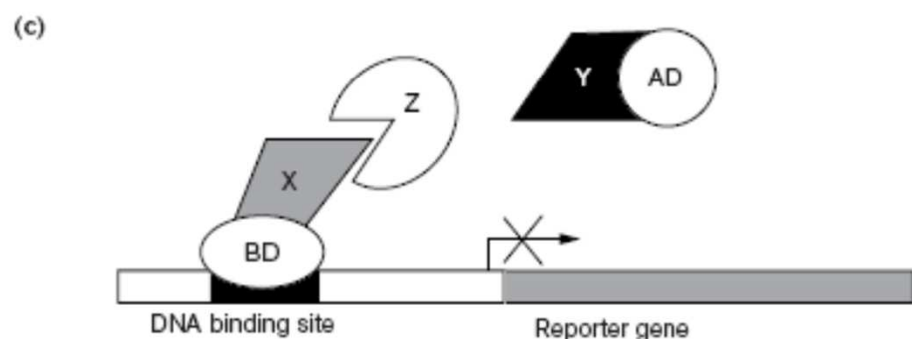
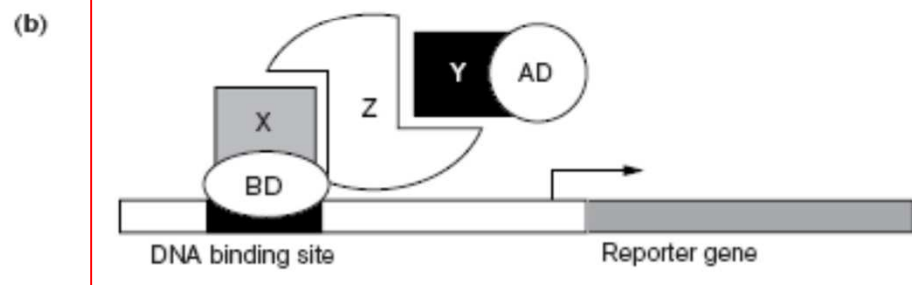
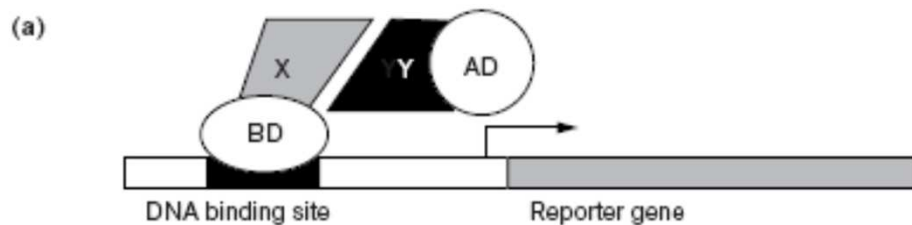
Troj-komponentní (dvoj-H) systém  
– heterotrimerní proteinové komplexy  
- posttranslační modifikace



Dvoj-hybridní systém  
- proteinový inhibitor interakce



Troj-hybridní systém  
– RNA interakce  
- ligand/receptor



<b>150 mM 3 - AT</b> (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
<b>90 mM 3 - AT</b> (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
<b>30 mM 3 - AT</b> (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
<b>20 mM 3 - AT</b> (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
<b>15 mM 3 - AT</b> (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
<b>10 mM 3 - AT</b> (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
<b>5 mM 3 - AT</b> (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
<b>Kontrola: (-Leu, Trp, Ura)</b>					

Tři různé proteiny spolu vytváří stabilní komplex (Nse3 propojuje Nse1 a Nse4)

BD-Nse1+V2AD+VP

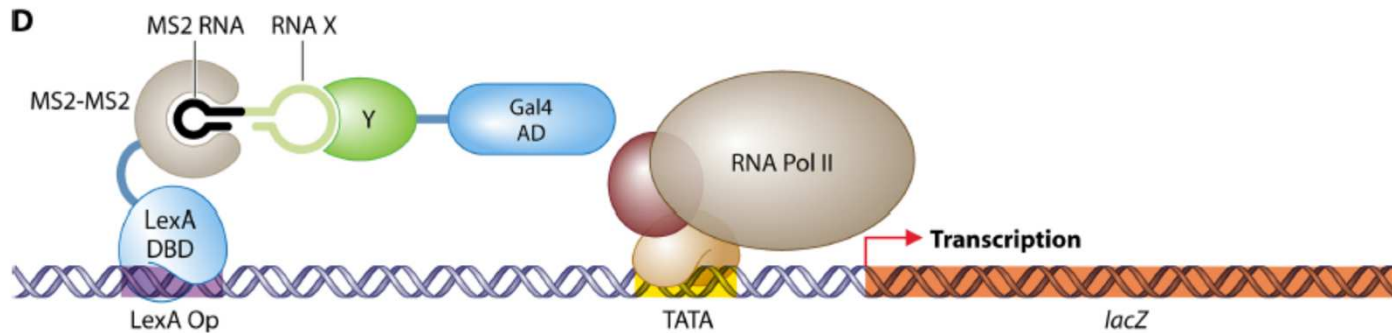
VBD+AD-Nse4+VP

BD-Nse1+AD-Nse4  
AD+VP

BD-Nse1+AD-  
Nse4+pPM1-Nse3

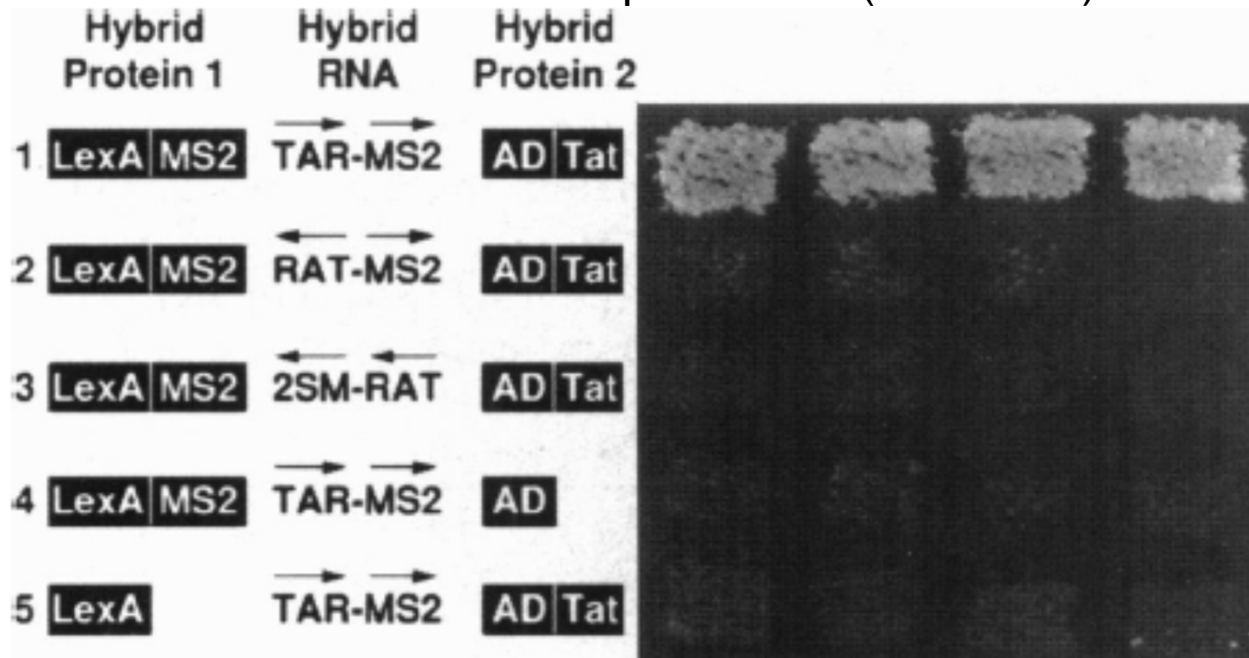


# Analýza vazby protein-RNA (Y3H)

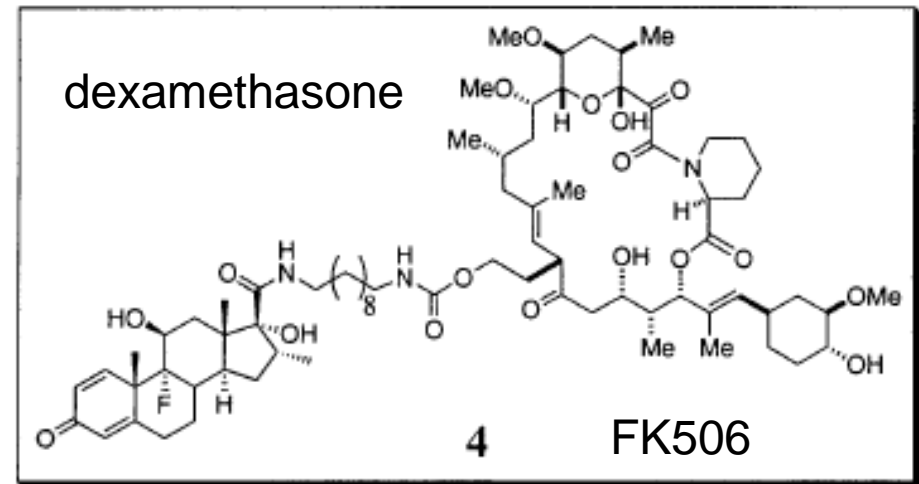
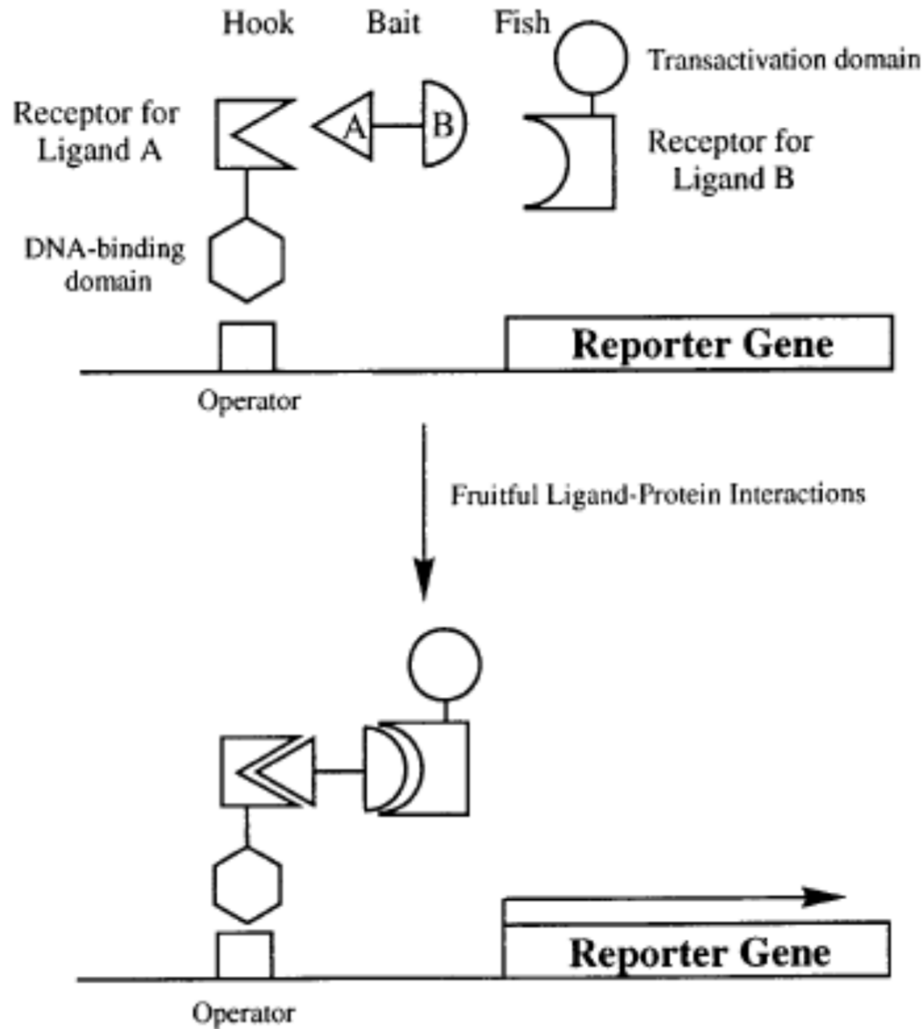


Tři hybridní/fúzní konstrukty:

1. DB-Gal4 a RNA-vazebný protein (MS2 virový coat protein)
2. RNA molekula složená z TAR (HIV trans-activation response element) a MS2 sekvence
3. AD-Gal4 a trans-activation protein Tat (váže TAR)



# Vazba ligand-receptor (Y3H)



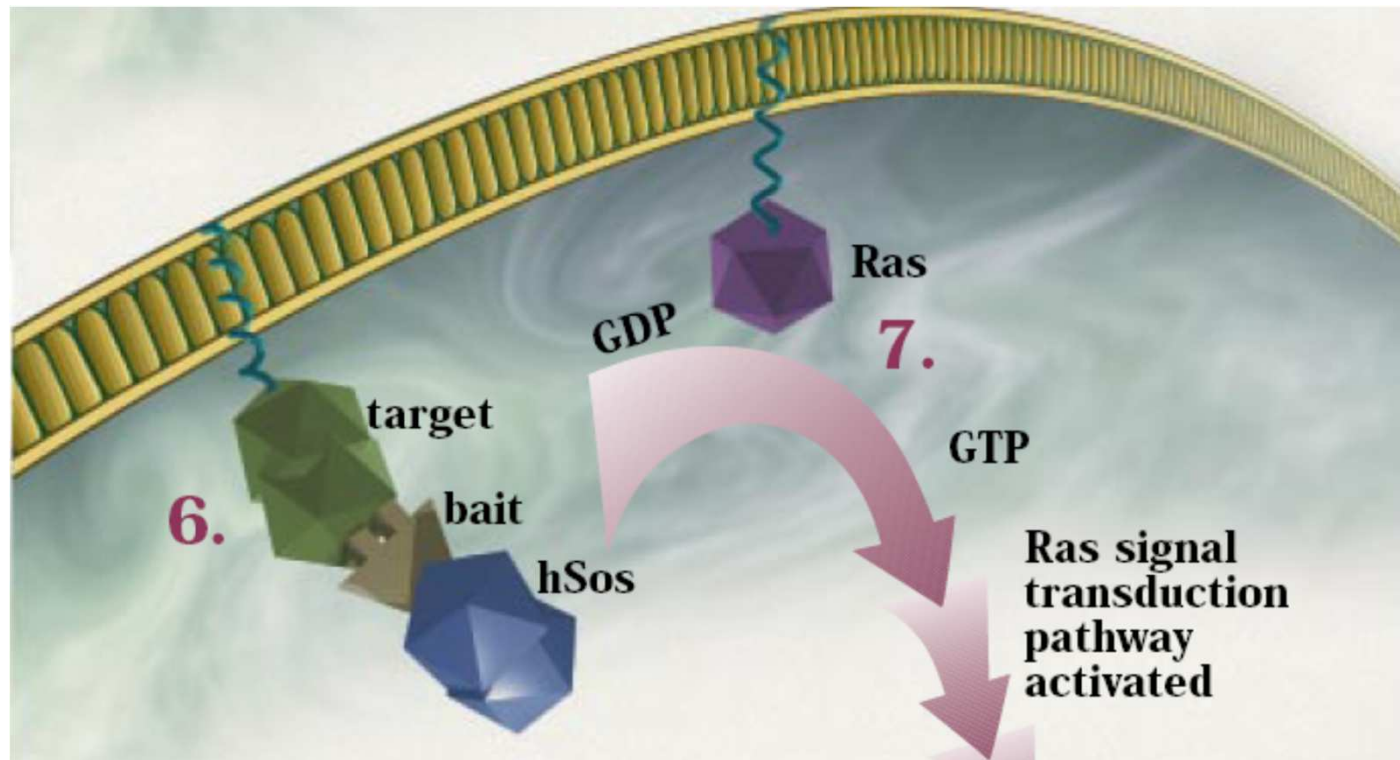
Tři hybridní/fúzní konstrukty:

1. DB-Gal4 a glukokortikoid receptor (váže dexamethason)
2. Organická sloučenina obsahující dexamethason a FK506 (v médiu)
3. AD-Gal4 a FKBP12 (váže FK506)

# CytoTrap 2-hybridní systém

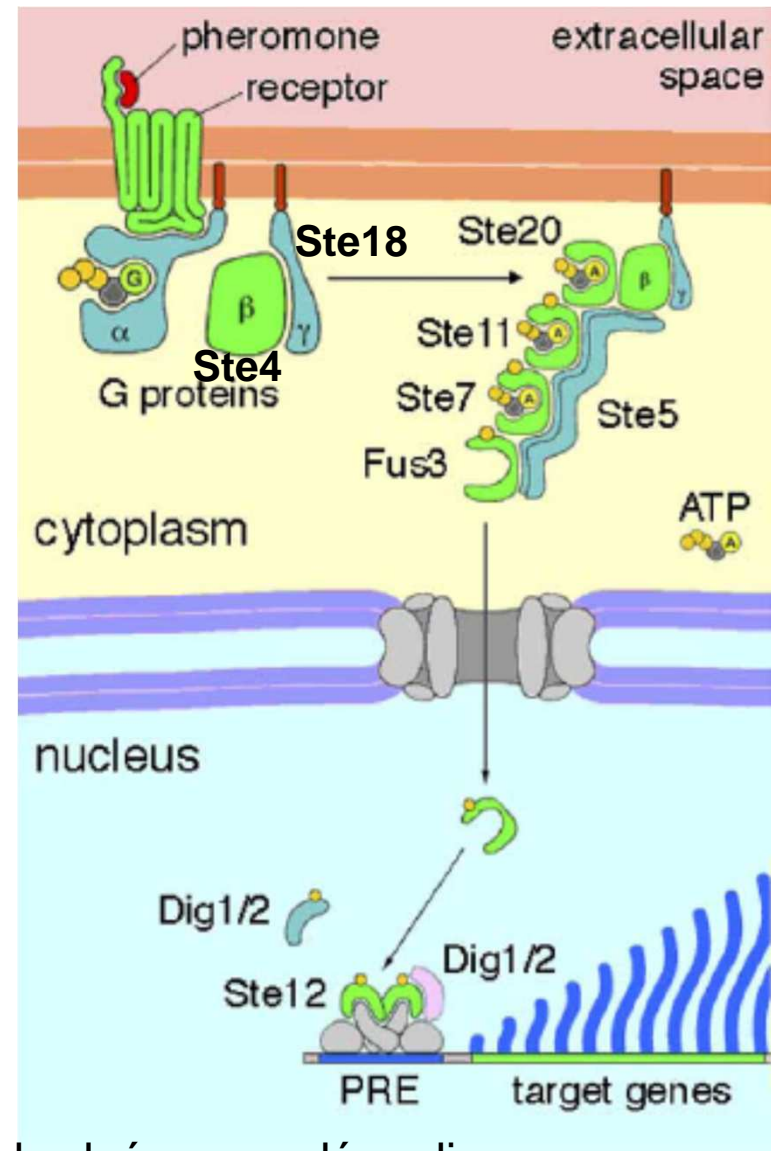
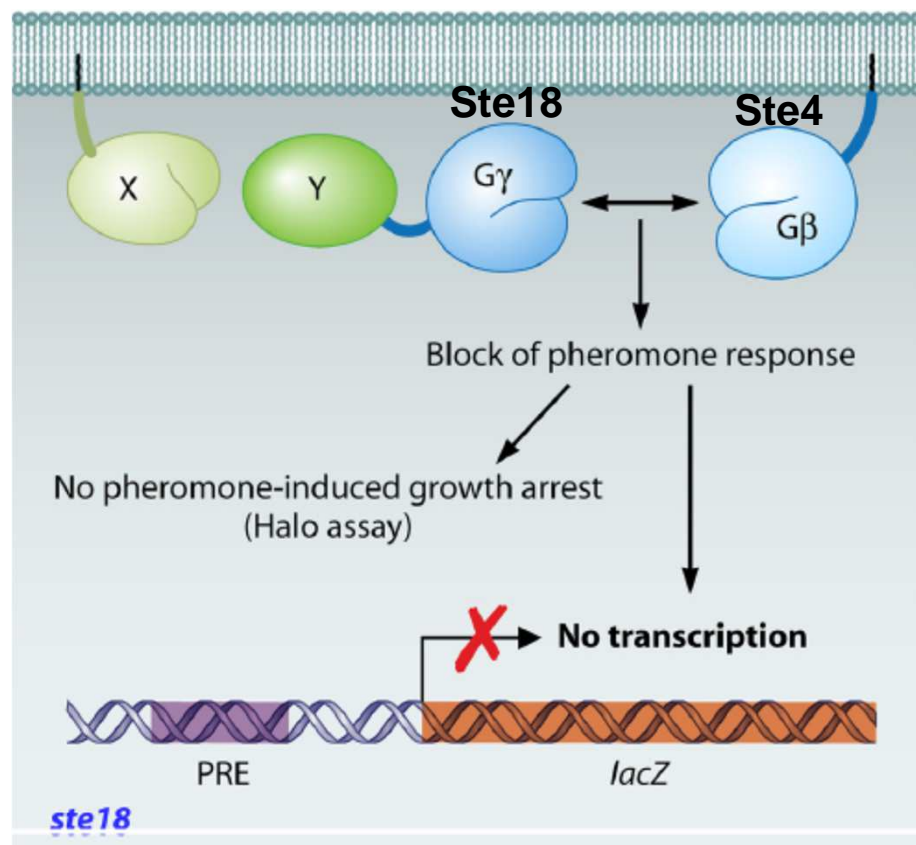
Kvasinkový *cdc25-2* ts mutant – lidský hSOS (guanine exchange factor) aktivuje RAS pokud je ukotven na membránu v jeho blízkosti

- jeden partner je myristylován (signální sekvence) a ukotven na membránu a druhý (interakční) partner je fuzován k hSOS – spustí Ras dráhu (roste i na vyšší teplotě)



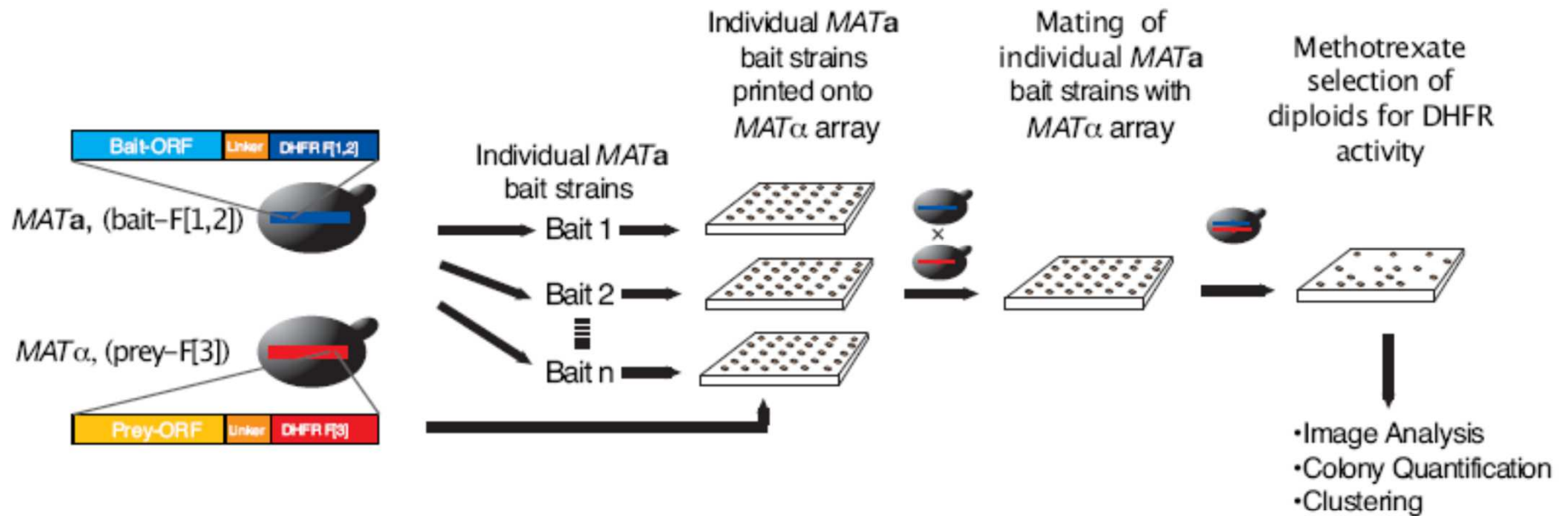
# alternativní G-protein hybridní systémy

Kvasinkový *ste18Δ* mutant nereaguje na  $\alpha$ -feromon – Ste18p fúzovaný s jedním partnerem a druhý je ukotvený na membráně - silná interakce nedovolí asociaci Ste18 a Ste4 a nespustí se signální dráha (buňky rostou za přítomnosti  $\alpha$ -feromonu, nespustí reportér)



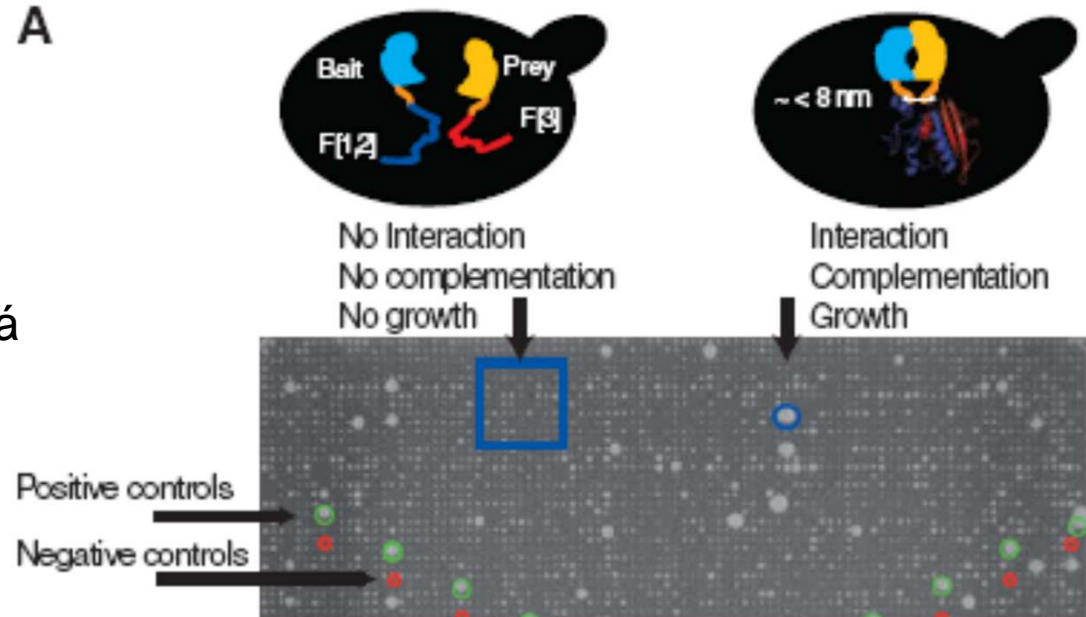
vhodný pro analýzu disrupce

# Komplementace proteinů



Aktivní DHFR (dihydrofolat reduktasa) je vytvořena spojením dvou separovaných částí enzymu (přes interakci fúzovaných proteinů) – odbourává pro kvasinky toxický methotrexát

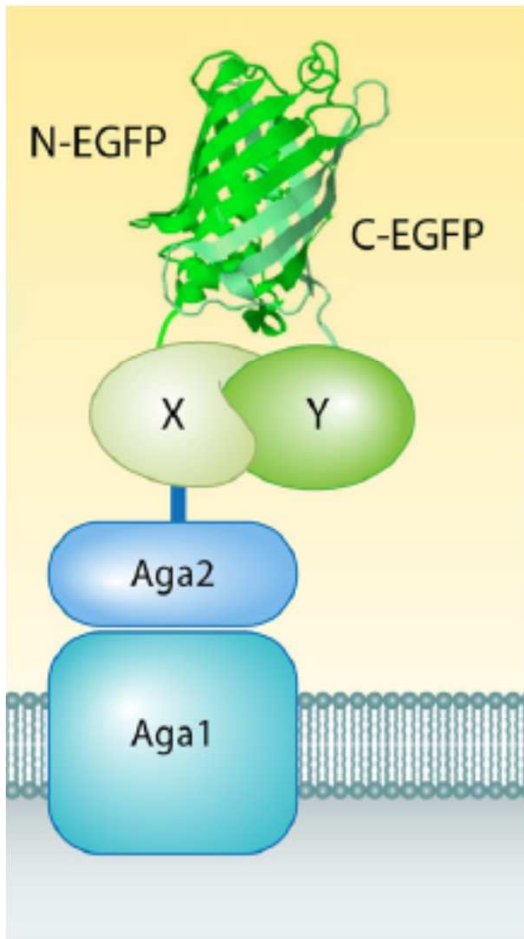
A



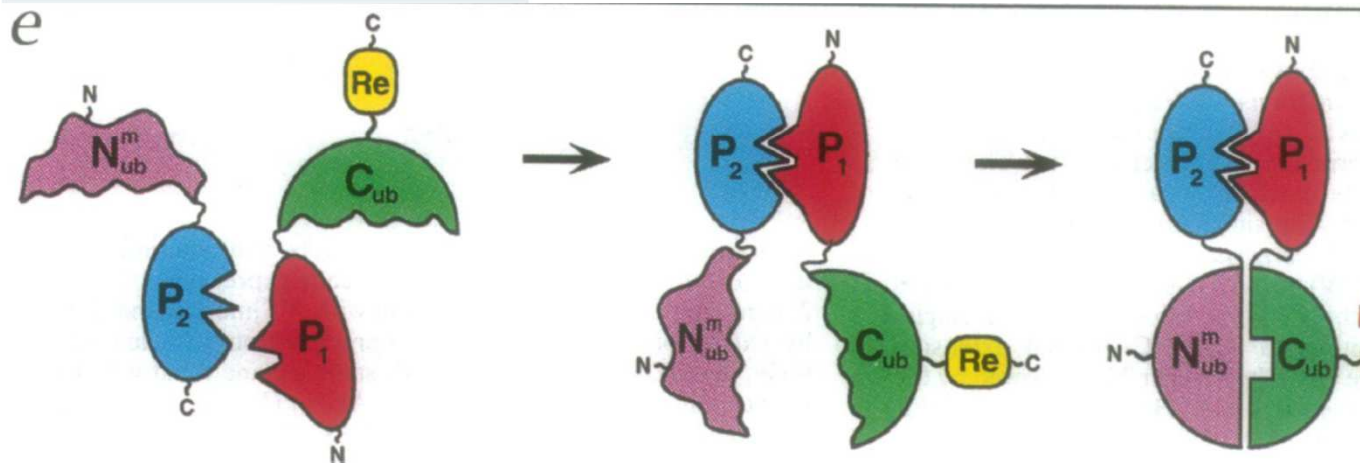
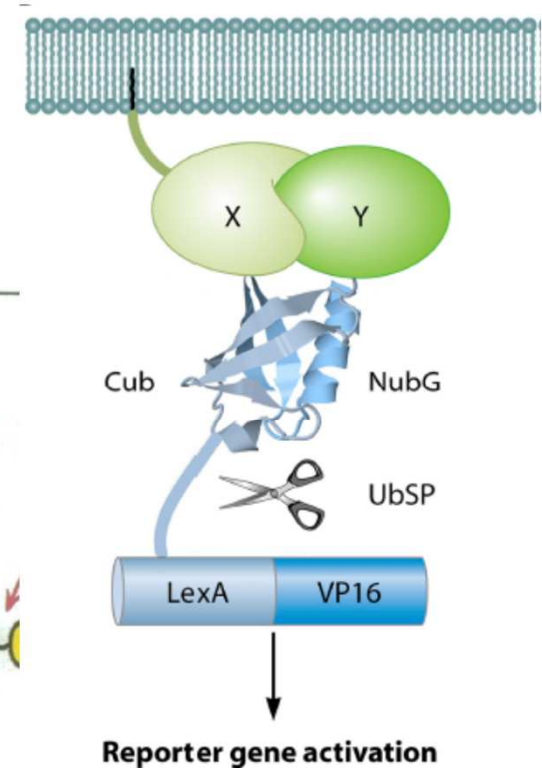
# Komplementace proteinů

Interakcí dvou partnerů dochází ke komplementaci eGFP na povrchu kvasinkové buňky (ukotveno pomocí fúze s Aga2 aglutininem) – buňky mohou být vytrženy pomocí FACS

Interakcí dvou partnerů dochází ke komplementaci ubikvitinu – původní verze založena na Western blot detekci – adaptováno pro kvasinky se selekcí na klasickém principu (reportérového genu)



Johnsson et al, PNAS, 1994  
Stynen et al, MMBR, 2012



# Přehled kvasinkových PPI biotechnologií

