

Test: 7.12., A2 (2.11) - psací potřeby (A,B,C,D)

Zkouška/prezentace:

7.12., A2 (2.11) – 4-5 studentů

Další termín v lednu ... A2 (2.11) – 4-5 studentů

Kvasinky ... oblast vaší DP (ne samotná DP)

- úvod do problematiky
- výsledky z článku (ne starší než 5 let)
- závěry, reference

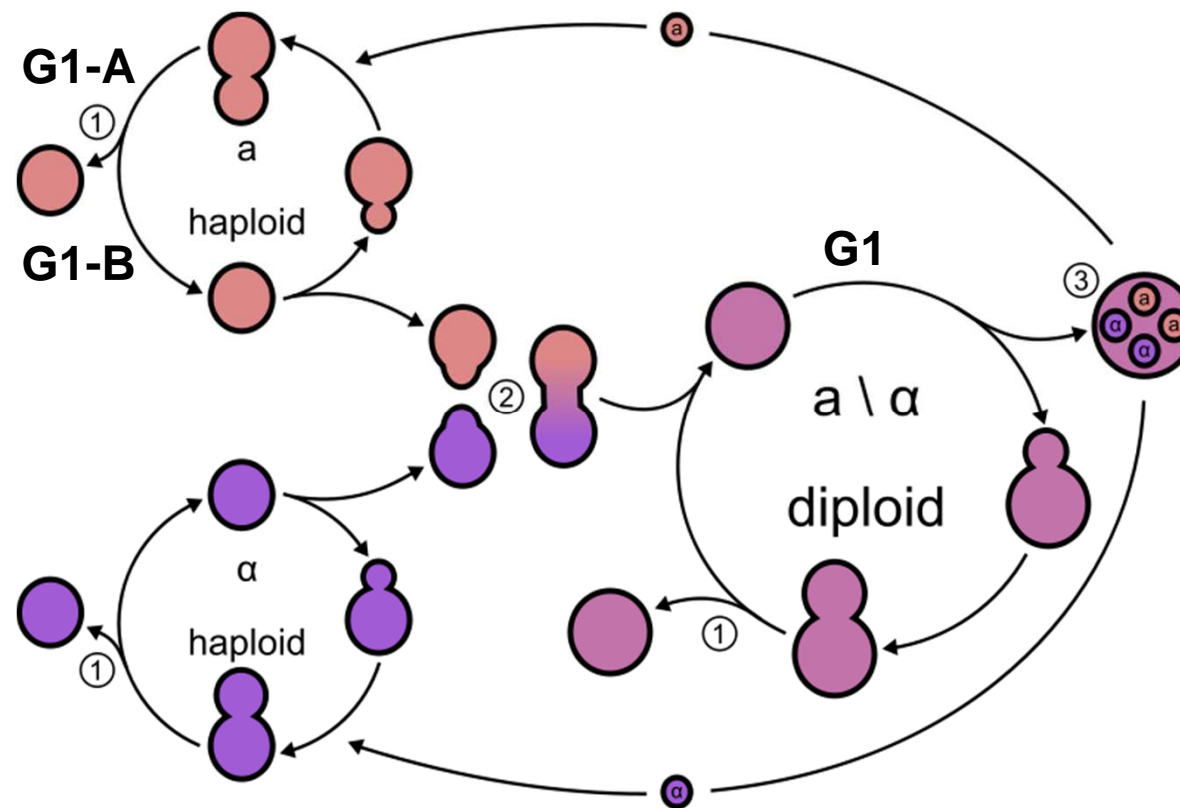
přednáška 15 + 5 minut

Cvičení: 14. 12. 8.00, A7 (2.17) - pláště, psací a kreslicí potřeby

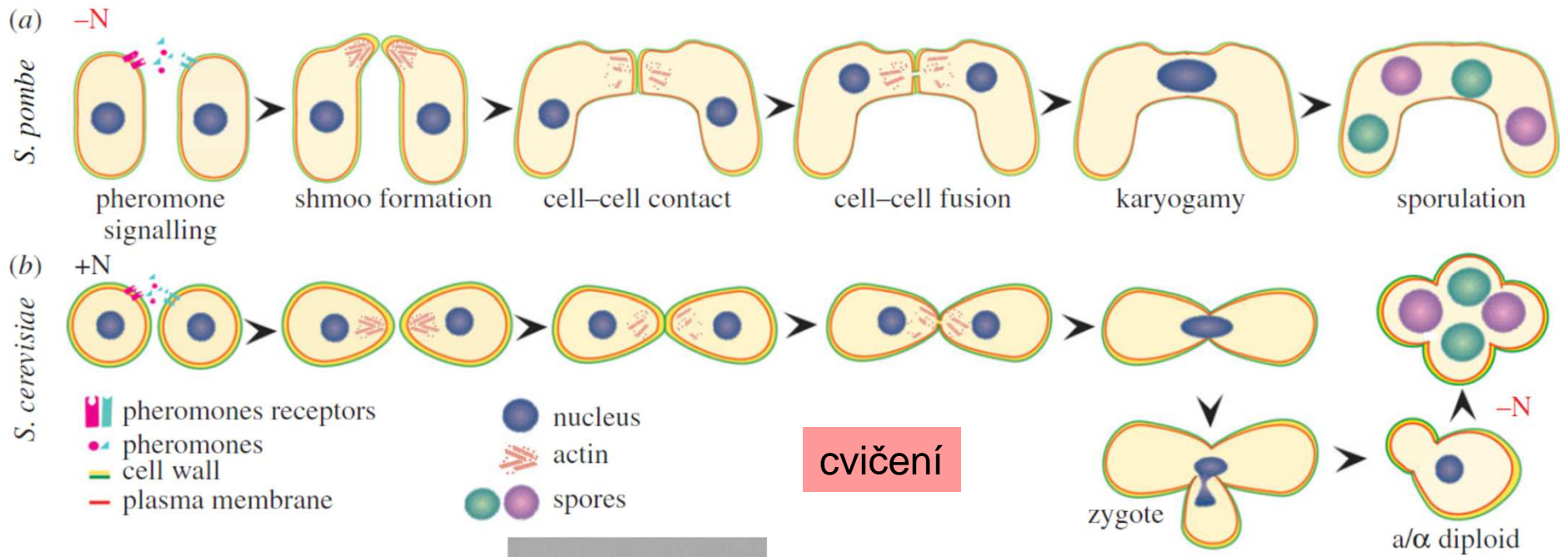
Osnova

- Párování kvasinek
 - Fyziologie
 - Regulační dráhy
 - Přepínání párovacího typu
 - Regulace transkripce specifických genů
- Regulace transkripce
 - Gal4 transkripční faktor
- Hybridní systémy
 - transkripční hybridní systémy
 - alternativní kvasinkové hybridní systémy

Párování/mating kvasinkových buněk

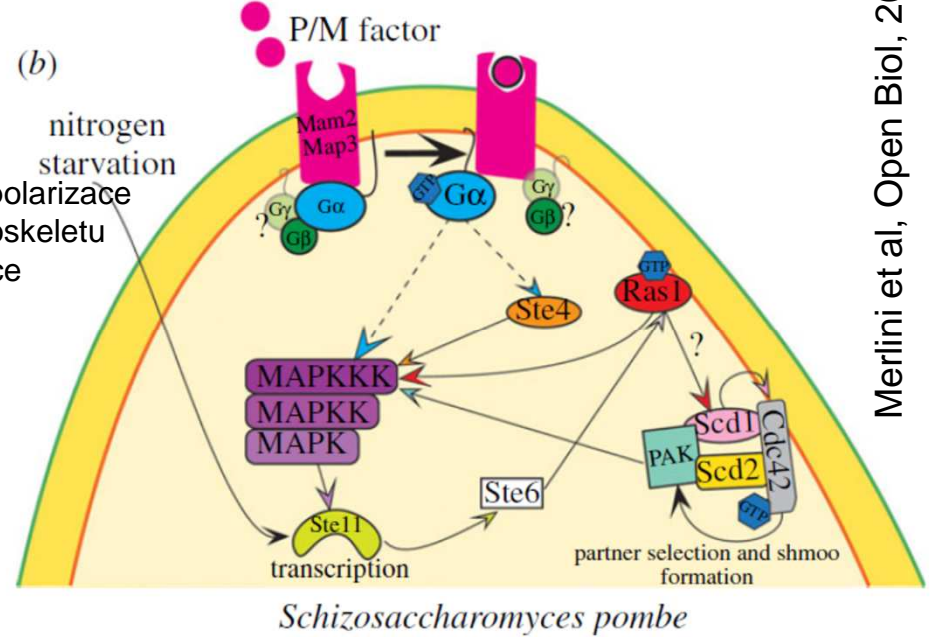
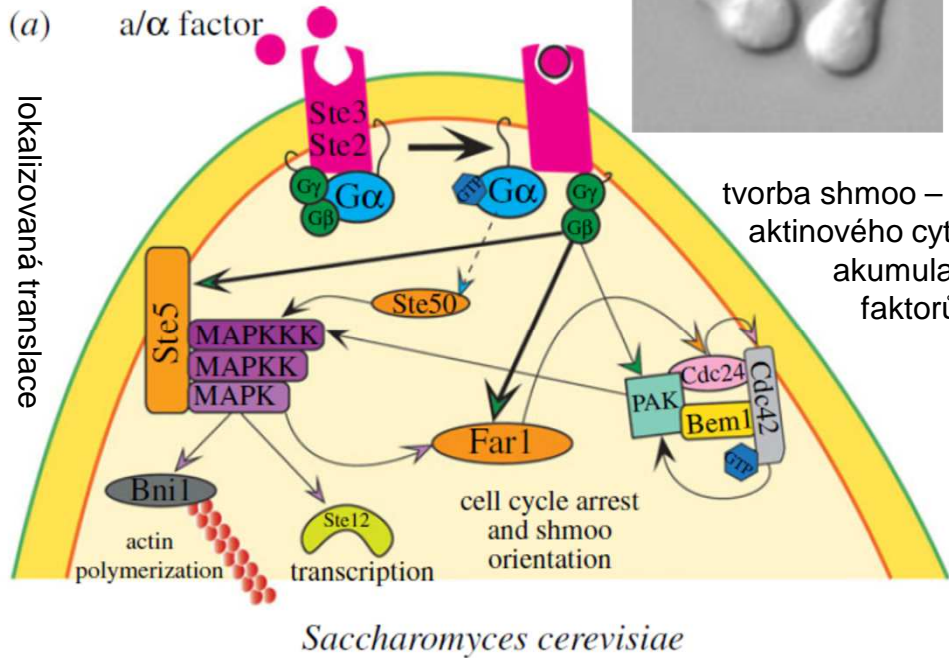


- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
- *S. cerevisiae* = a/alfa, *S. pombe* = h+/h-
- vytváří diploidní buňky (*S. cerevisiae* = stabilní, *S. pombe* = okamžitě sporulují)
- párování doprovázeno zásadními změnami v morfologii

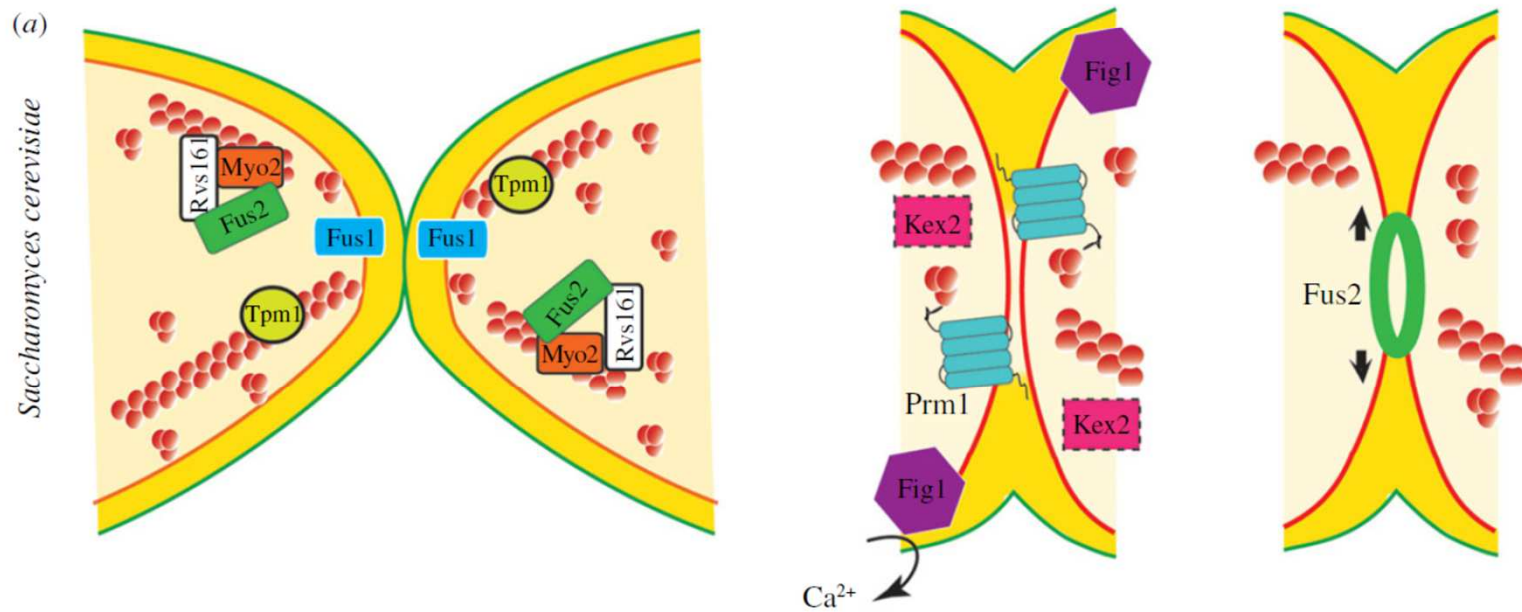
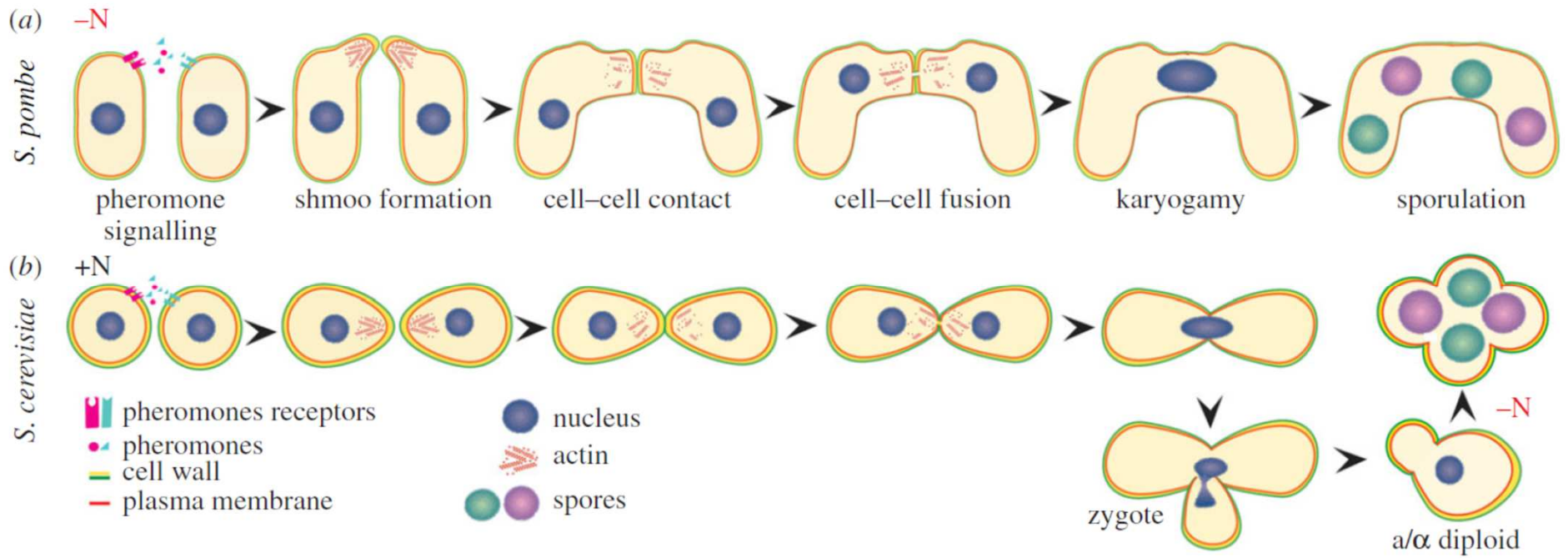


cvičení

STE = sterile



Merlini et al, Open Biol, 2013



fúze buněčných stěn – vytvoří se pór v cytoplasmatické membráně

(b)

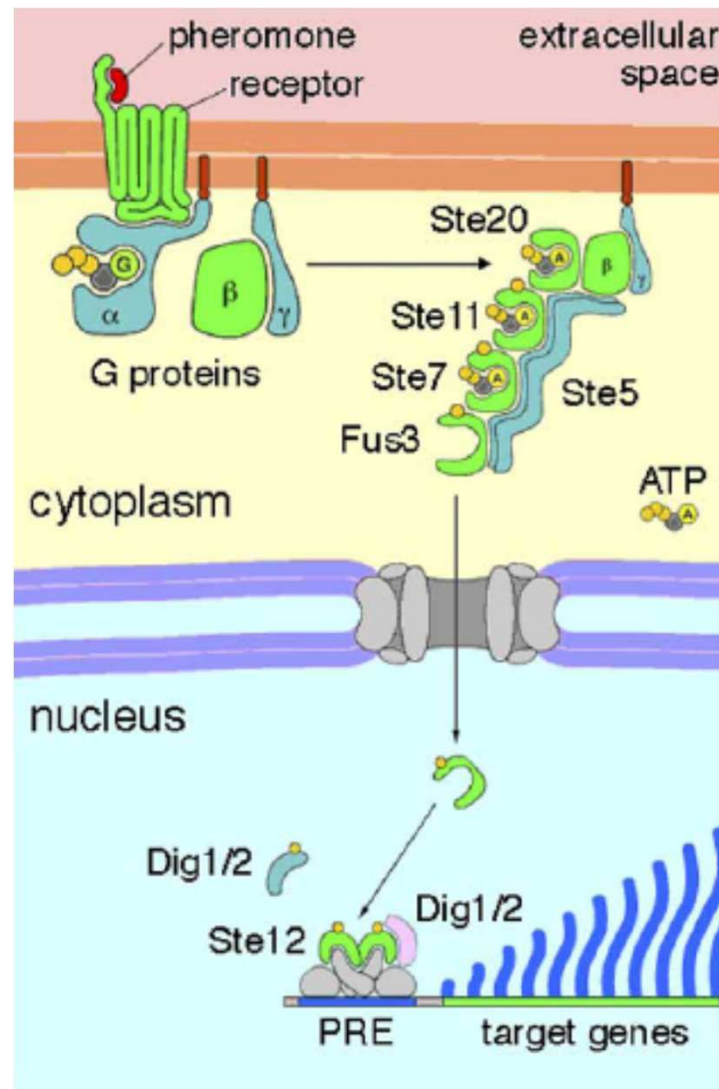
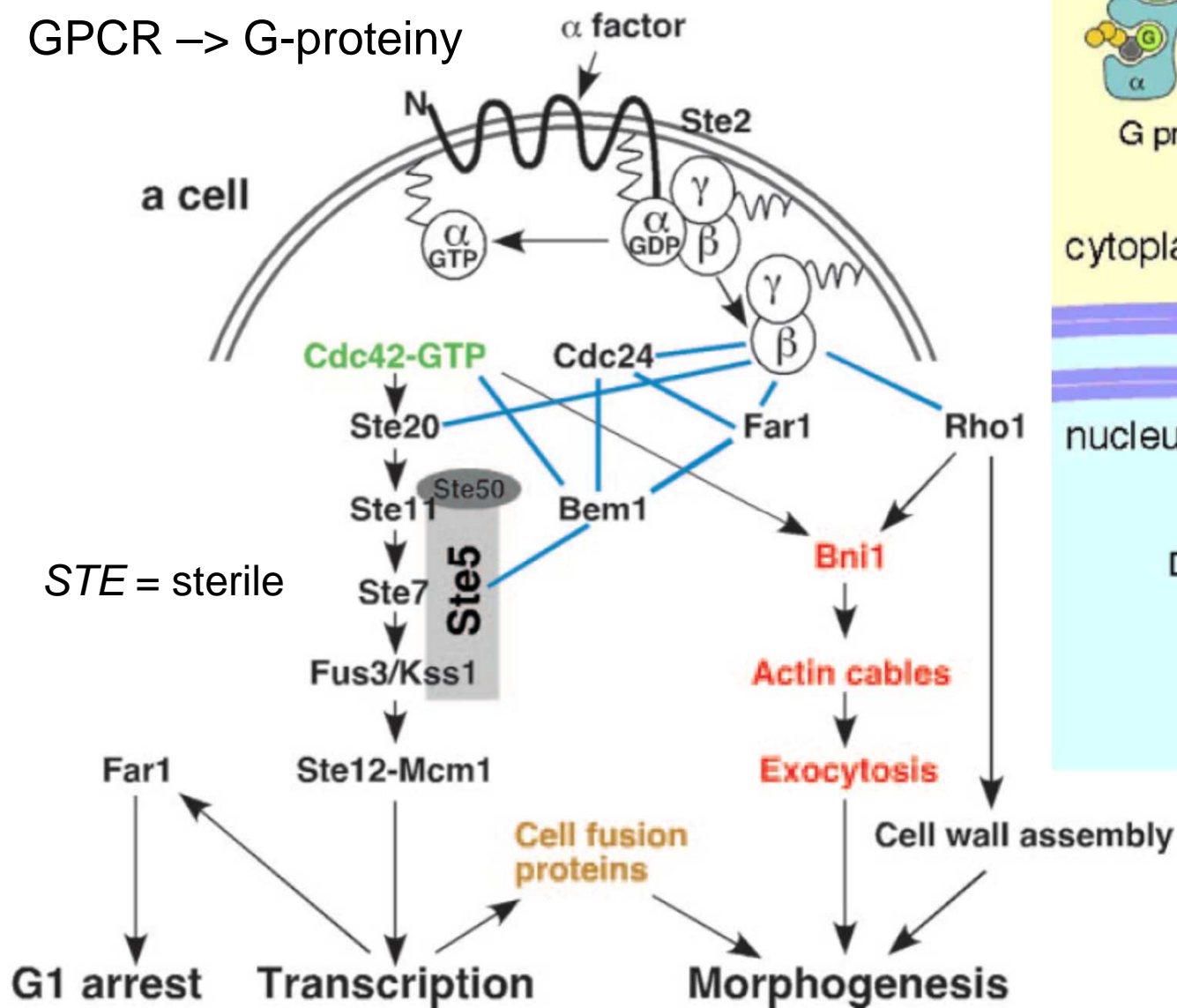
cell wall remodelling

plasma membrane fusion

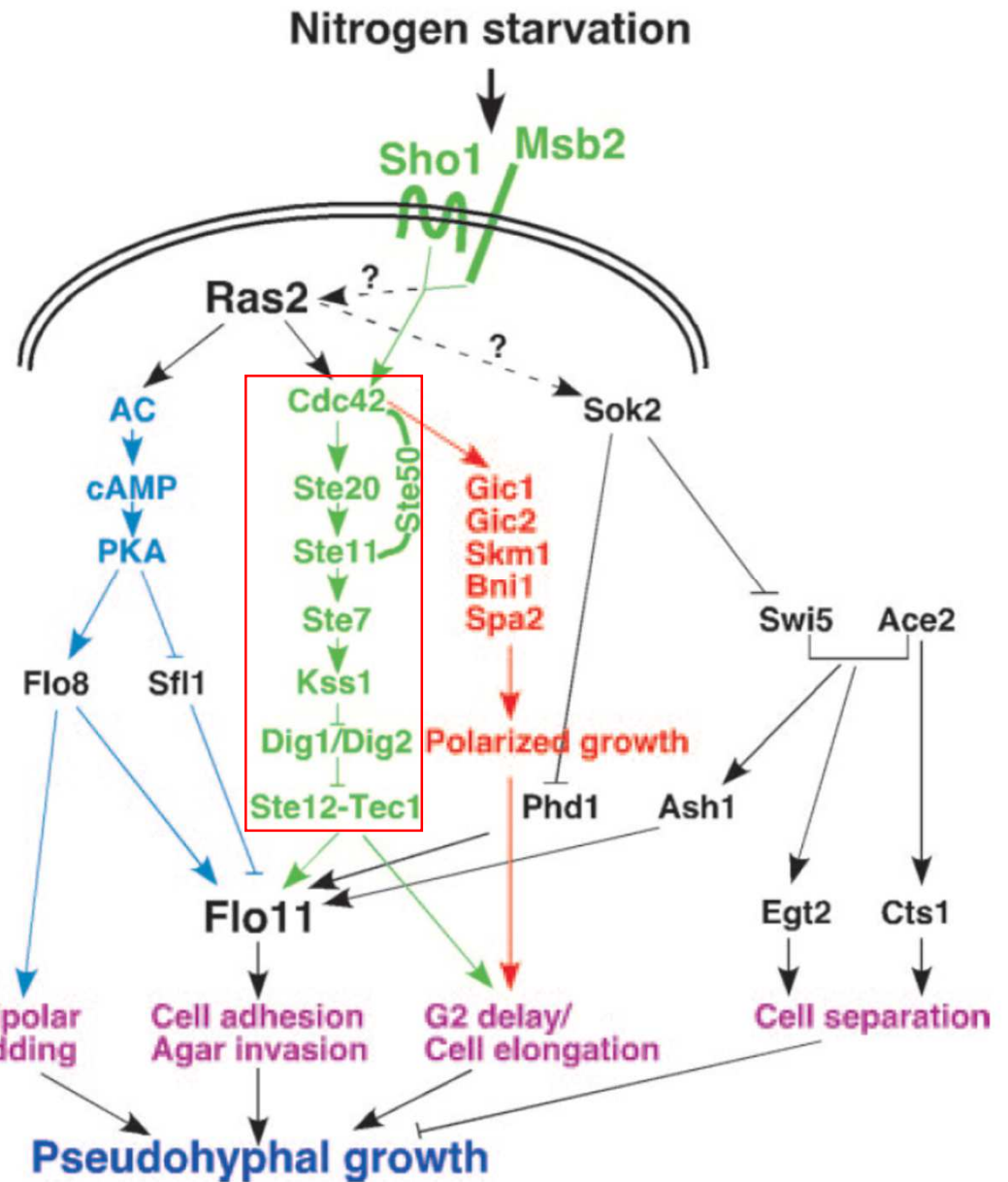
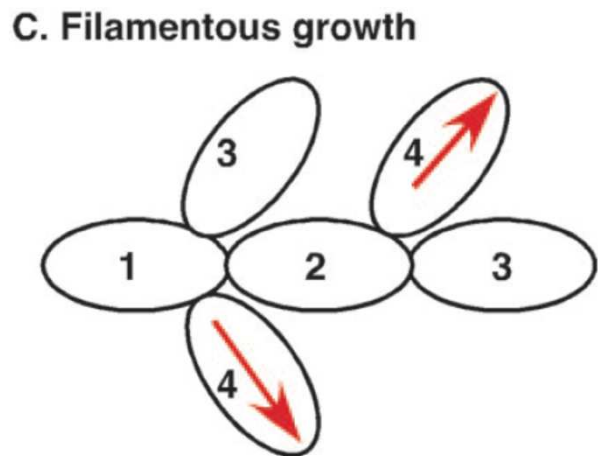
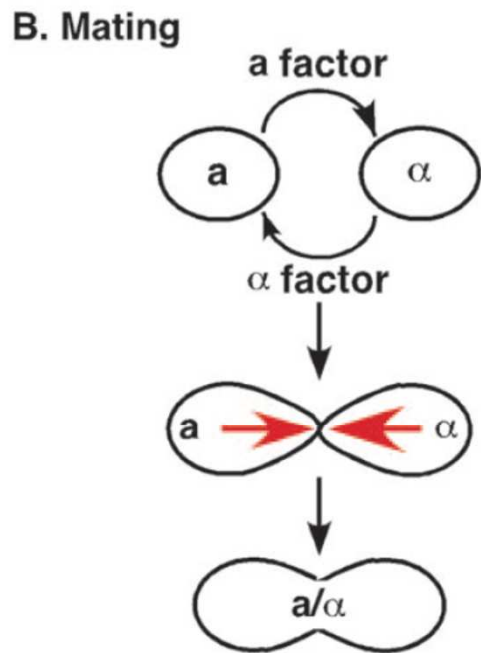
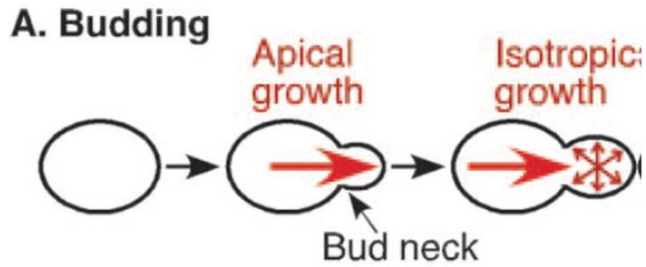
pore expansion

Signální dráha – α faktor

GPCR \rightarrow G-proteiny

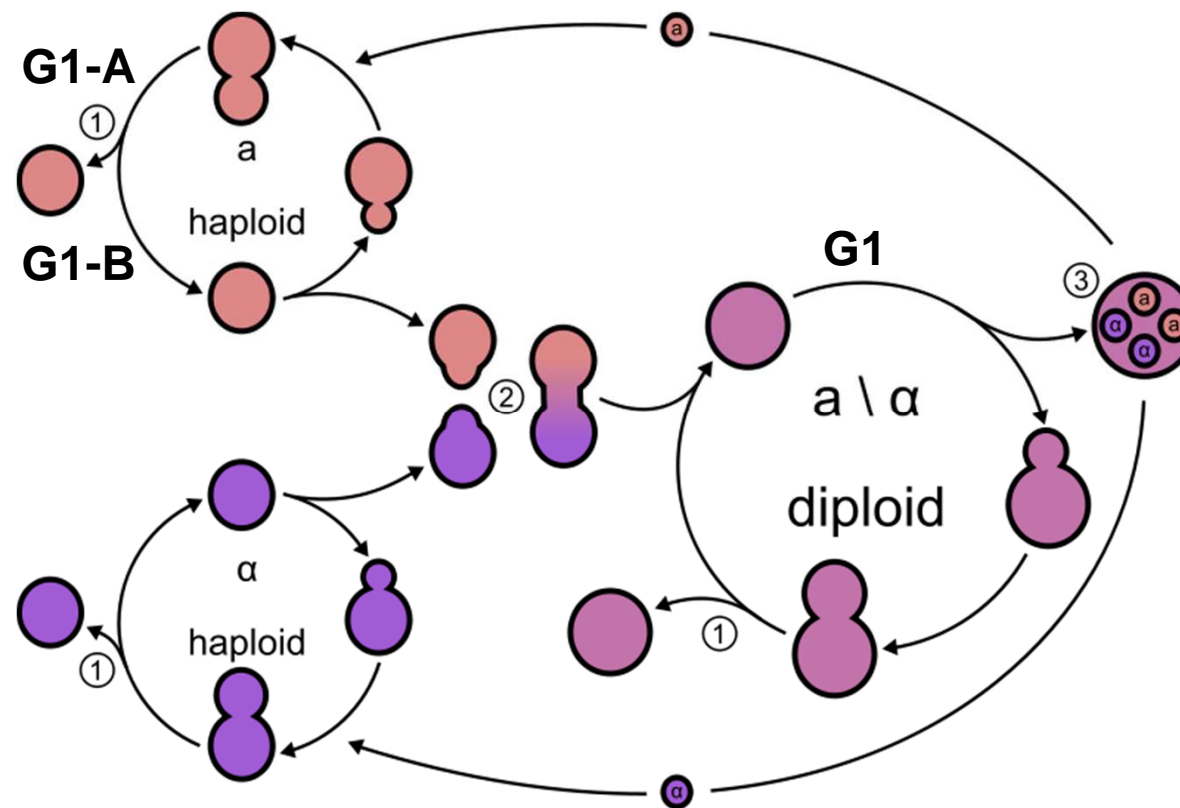


Park et al., MMBR, 2007
Wang et al., Nature, 2004



buňka využívá podobné „nástroje“ pro jiné programy (vláknitý růst)

Párování/mating kvasinkových buněk



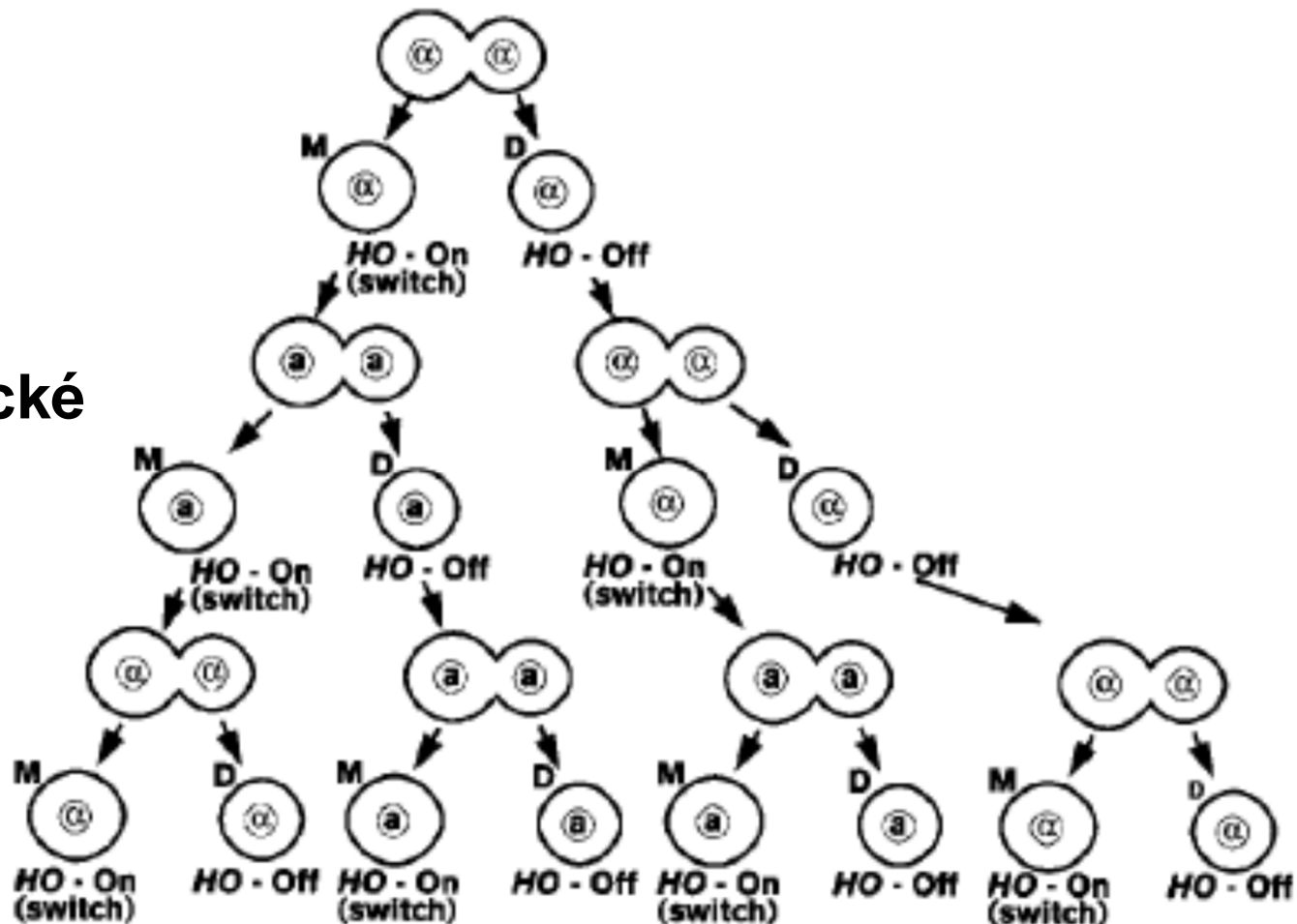
- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
- *S. cerevisiae* = a/alfa, *S. pombe* = h+/h-
- vytváří diploidní buňky (*S. cerevisiae* = stabilní, *S. pombe* = okamžitě sporulují)
- párování doprovázeno zásadními změnami v morfologii

Přepínání párovacího typu

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

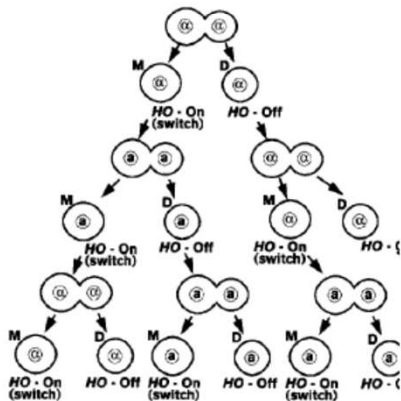
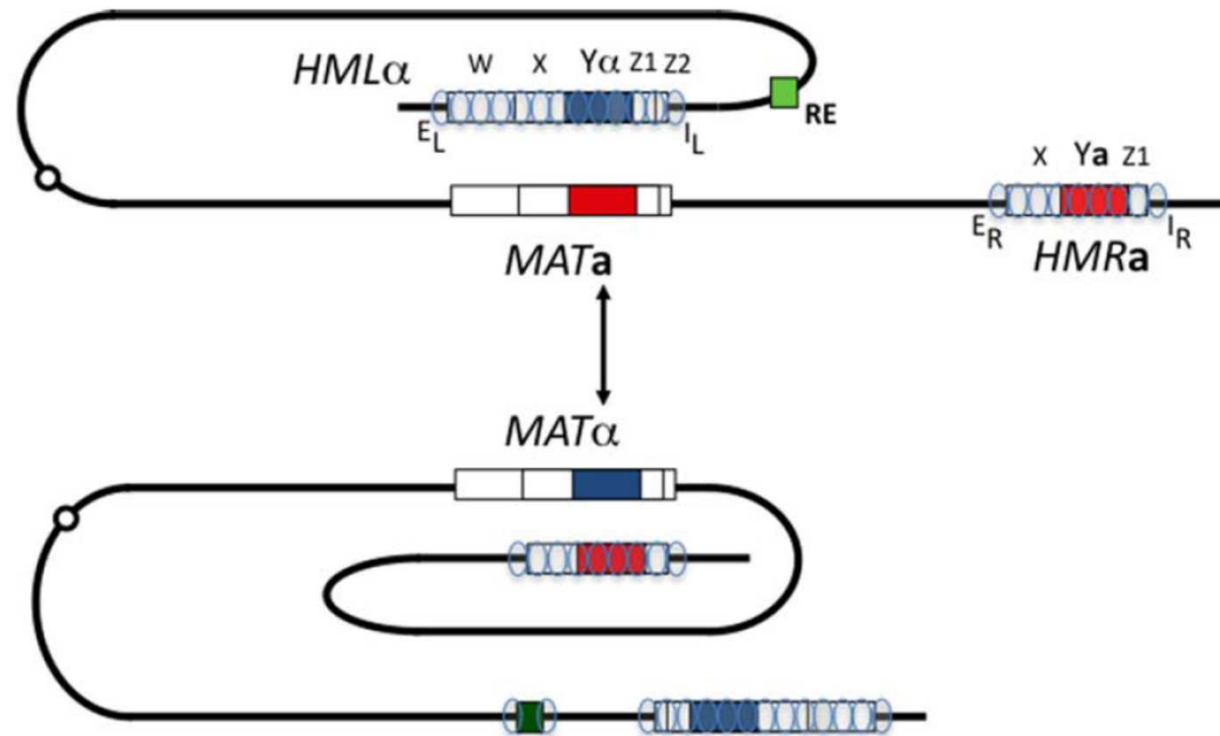
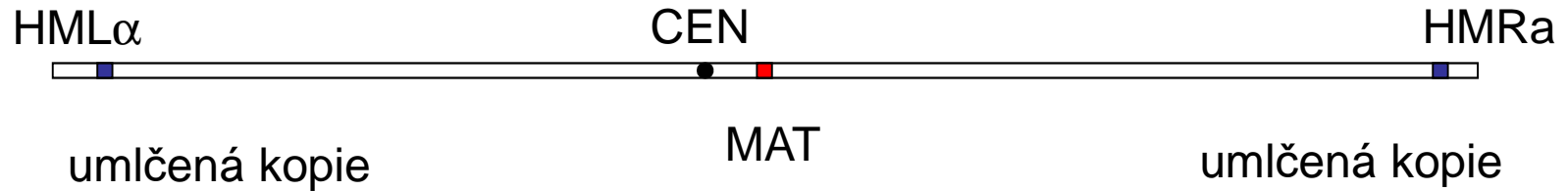
Heterotalické – nemají funkční HO endonukleasu

homotalické



Přepínání párovacího typu

Chromosom III



Lee a Haber, Microbiol Spect, 2015

HO endonukleasa štěpí specifické sekvence v MAT lokusu - homologní rekombinace - záměna kopií
 Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismů opravy poškozené DNA

Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

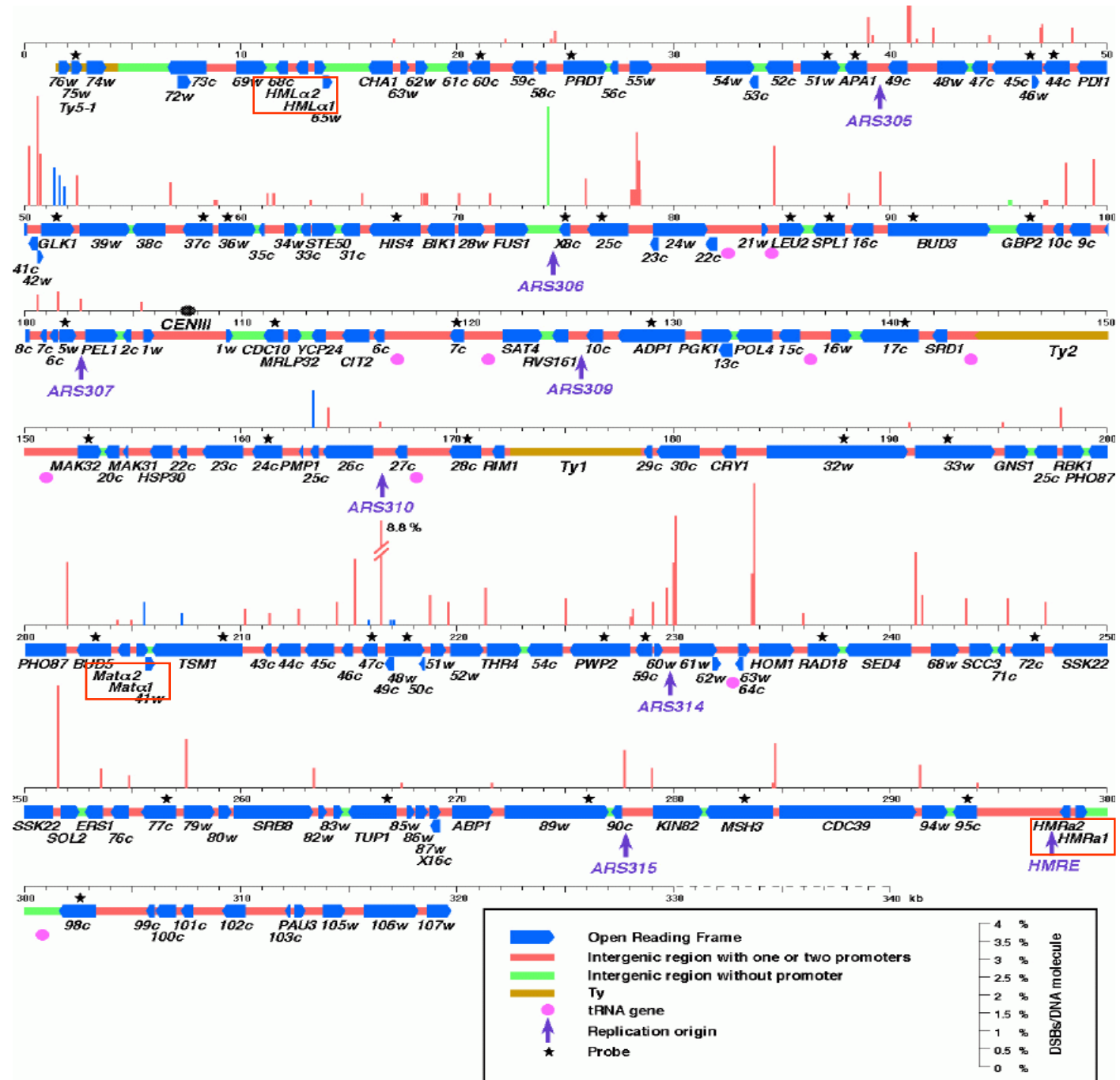
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

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






Regulace transkripce v haploidních buňkách (konstitutivní)




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




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

α -spec.= *MFa1,2* (α -feromon), *STE3* (a-receptor), *STE13*, *KEX2* (proteasy)

haploid spec.= *STE4,18* (podjednotky G-proteinu), *RME1* (inhibitor meiosy), *HO*, *NEJ1*, *LIF1*

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

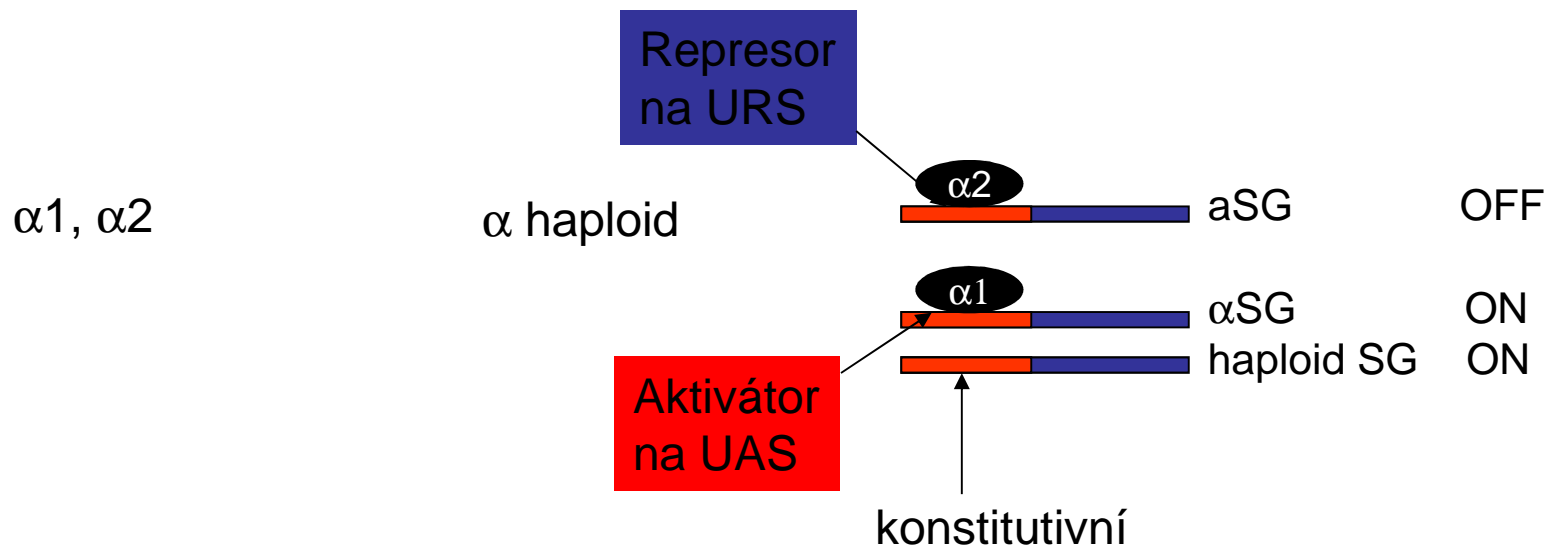
Kvasinkové promotory se liší od bakteriálních a vyšších eukaryot (kvasinky netranskribují z takových promotorů – kvasinkové plasmidy ...)

-Většina míst pro iniciaci transkripce obsahuje TC(G/A)A a PuPuPyPuPu (specifické pro kvasinky)

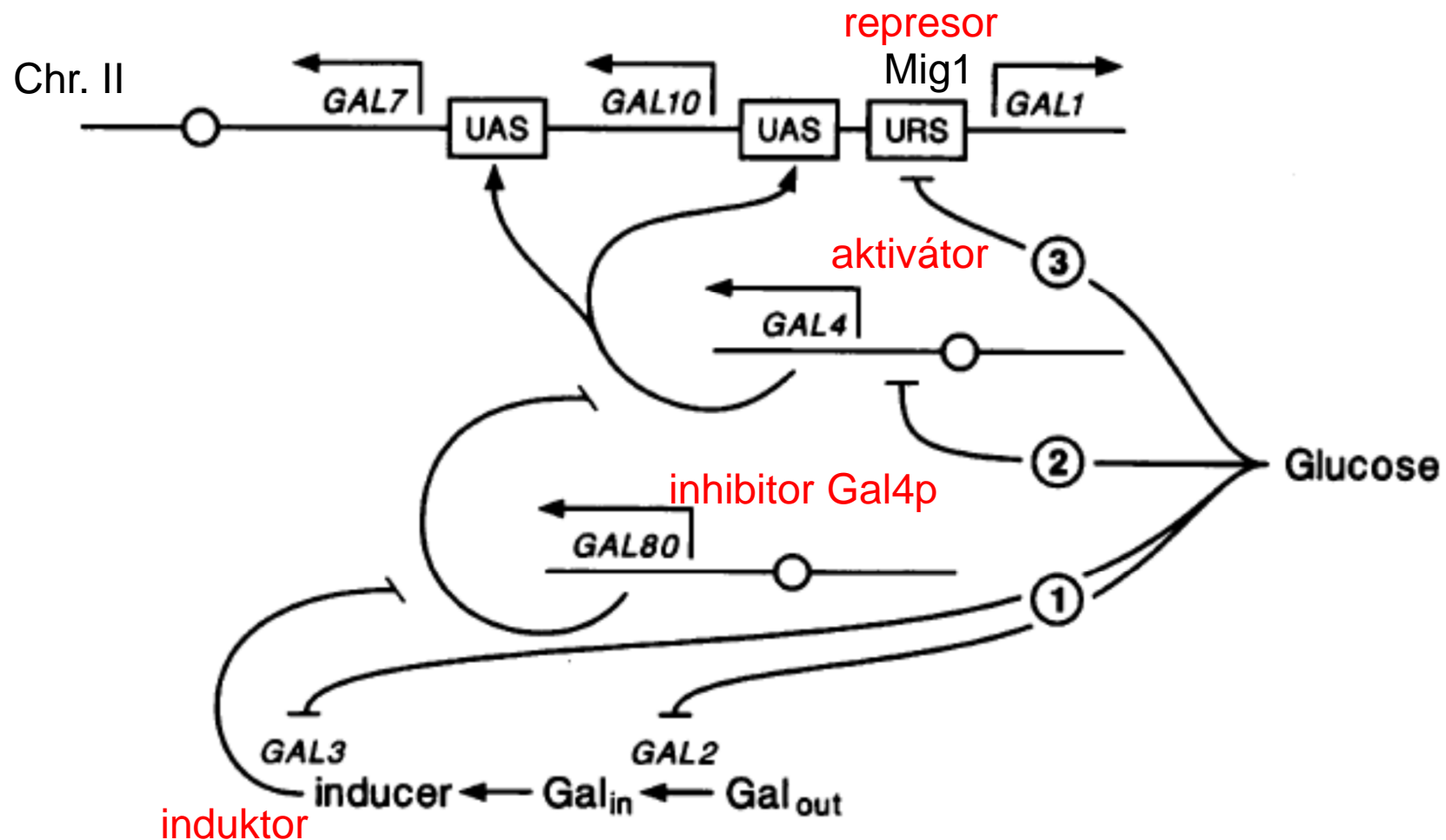
- TATA box (TATAT/AAT/A) je 60-120bp od iniciačního místa (podobné Pribnowovu boxu u bakterii)

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

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

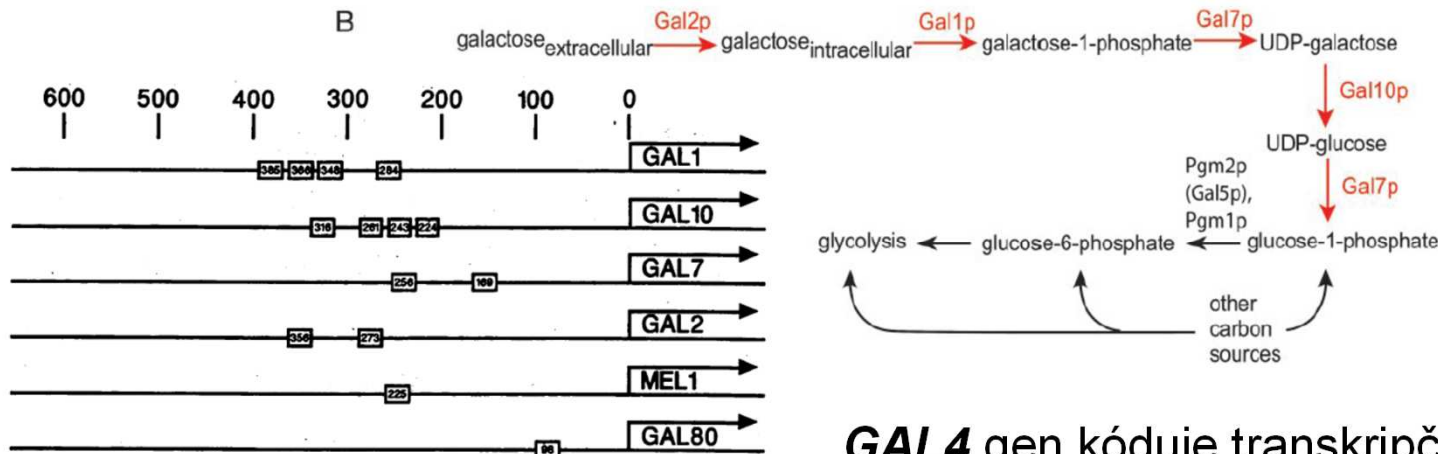
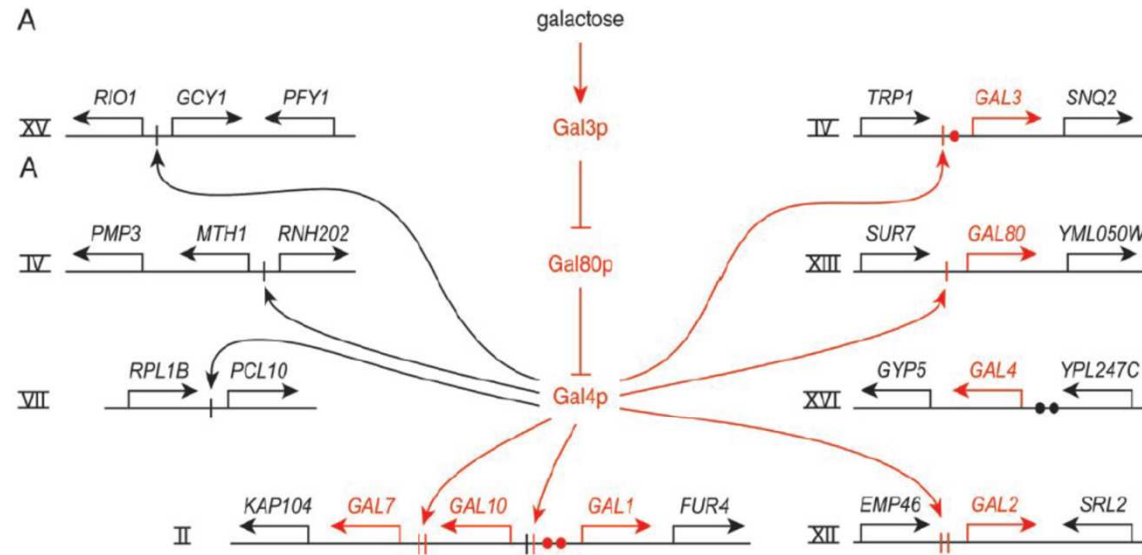


Regulace transkripce *GAL* genů



- glukosa reprimuje transkripci *GAL* genů na různých úrovních
 - *URS* v promotorech *GAL1* genu (*Mig1* represor) - reprimuje transaktivaci *GAL4* transkripčním aktivátorem
 - *Gal80* blokuje *Gal4* aktivační doménu
 - reprimuje *GAL3* induktor a *GAL2* permeasu

Regulace metabolické dráhy galaktózy



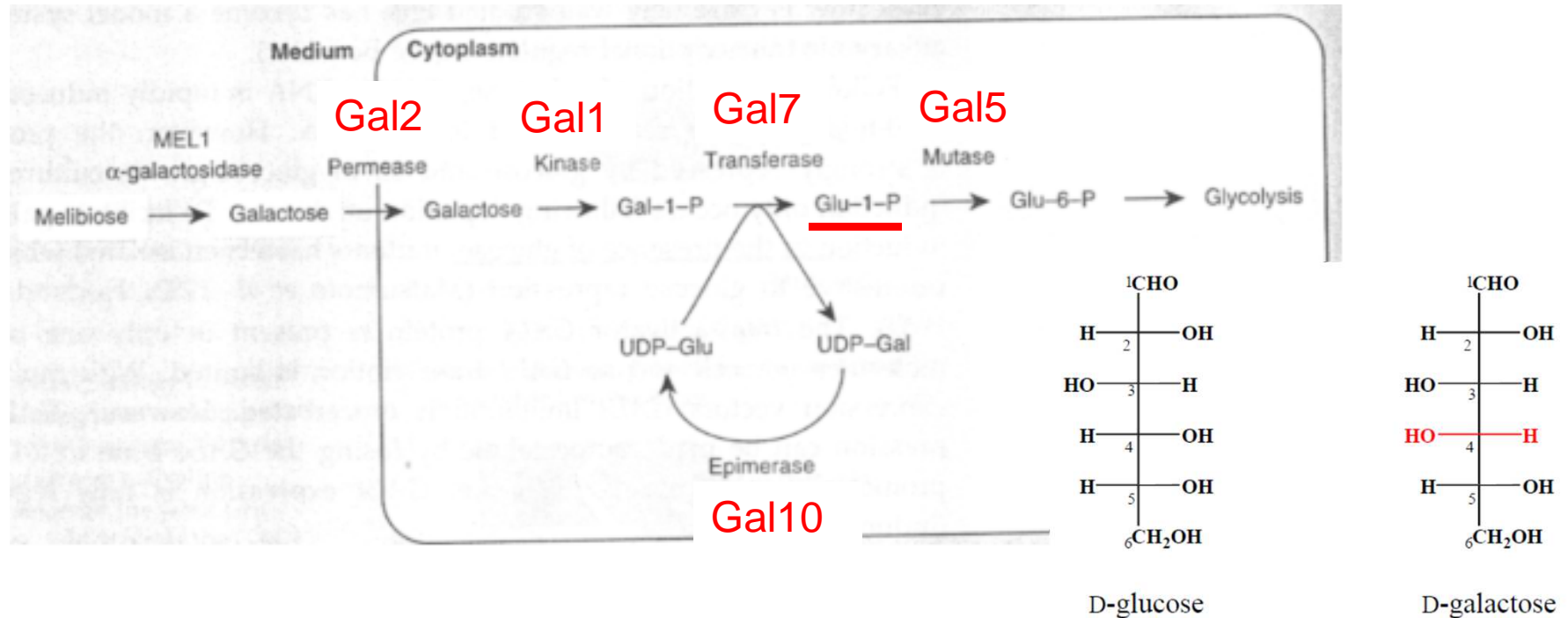
Consensus Binding Site

C G G A G G A C A
 C C G A C T C A G G C A G G C
 19 20 18 10 16 9 13 11 20

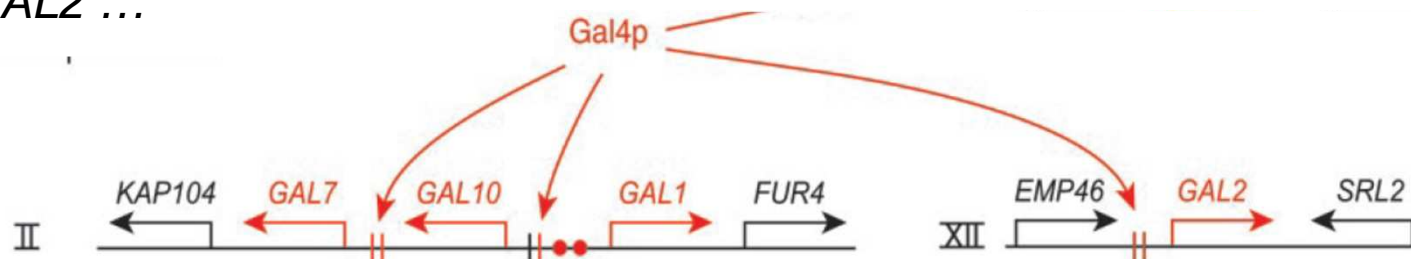
GAL4 gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS **GAL1**, **GAL7**, **GAL10** ...

Hittinger et al., PNAS, 2004
 Johnston, MMBR, 1987

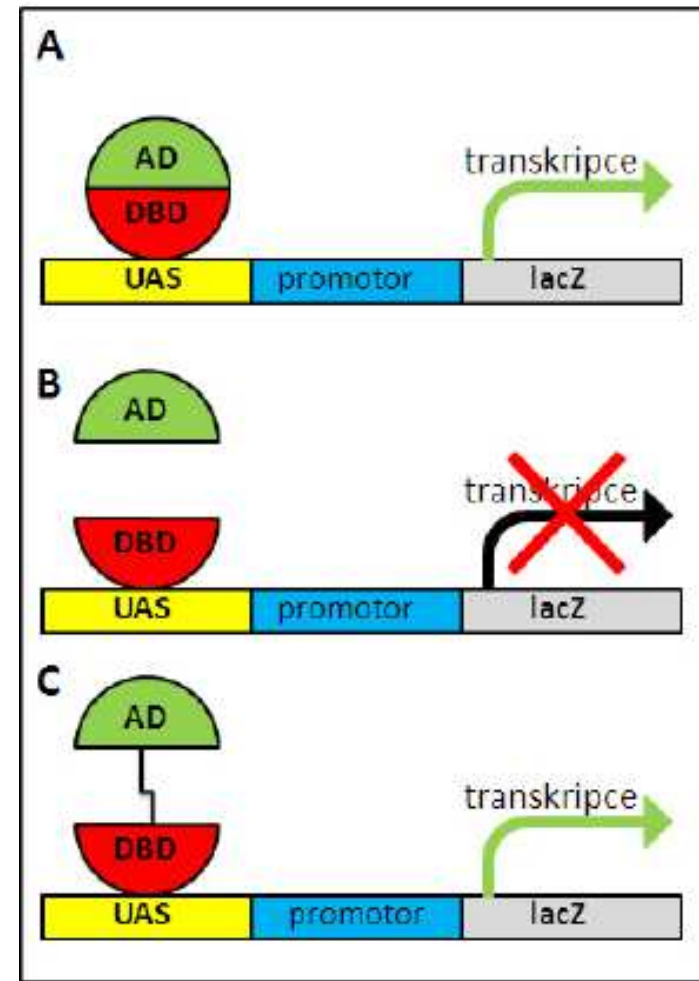
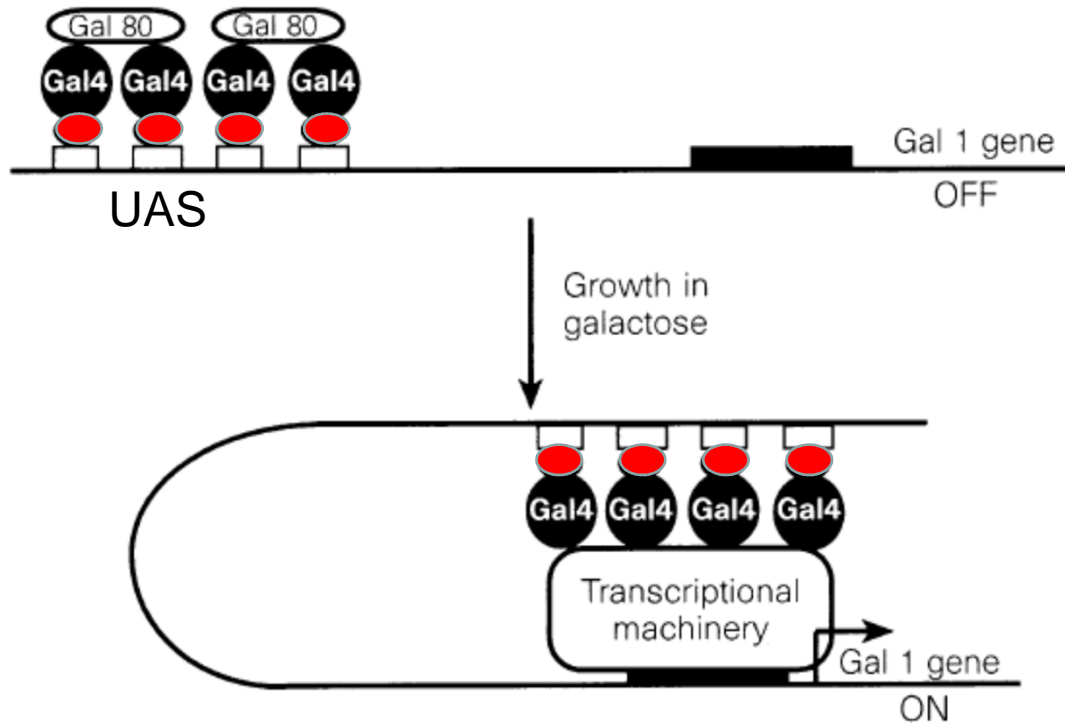
Regulace metabolické dráhy galaktózy



- pouze *GAL5* gen je konstitutivně exprimován (potřebný pro metabolismus glukózy)
- ***GAL4*** gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL2* ...

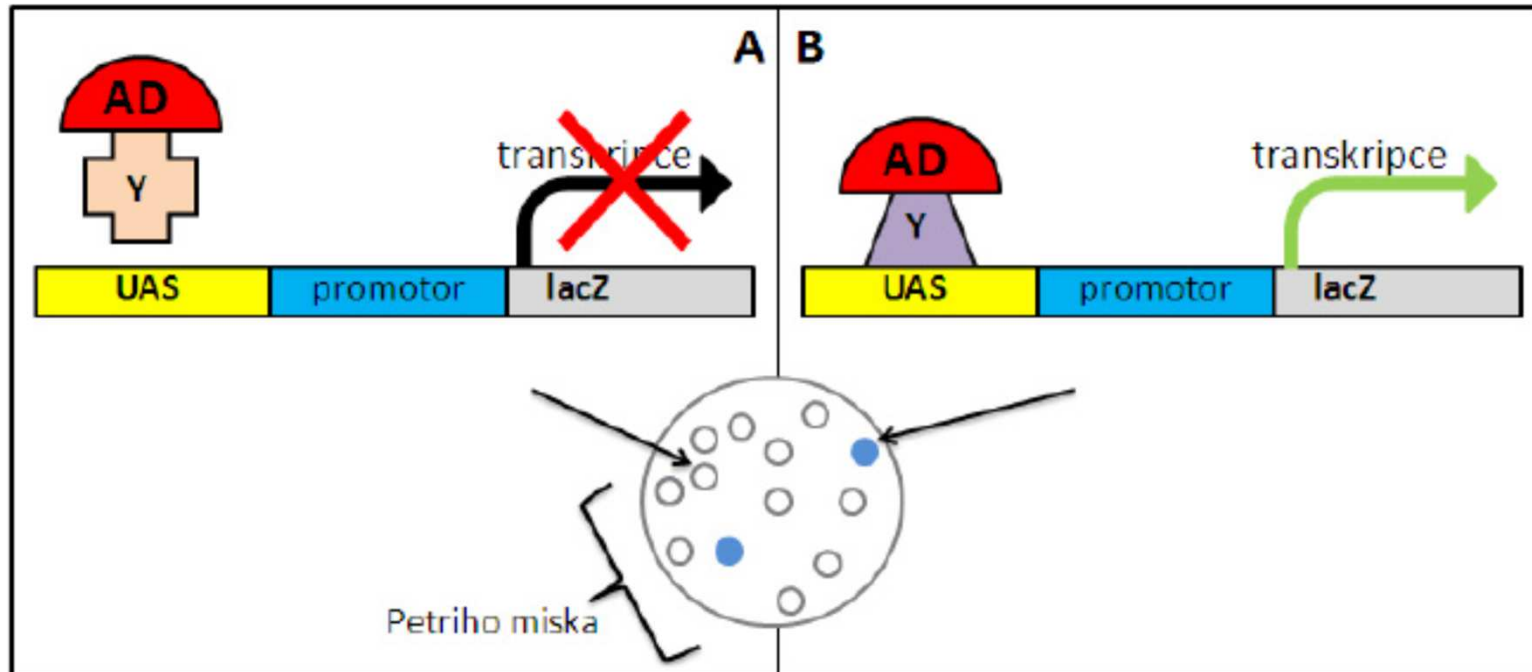


Transkripční aktivátor Gal4p



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

Vznik 1-hybridních systémů

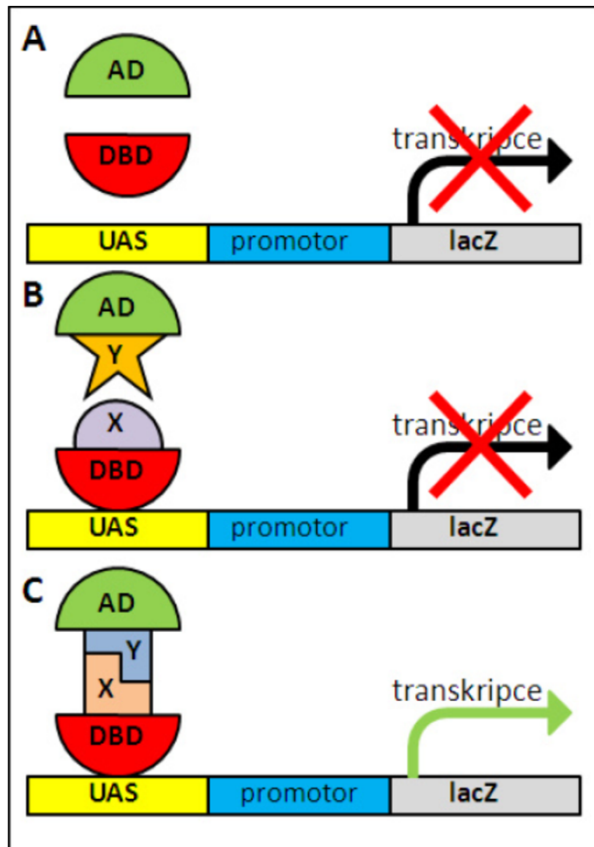


Různé transkripční faktory mají podobné domény a lze je kombinovat ...

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)

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)

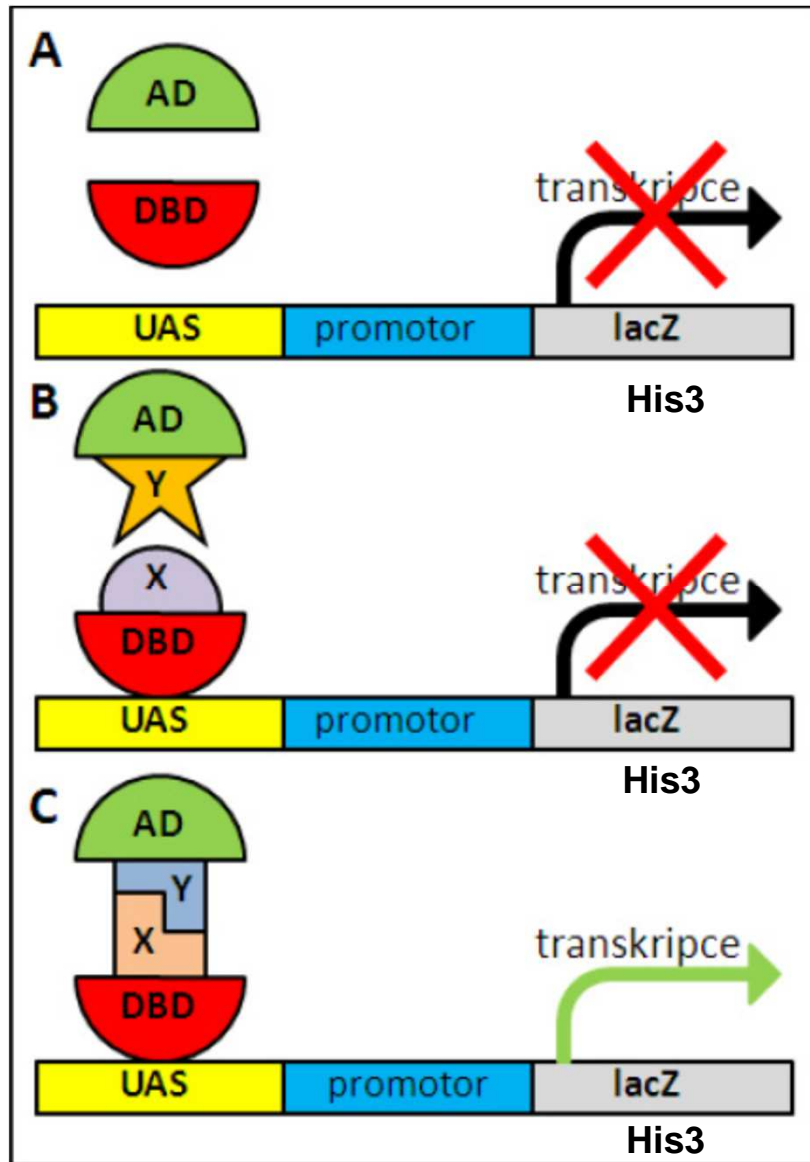
Bacteriophage λ repressor cI

Binds cI operator sequences (580)

Tet repressor

Binds Tet operator sequences (716)

2-hybridní systém



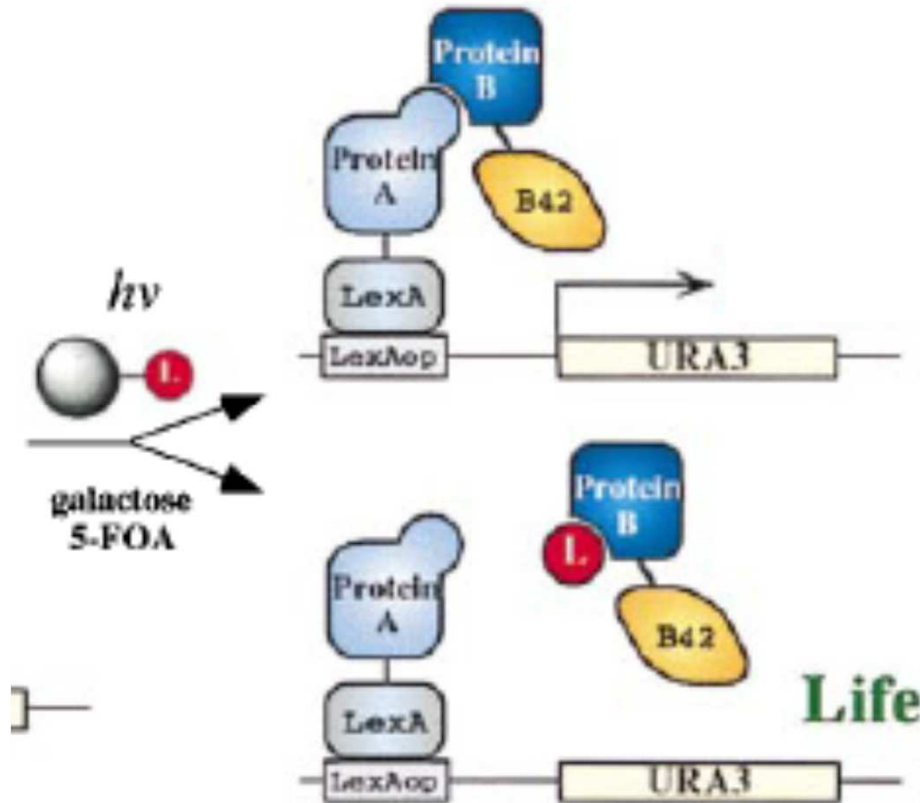
60 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
30 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
20 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
15 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
10 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
5 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
Kontrola (- Leu, Trp)			
	BD-Nse3 + V1AD	BD-Nse3 + AD-Nse1 (1-116)	VBD + AD-Nse1 (1- 116)

Reportérové geny

Reporter genes

<i>E. coli lacZ*</i>	β -Galactosidase chromogenic reporter (178)	
<i>S. cerevisiae MEL1</i>	Secretory α -galactosidase chromogenic reporter (5)	kvantitativní
<i>E. coli gusA</i>	β -Glucuronidase chromogenic reporter (580)	
<i>Aspergillus oryzae lacA3</i>	Engineered secretory β -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)	FACSsorting
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)

Inhibitory proteinových interakcí



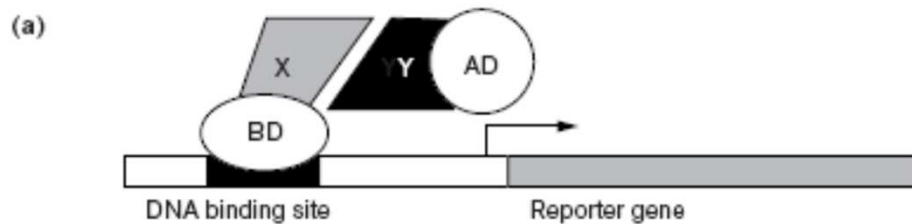
	<u>LexA-</u>	<u>B42-</u>		
A	R1(C)	0		
B	0	FKBP		
A-B	R1(C)	FKBP		

Sc*-H-W-L, gal/raf Sc*-H-W-U, gal/raf

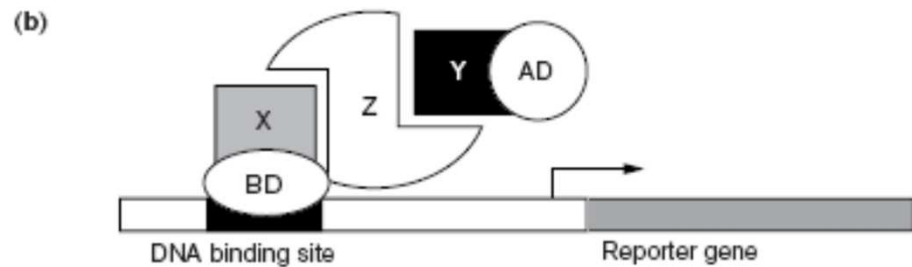
	FK506		
	0	100 nM	2 μM
A			
B			
A-B			

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

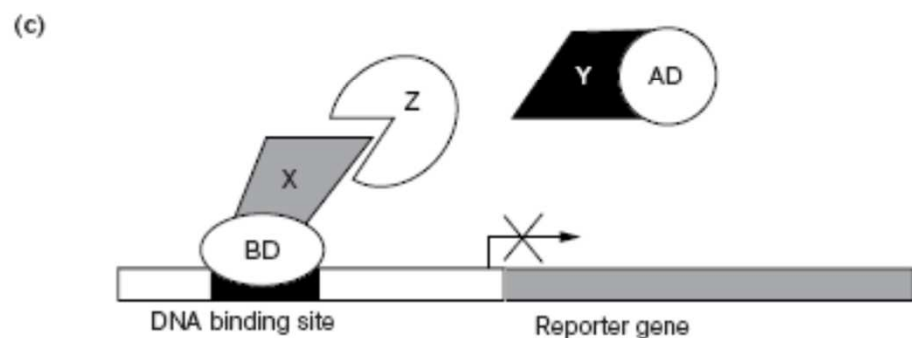
FK506 inhibuje vazbu proteinu FKBP12 na TGFβ-receptor (životaschopnost na FOA plotnách)



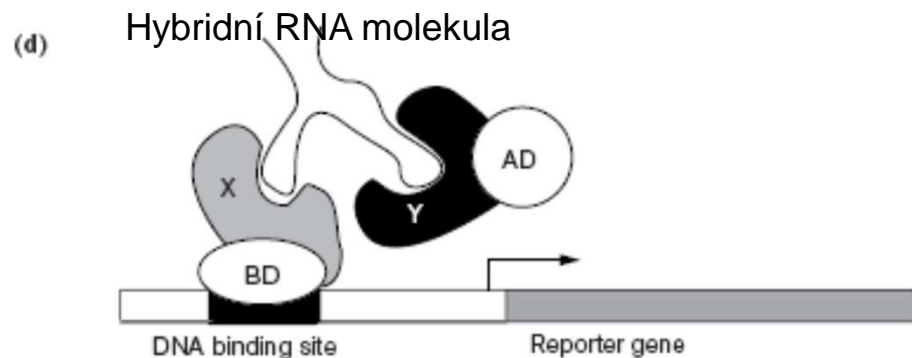
Klasický dvoj-hybridní systém



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

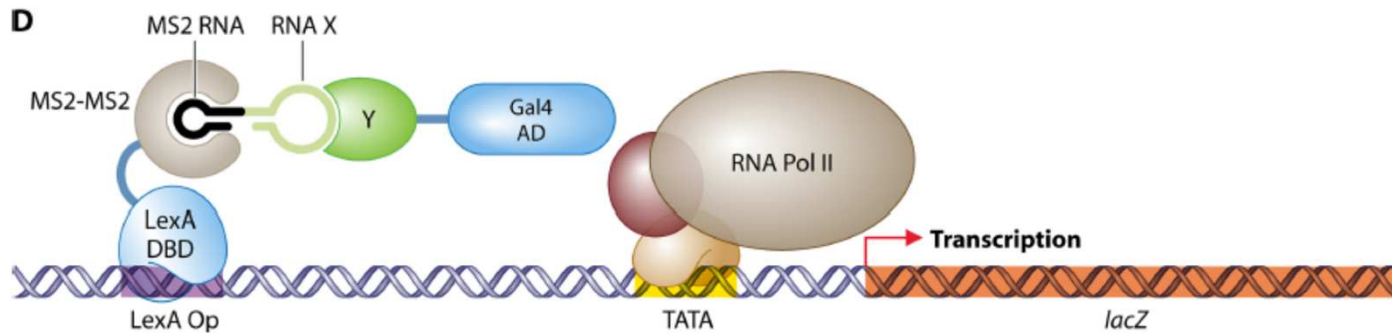


Dvoj-hybridní systém
- proteinový inhibitor interakce



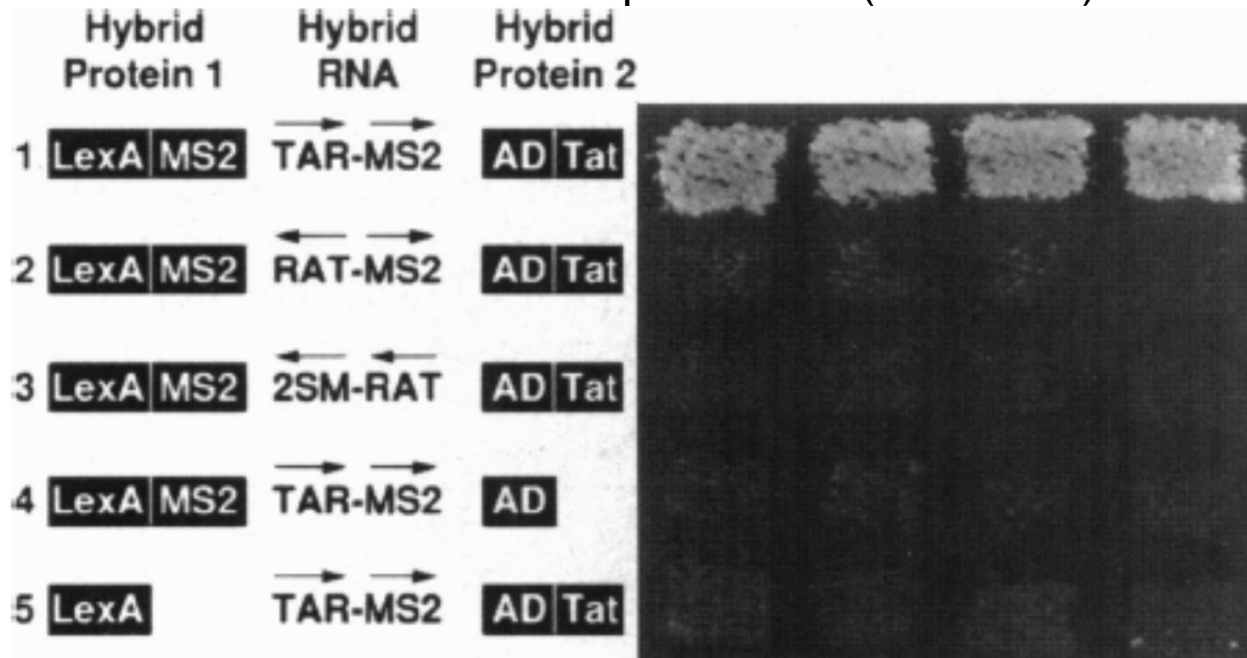
Troj-hybridní systém
– RNA interakce
- ligand/receptor

Analýza vazby protein-RNA (Y3H)



Tři hybridní/fúzní konstrukty:

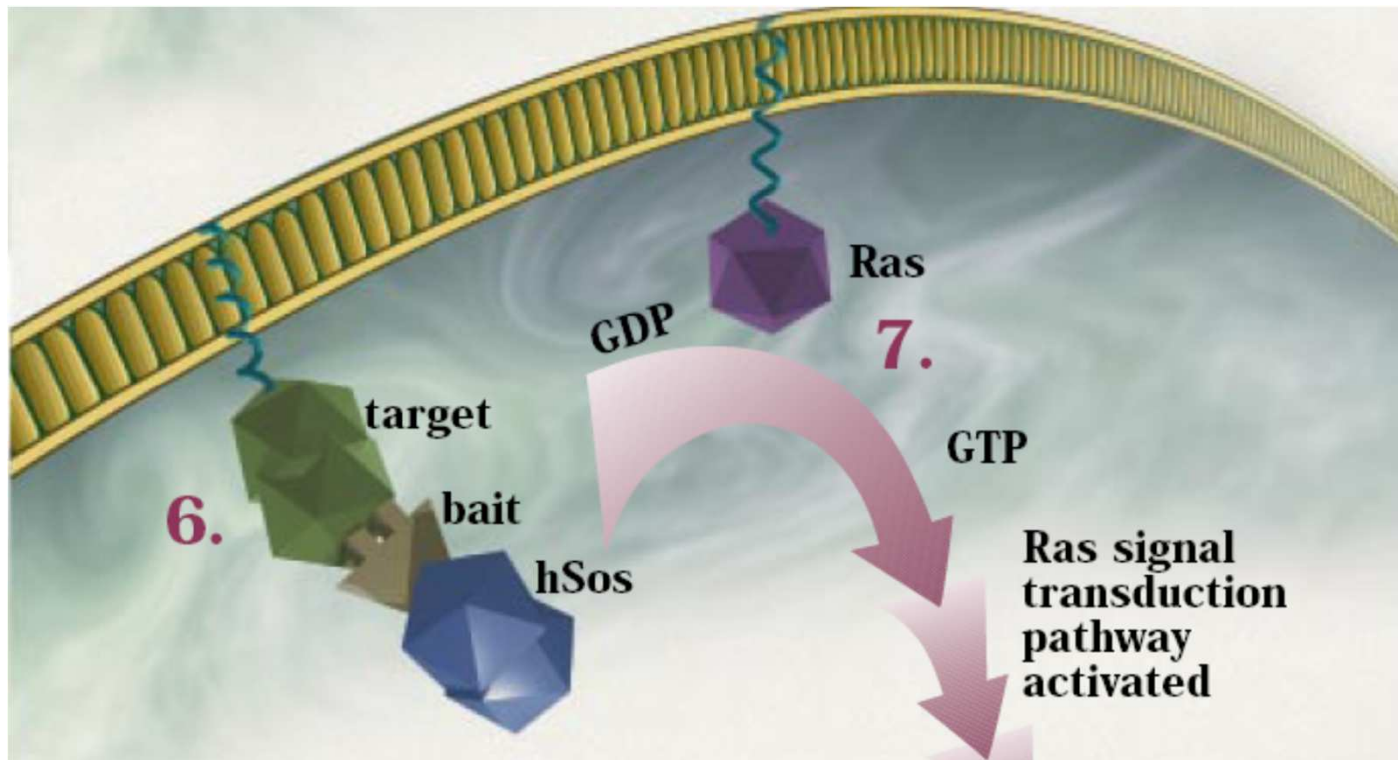
1. DB-Gal4 a RNA-vazebný protein (MS2 virový coat protein)
2. RNA molekula složená z TAR (HIV trans-activation response element) a MS2 sekvence
3. AD-Gal4 a trans-activation protein Tat (váže TAR)



CytoTrap 2-hybridní systém

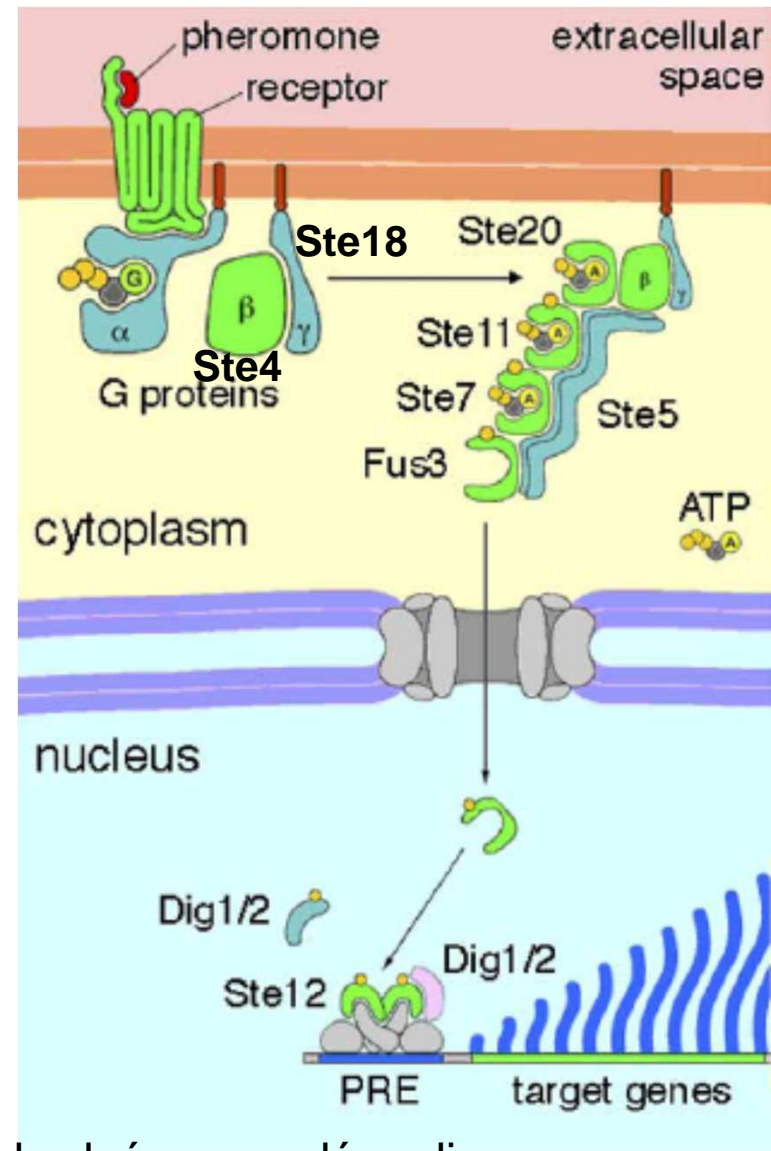
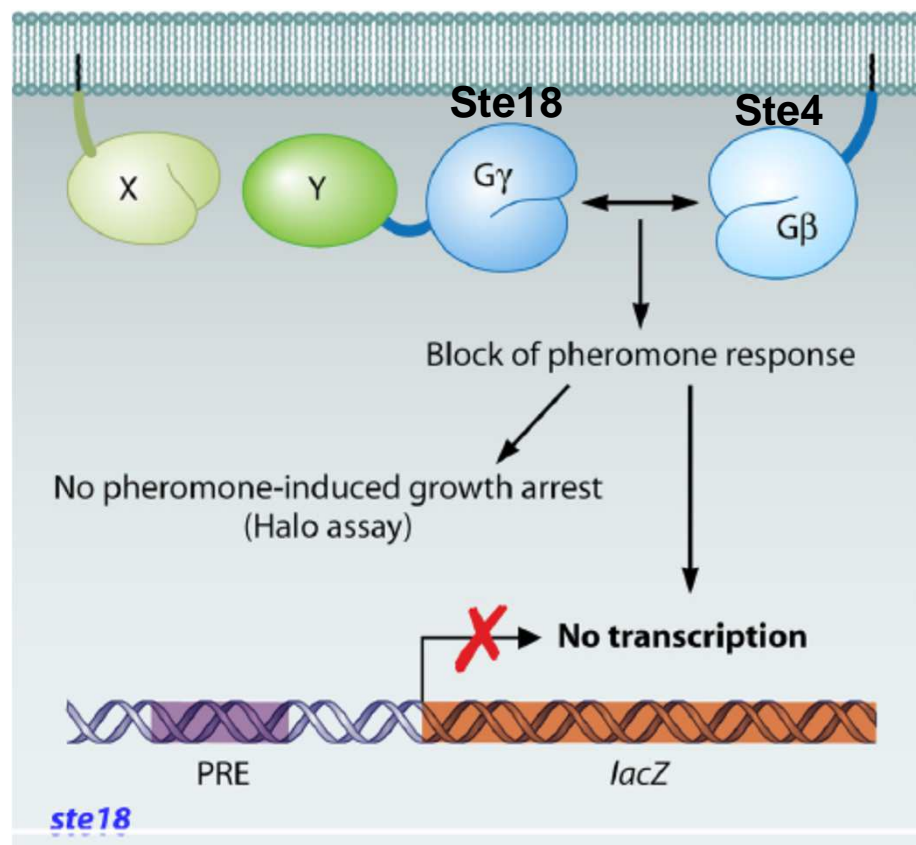
Kvasinkový *cdc25-2* ts mutant – lidský hSOS (guanine exchange factor) aktivuje RAS pokud je ukotven na membránu v jeho blízkosti

- 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 α -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 α -feromonu)

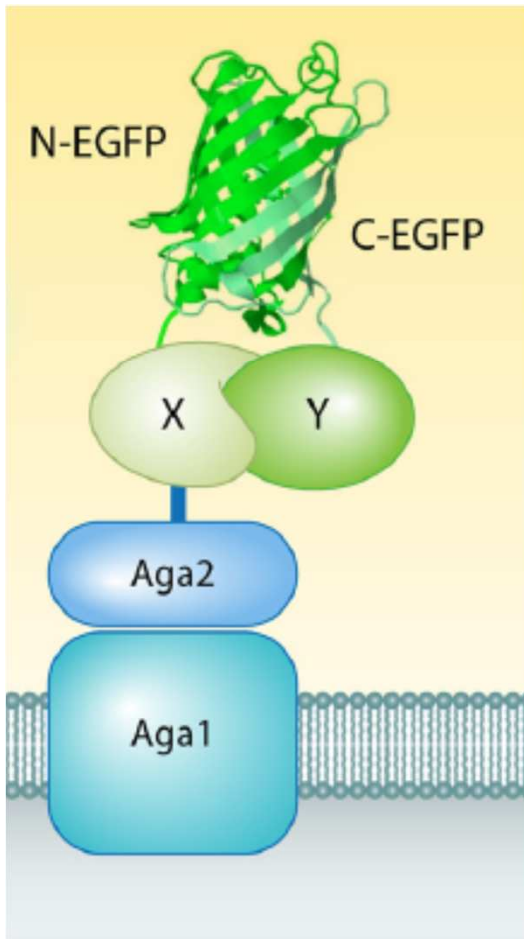


vhodný pro analýzu disrupce

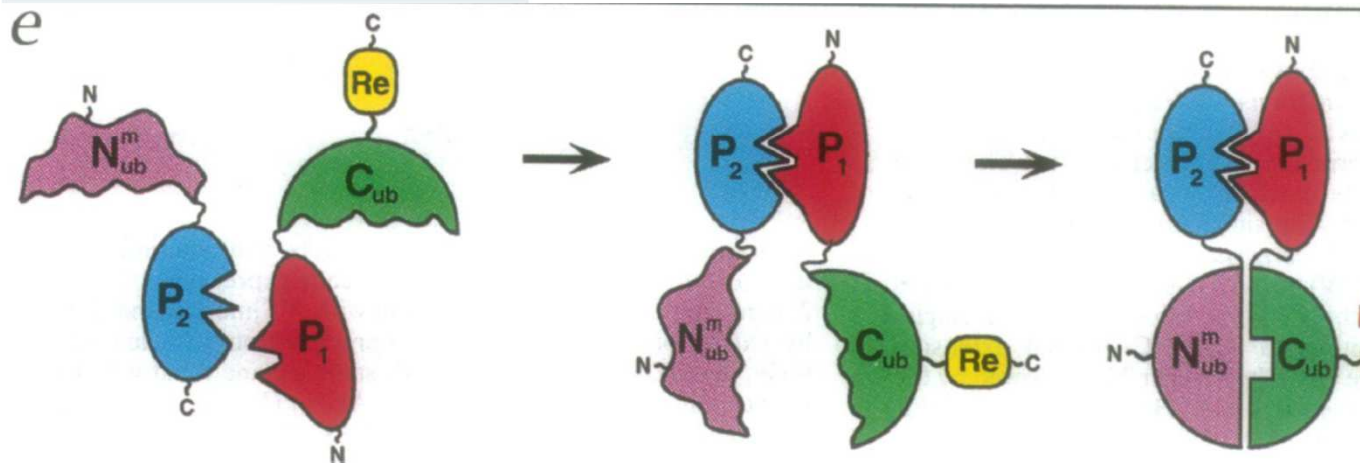
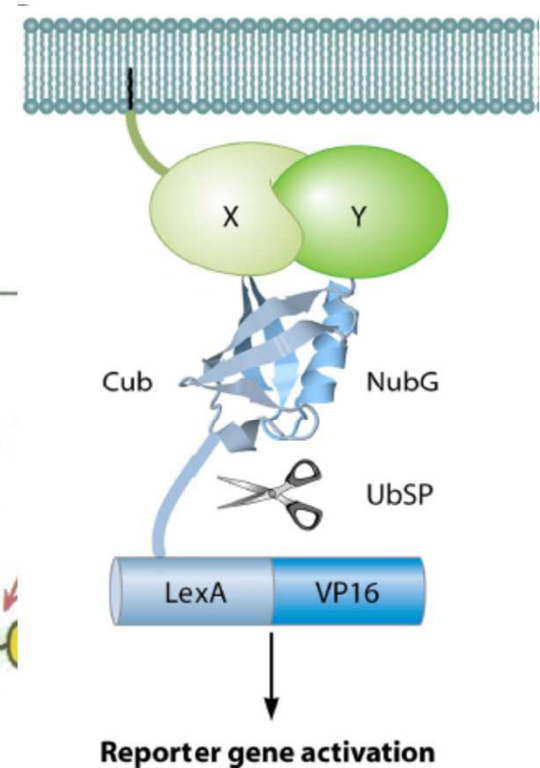
Komplementace proteinů

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

