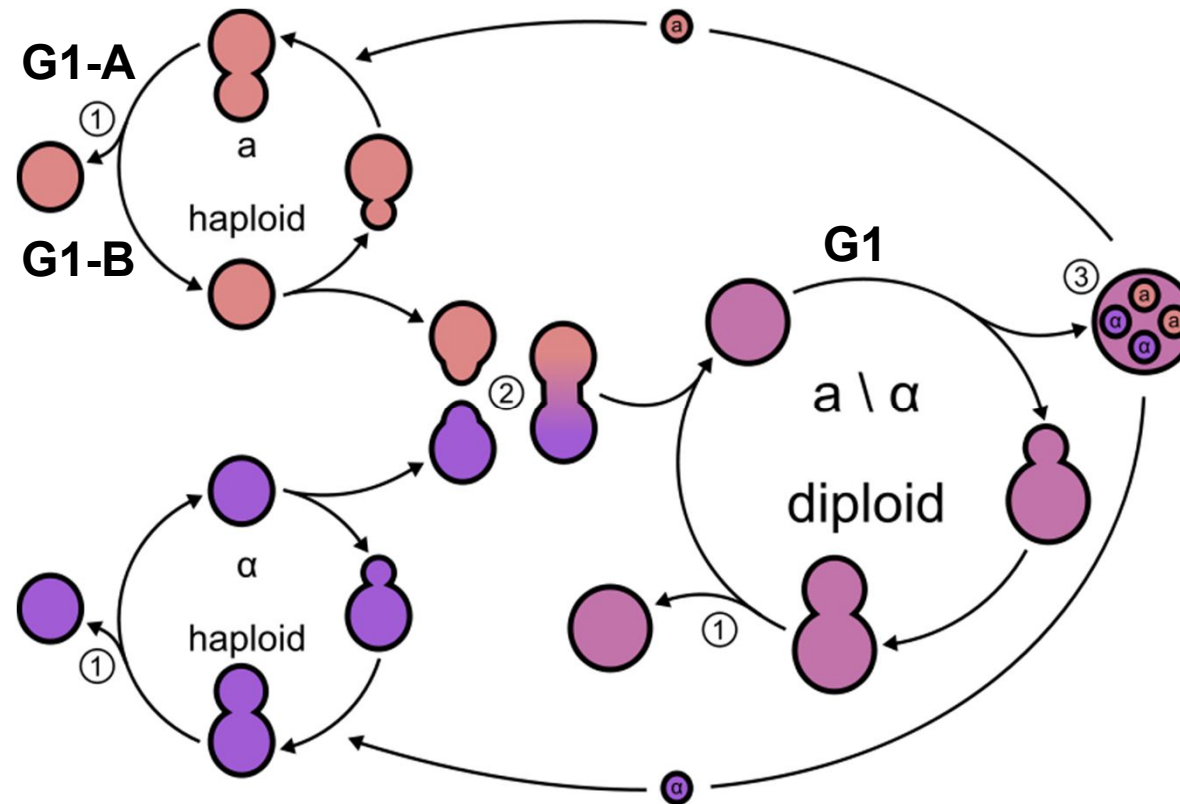


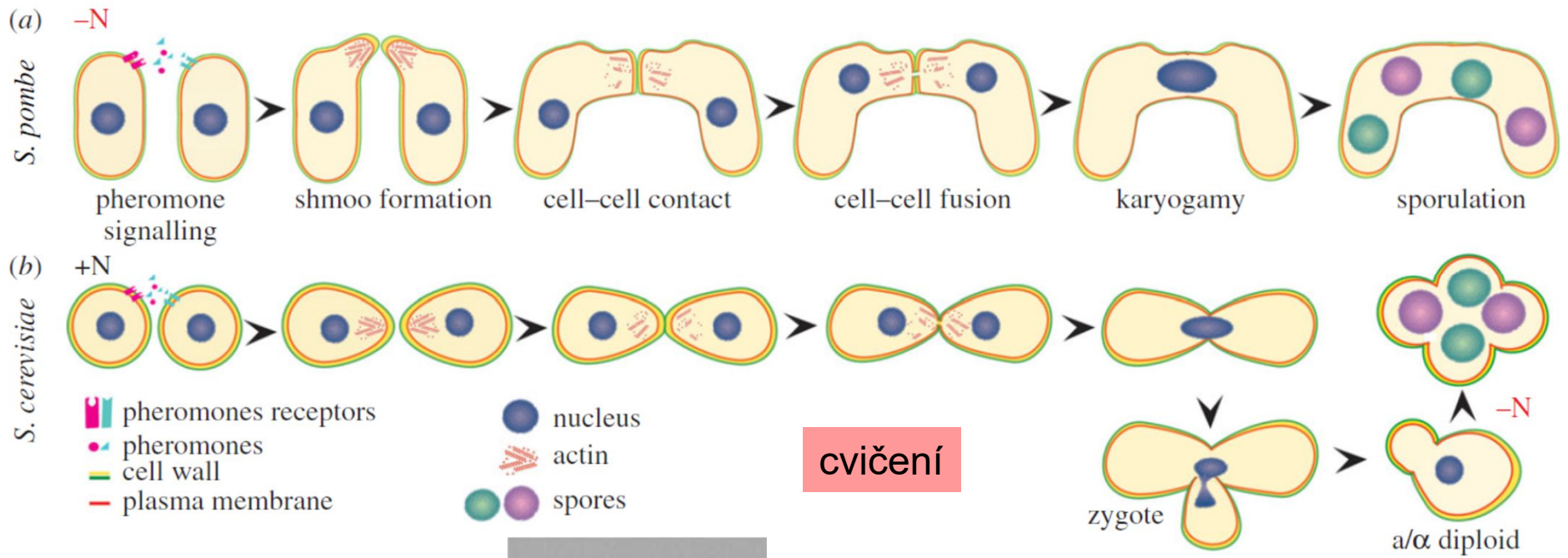
Osnova

- 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

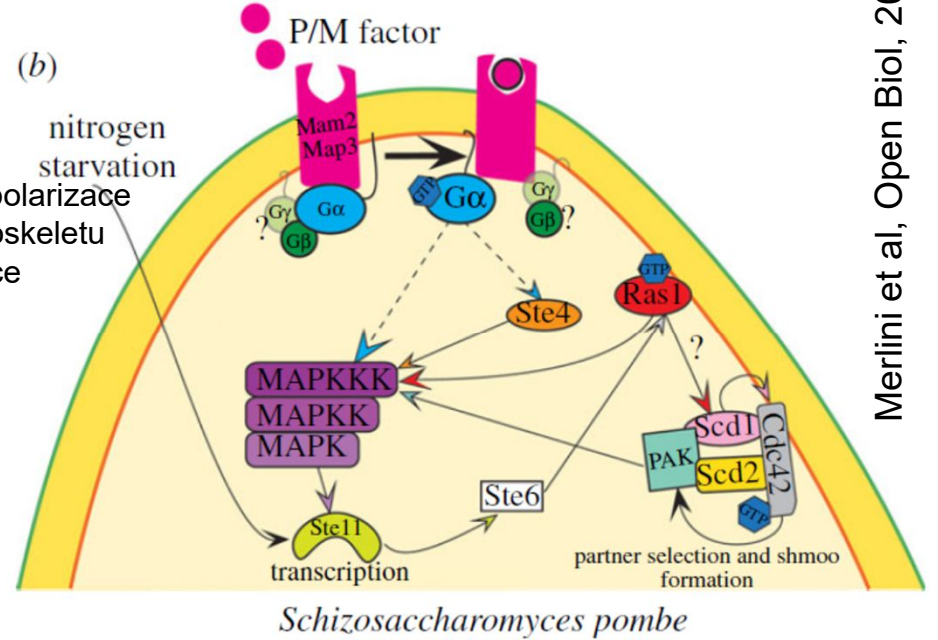
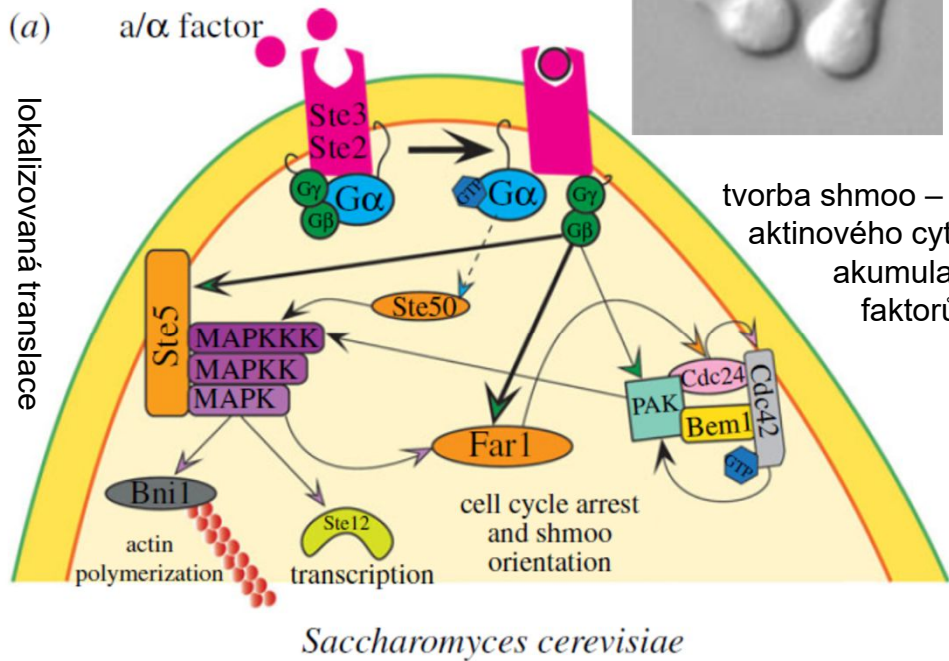


- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
- *S. cerevisiae* = a/alfa, *S. pombe* = h+/h-
- vytváří diploidní buňky (*S. cerevisiae* = stabilní, *S. pombe* = okamžitě sporulují)
- párování doprovázeno zásadními změnami v morfologii

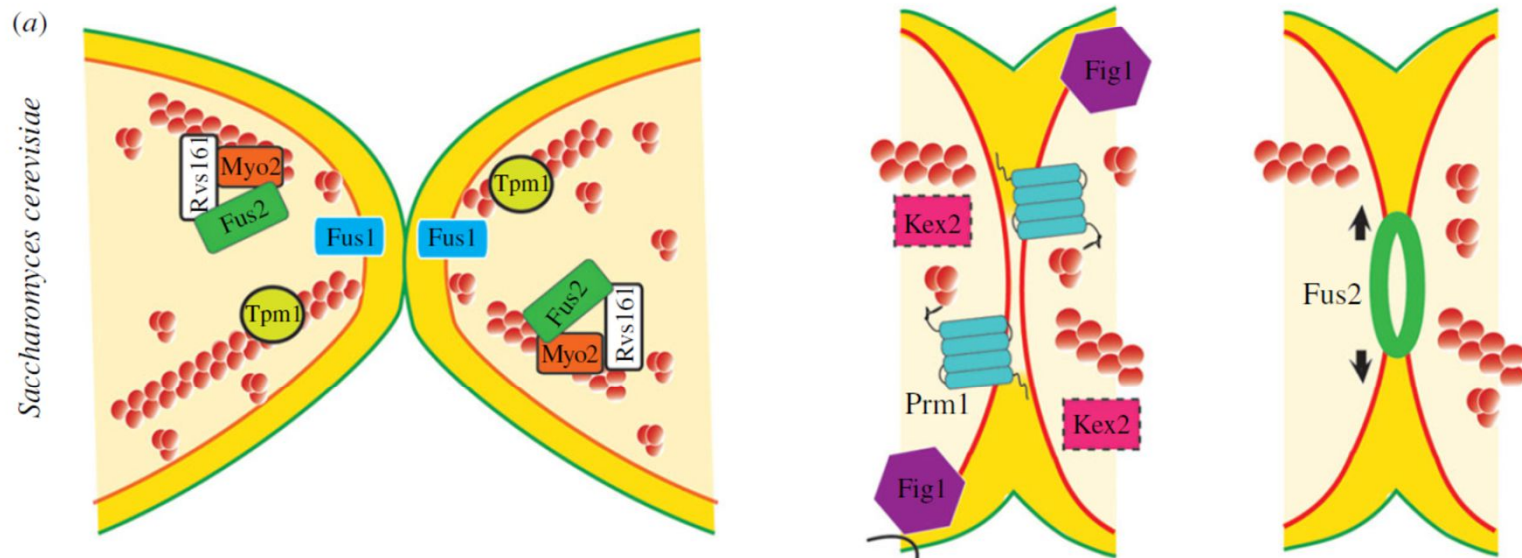
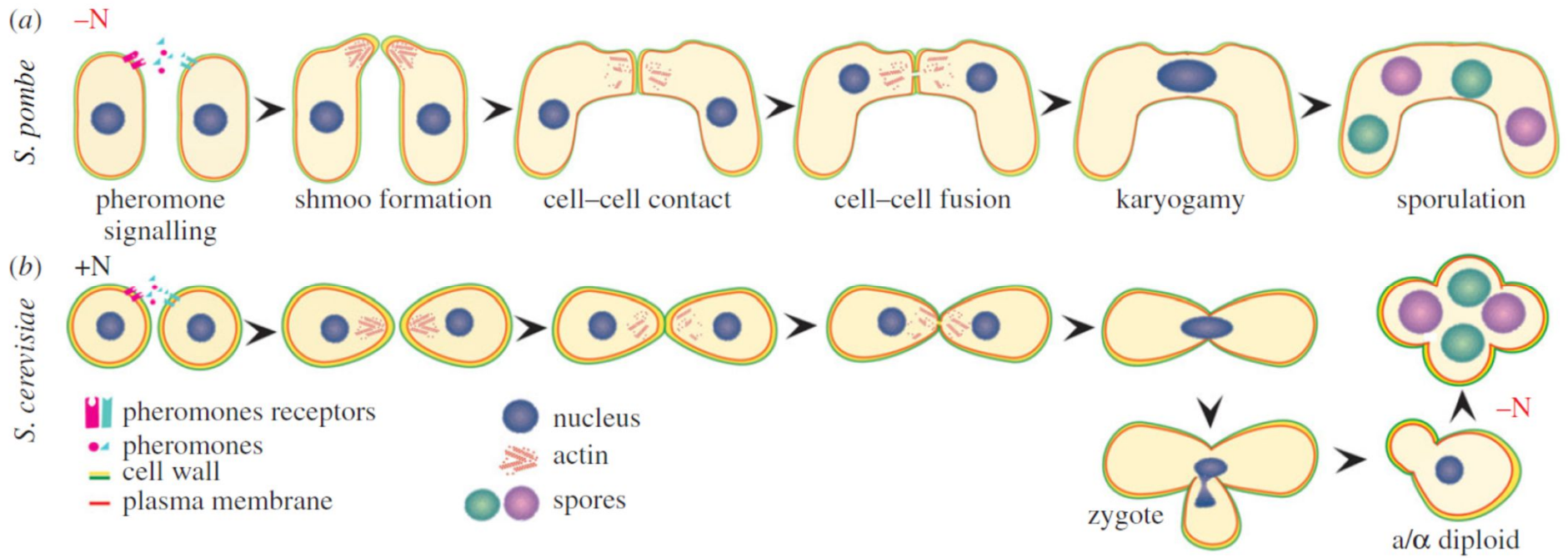


cvičení

STE = sterile



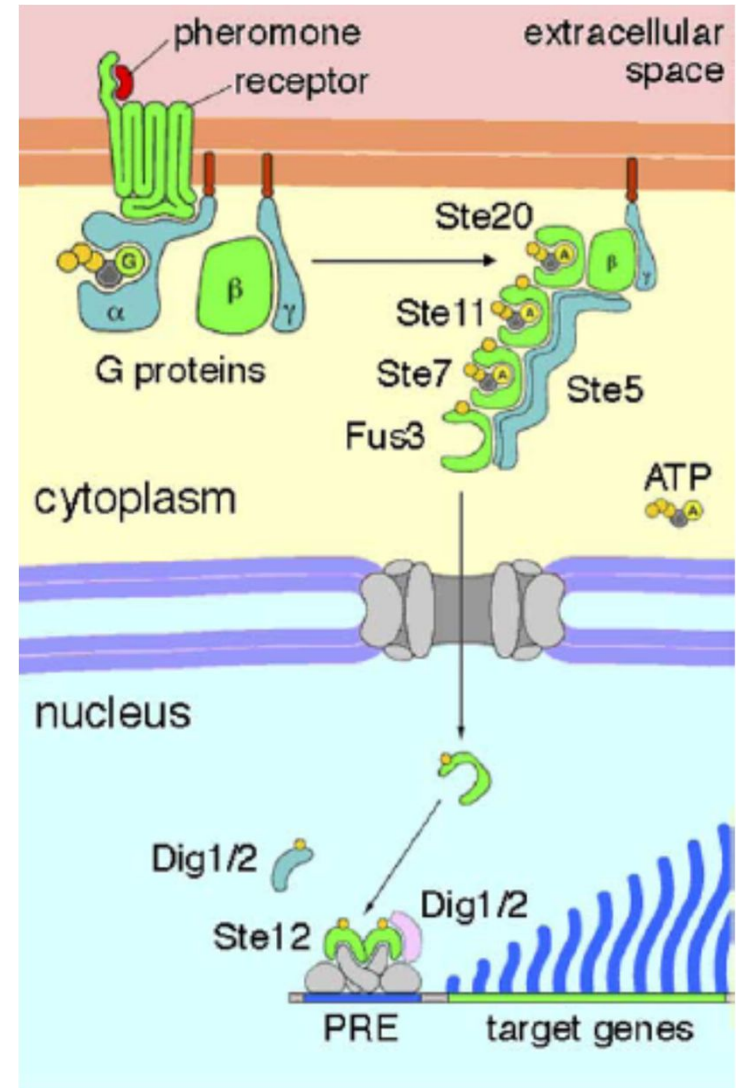
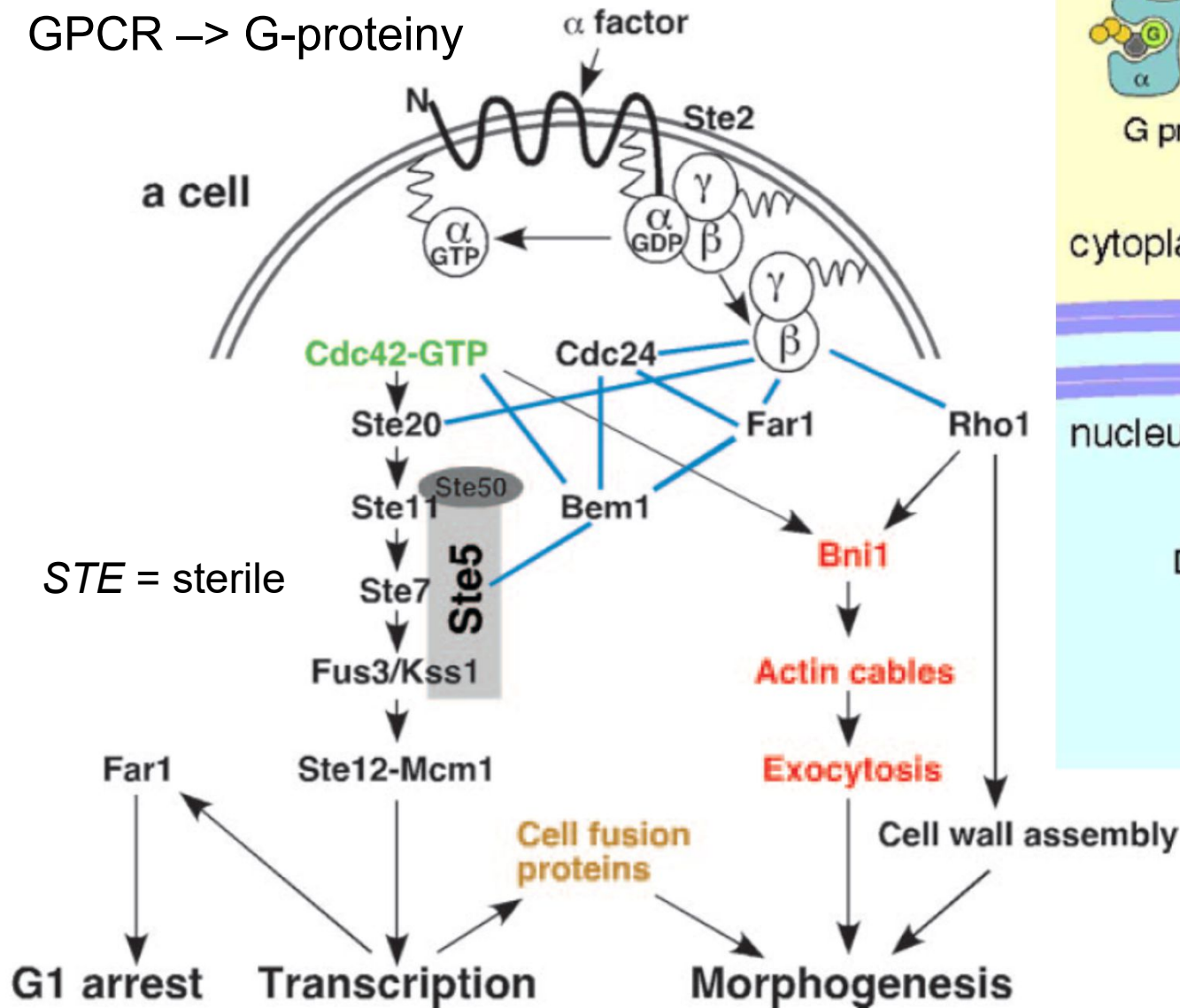
Merlini et al, Open Biol, 2013



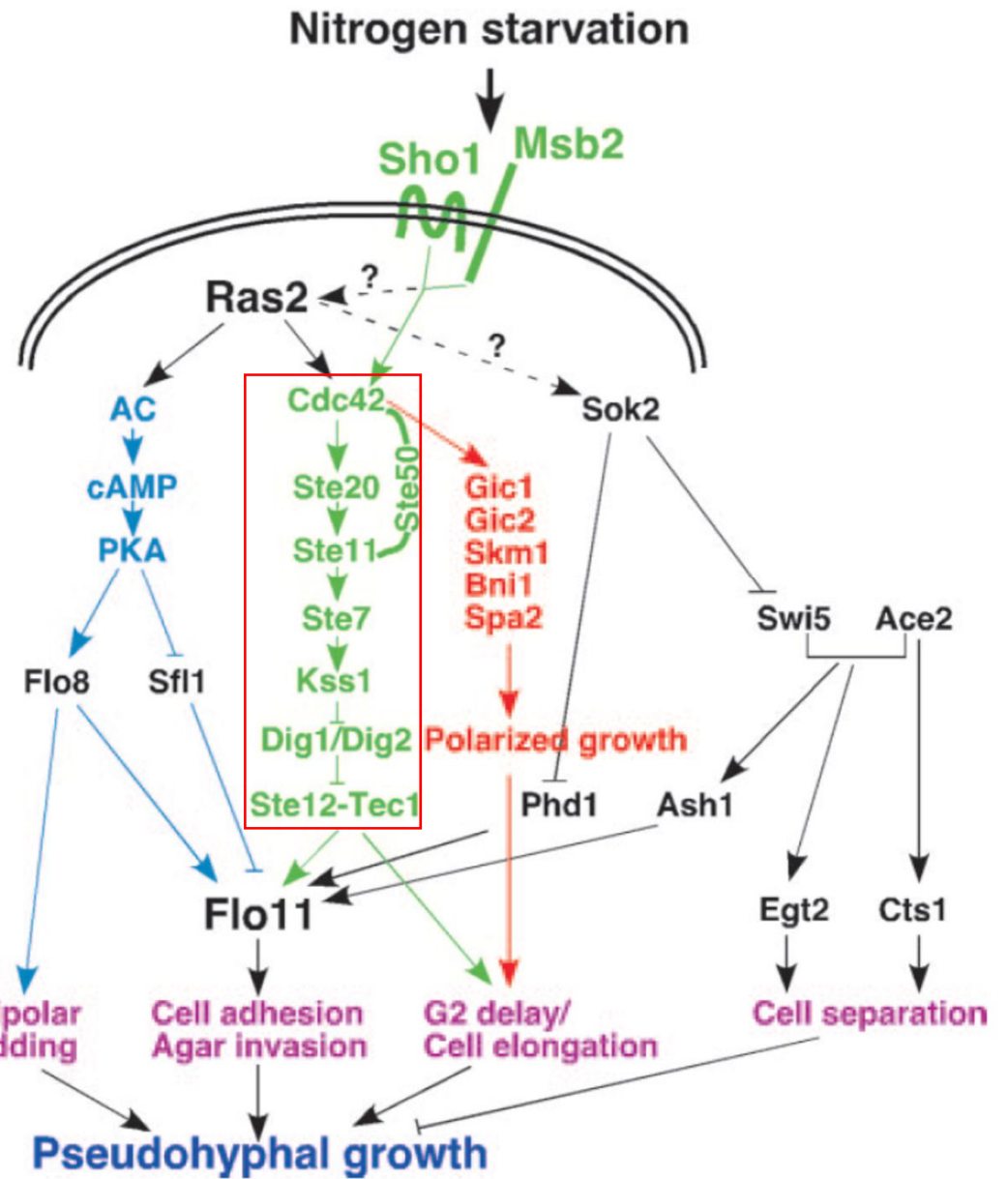
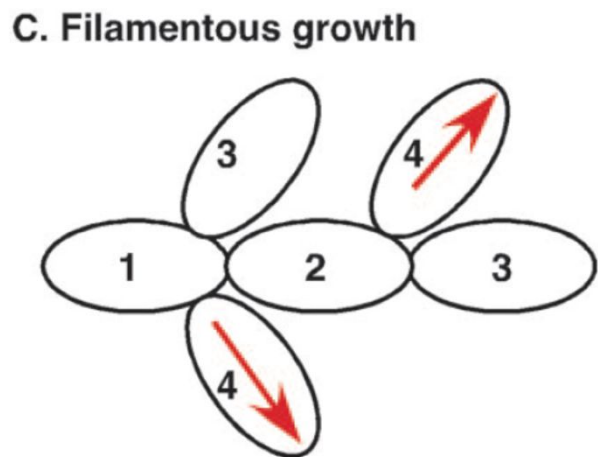
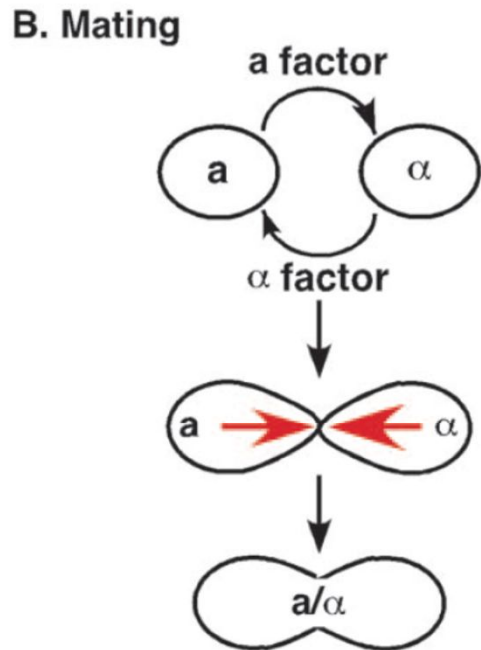
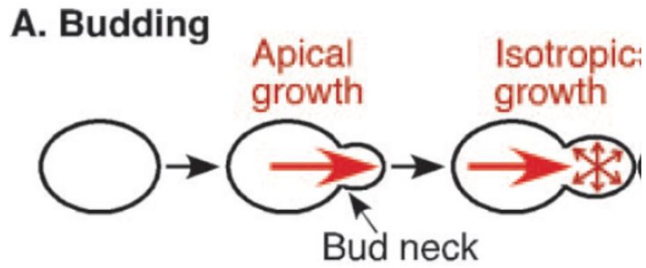
fúze buněčných stěn – vytvoří se pór v cytoplasmatické membráně

Signální dráha – α faktor

GPCR \rightarrow G-proteiny

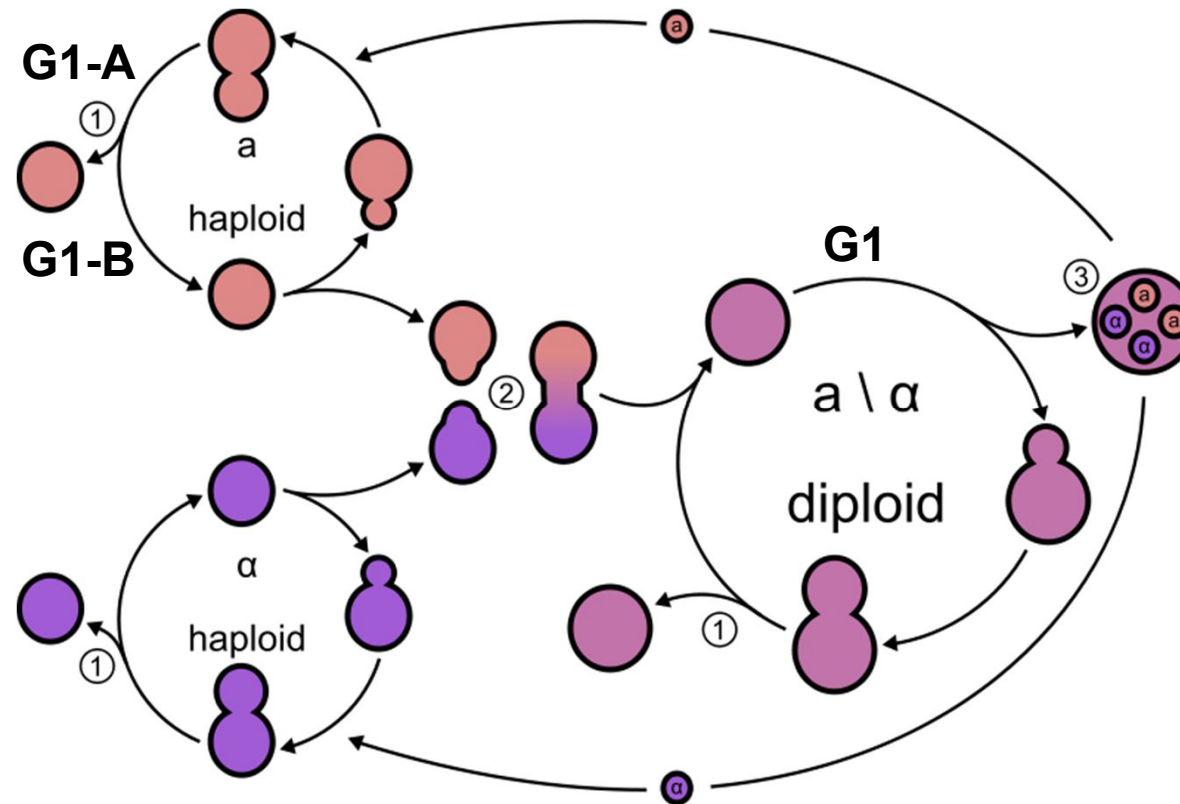


Park et al., MMBR, 2007
Wang et al., Nature, 2004



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

Párování/mating kvasinkových buněk



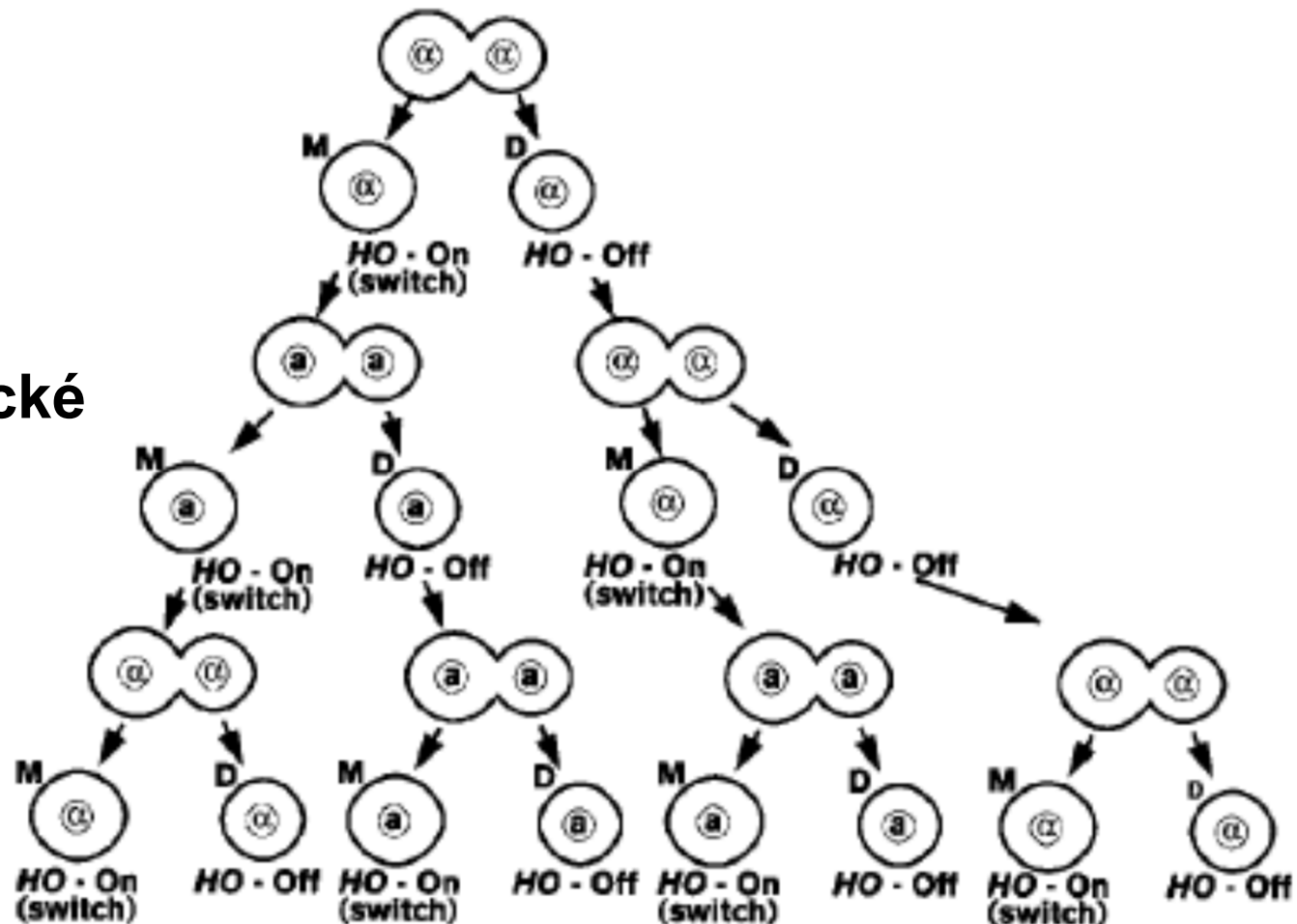
- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
- *S. cerevisiae* = a/alfa, *S. pombe* = h+/h-
- vytváří diploidní buňky (*S. cerevisiae* = stabilní, *S. pombe* = okamžitě sporulují)
- párování doprovázeno zásadními změnami v morfologii

Přepínání párovacího typu

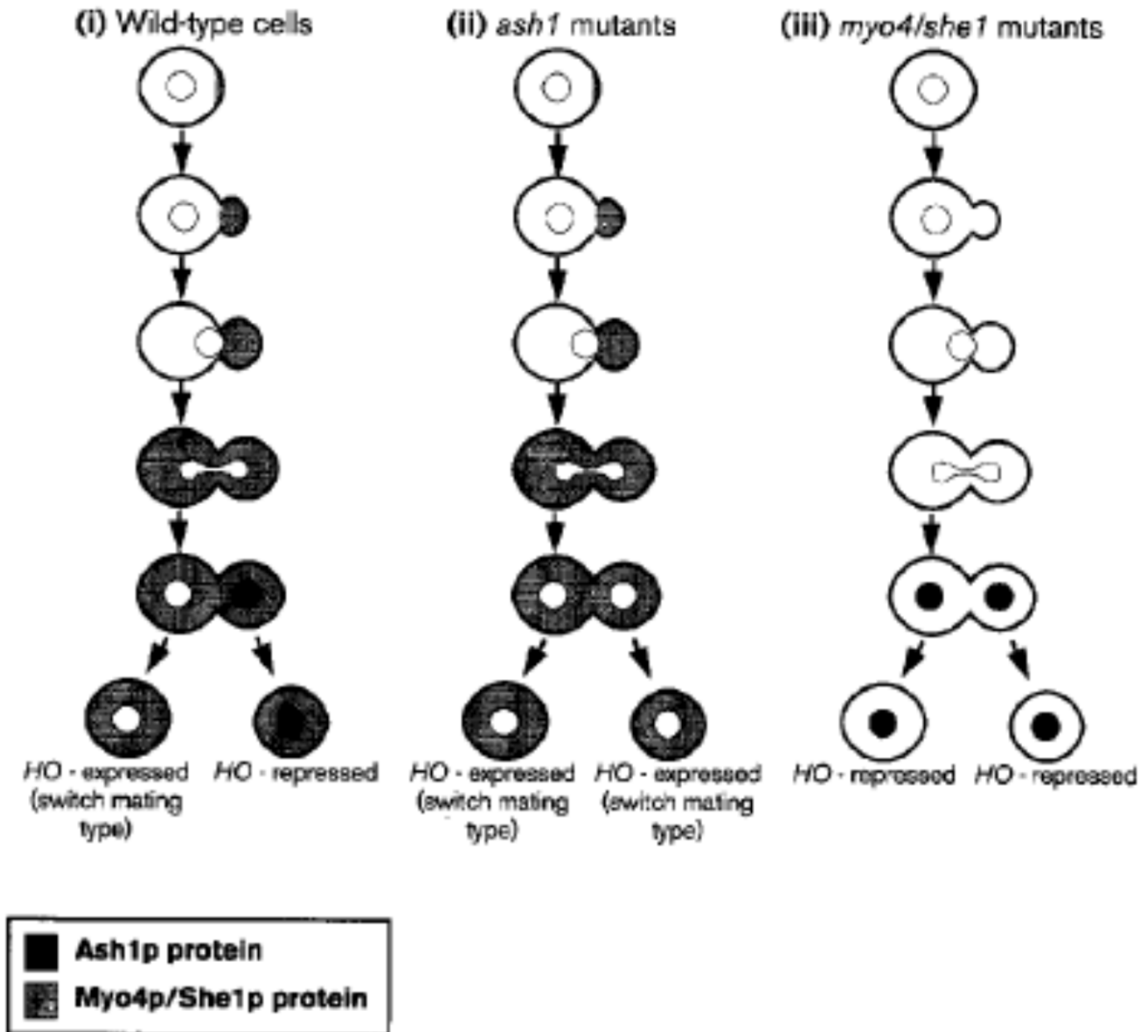
Homotalické - HO endonukleasa je exprimována pouze v mateřské buňce v G1 fázi (dceřinná si uchová původní typ)

Heterotalické – nemají funkční HO endonukleasu

homotalické



Asymetrická lokalizace Ash1p



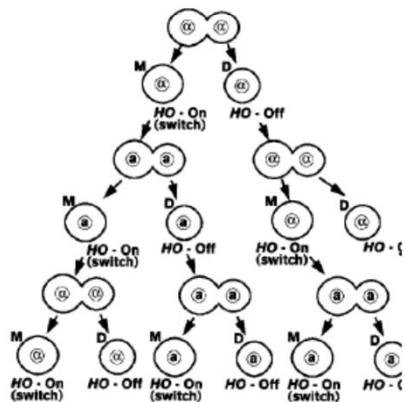
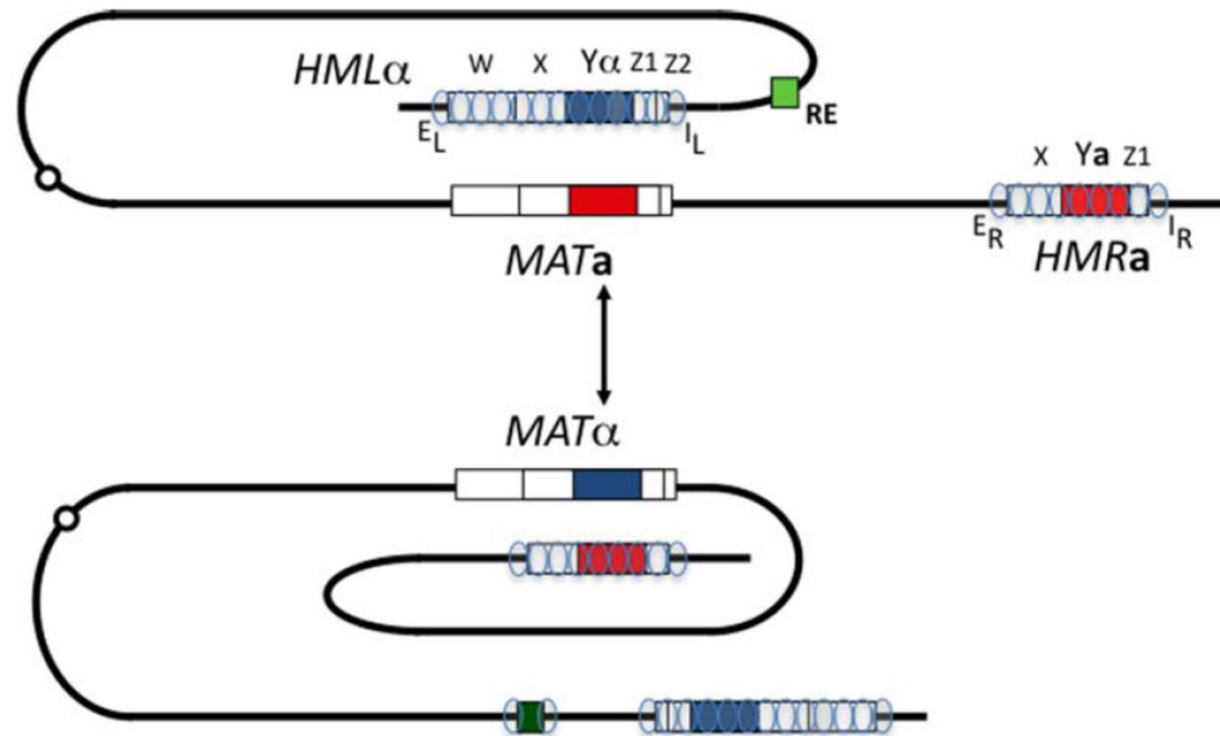
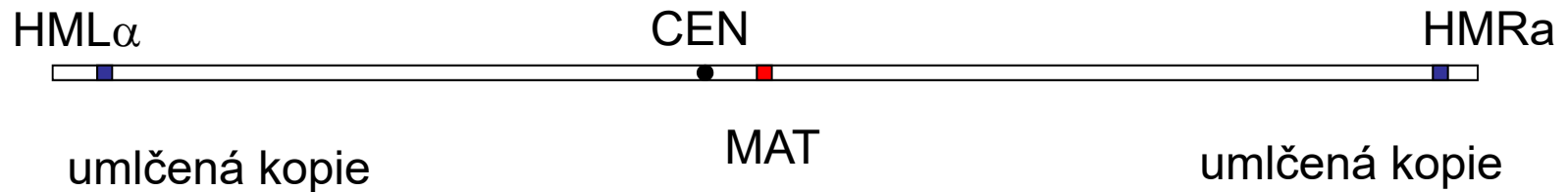
-Ash1p represor je asymetricky lokalizován do dceřiné buňky, kde blokuje transkripci HO-endonukleasy

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

- (translace RNA na specializovaných ribozomech asociovaných s cytoskeletem

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:

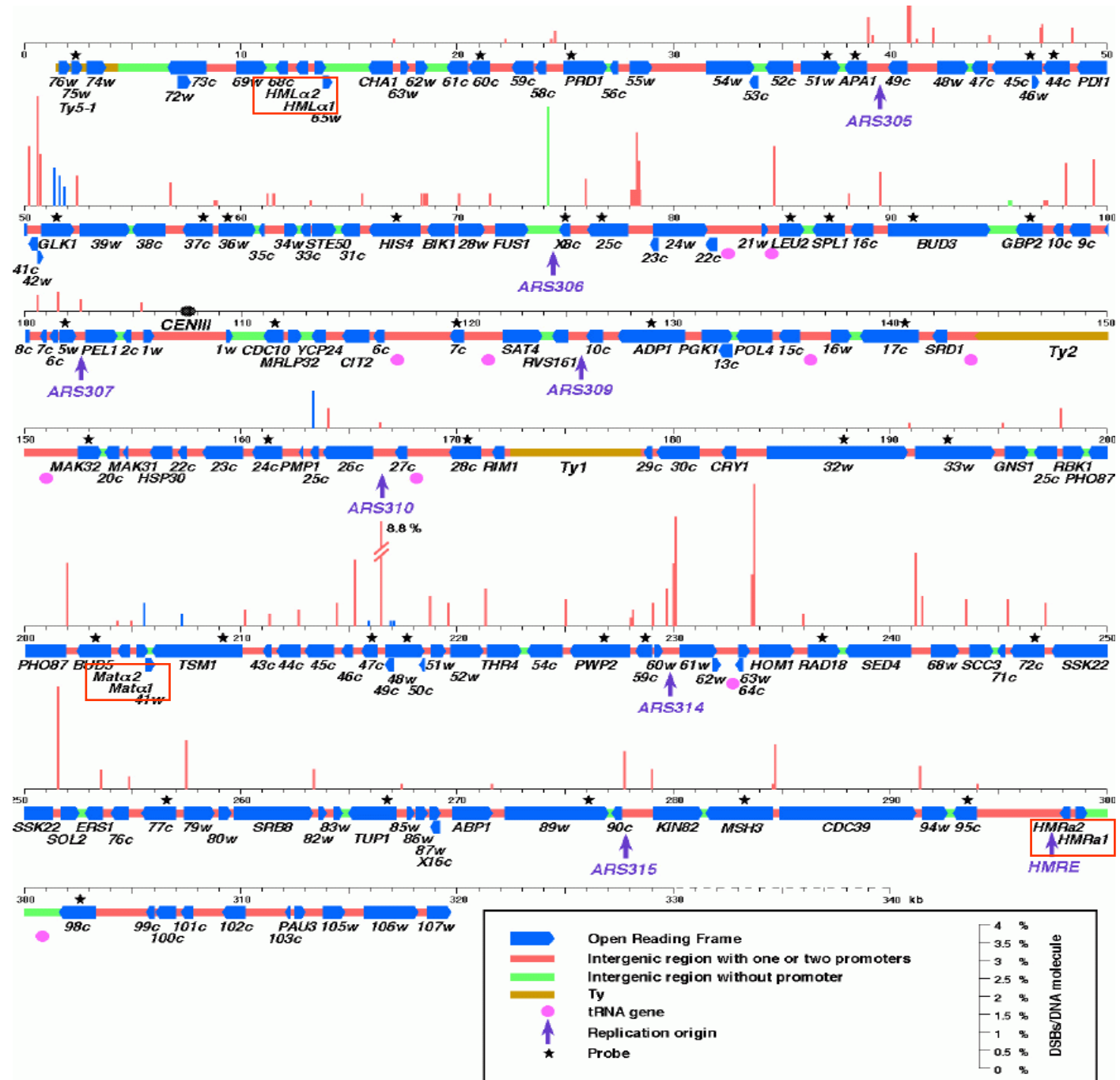
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

Co $a1$, $a2$ + $\alpha1$, $\alpha2$ 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.= *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 meiosy), *HO*, *NEJ*1, *LIF*1

MAT lokus	Typ buňky	Geny kontrované 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

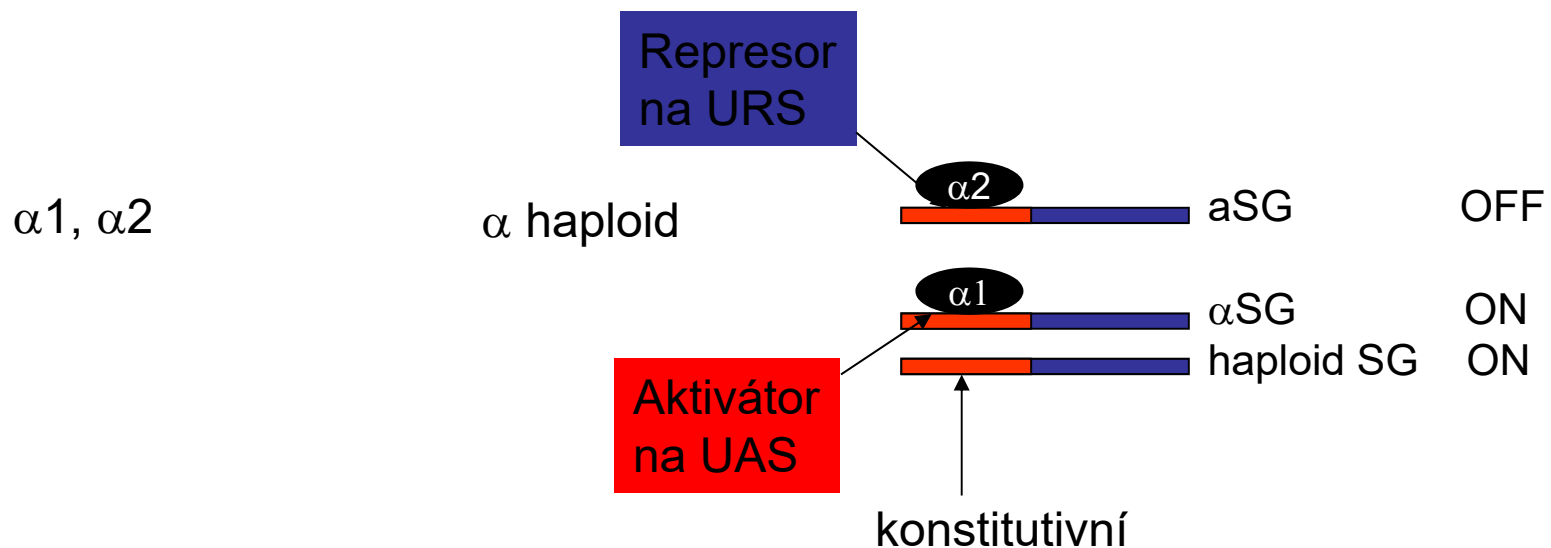
Kvasinkové promotory se liší od bakteriálních a vyšších eukaryot (kvasinky netranskribují z takových promotorů – kvasinkové plasmidy ...)

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

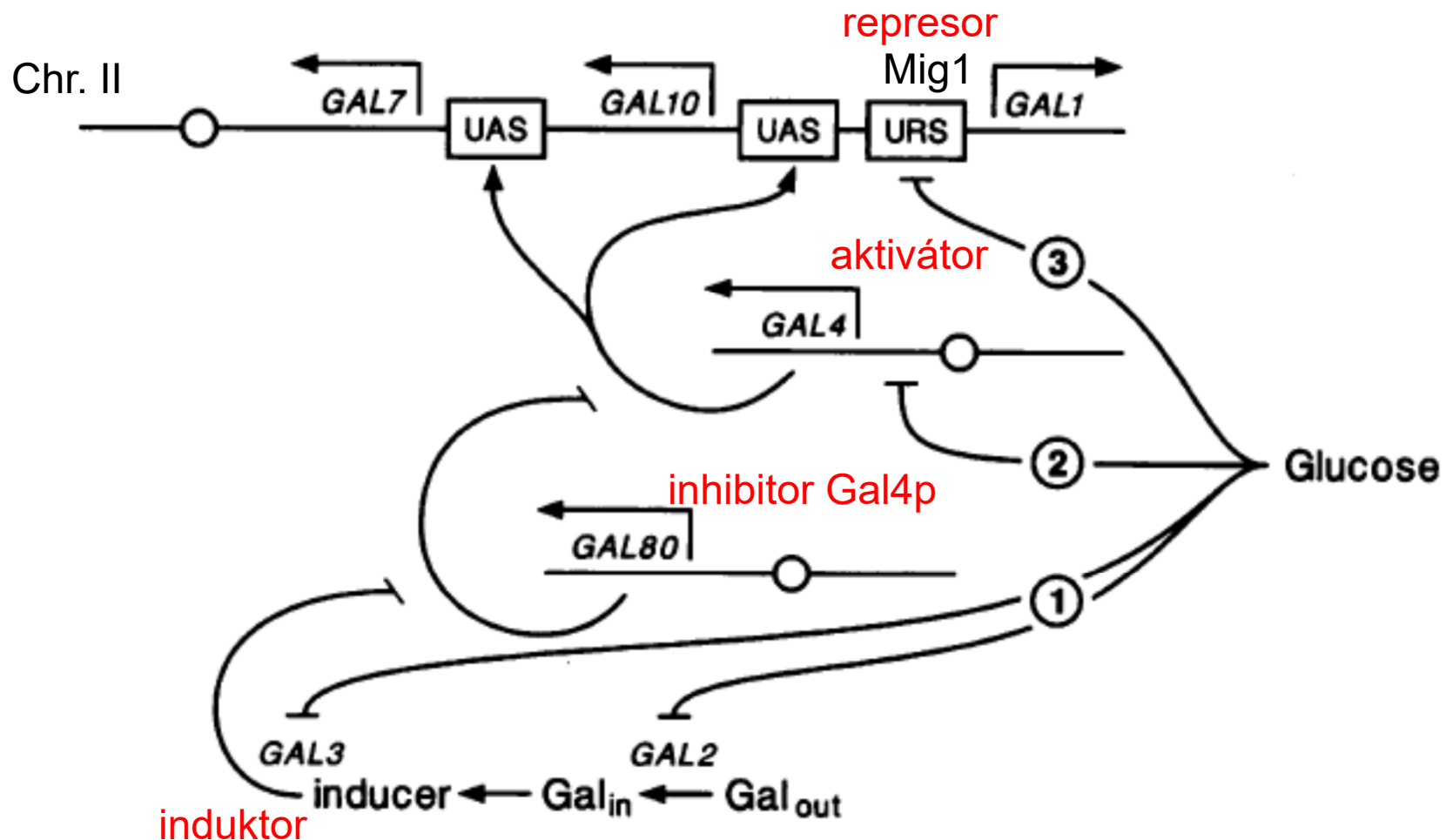
- TATA box (TATAT/AAT/A) je 60-120bp od iniciačního místa (podobné Pribnowovu boxu u bakterii)

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

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

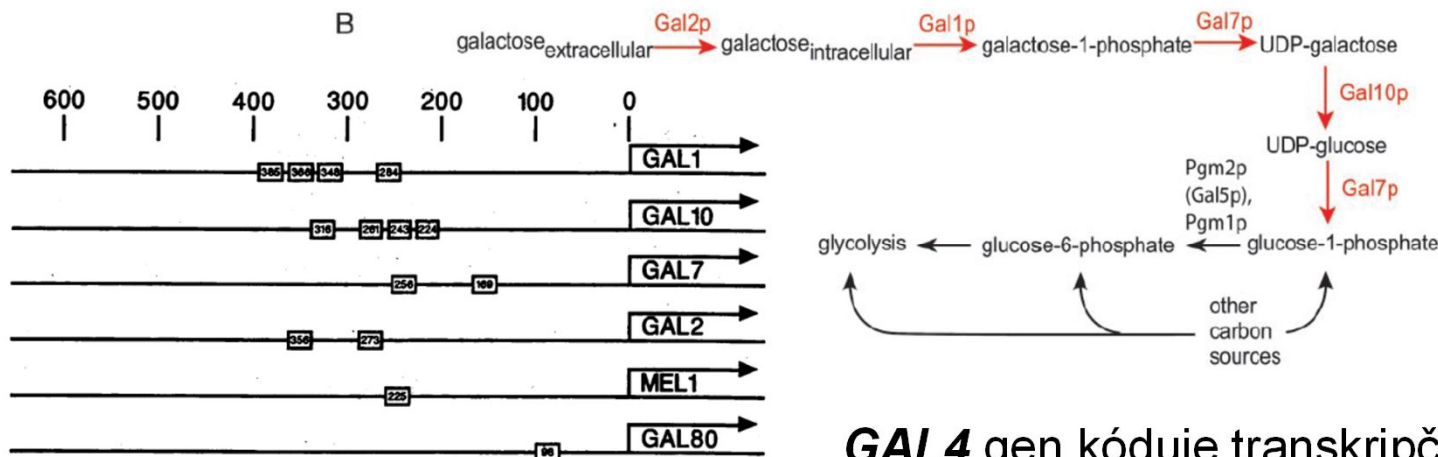
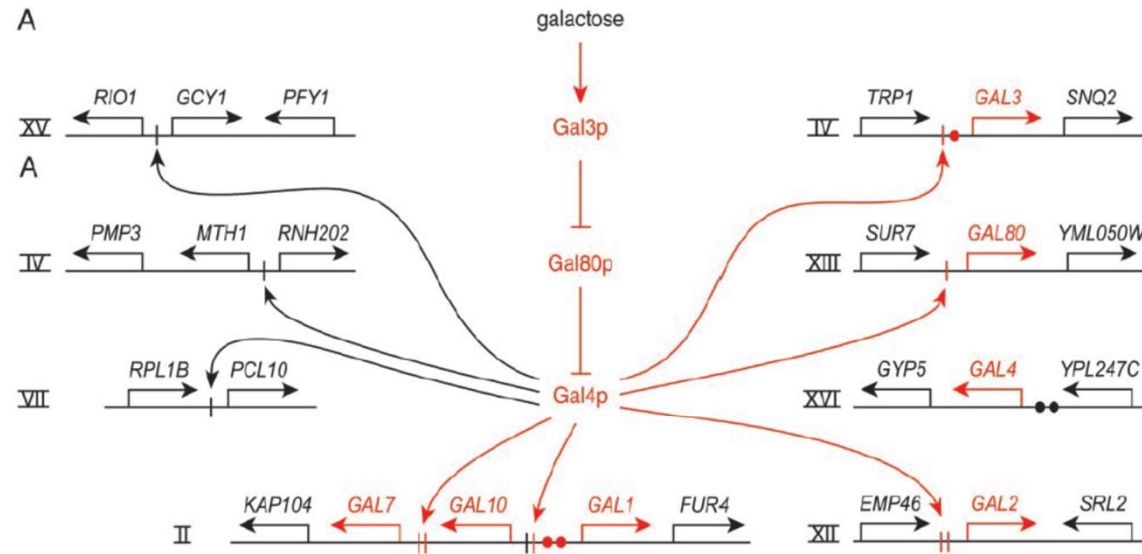


Regulace transkripce GAL genů



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

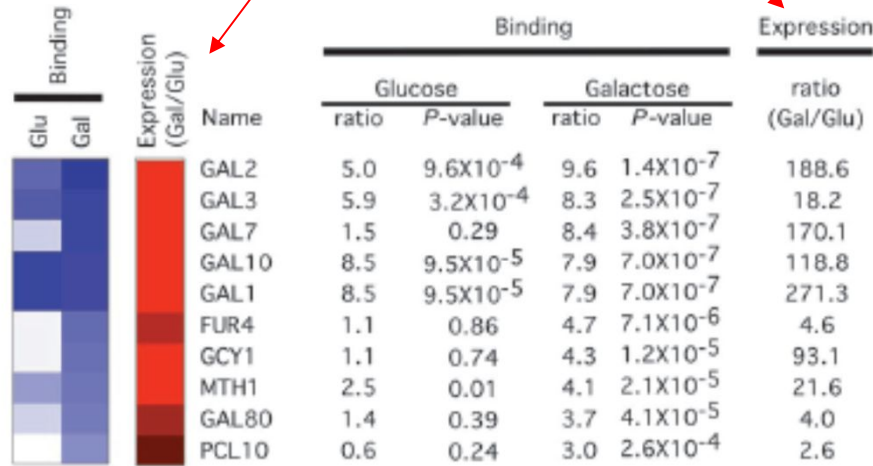
GAL4 gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS **GAL1**, **GAL7**, **GAL10** ...

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

ChIP Gal4p

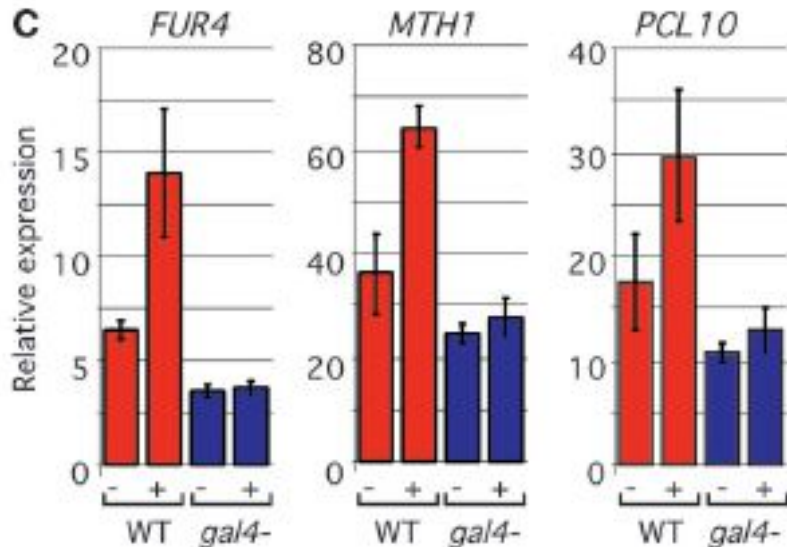
microarray po galaktose

A

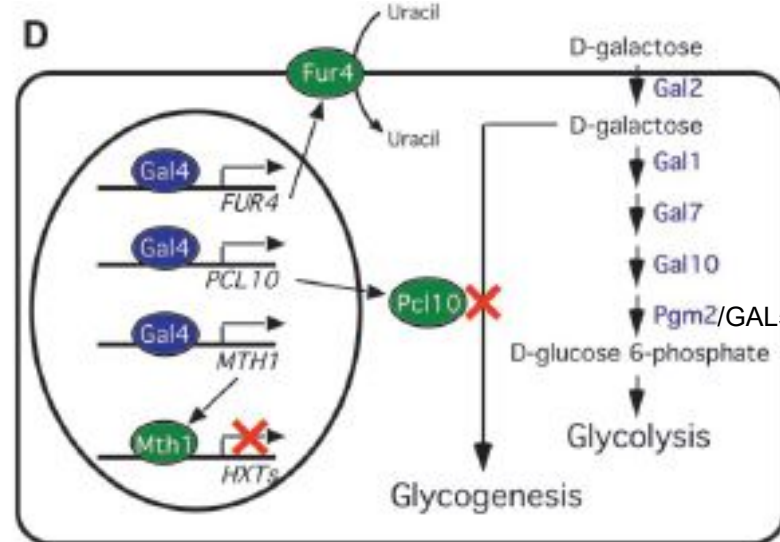


FUR4 zvyšuje množství uracilu pro UDP-Gal
 MTH1 potlačuje transport glukosy (zlepšuje příjem gal)
 PCL10 potlačuje glyconeogenezi (maximalizuje zisk z gal)

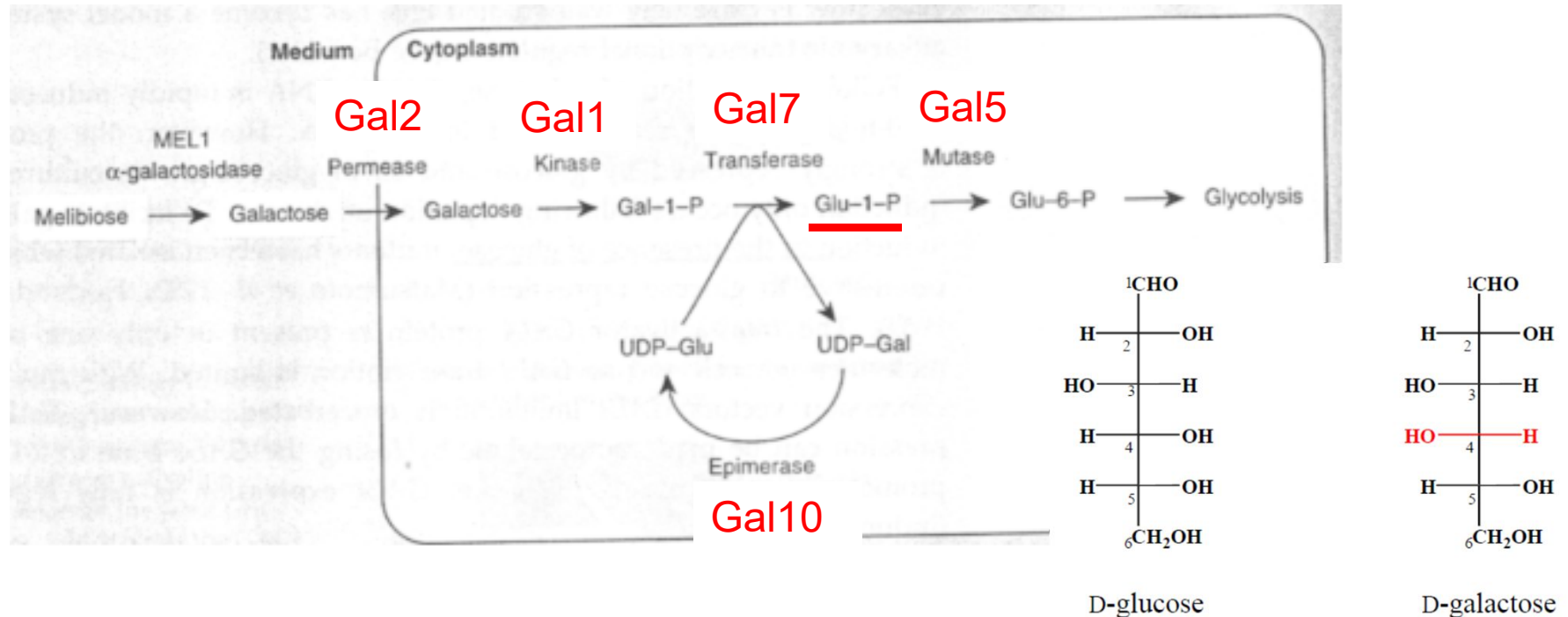
C



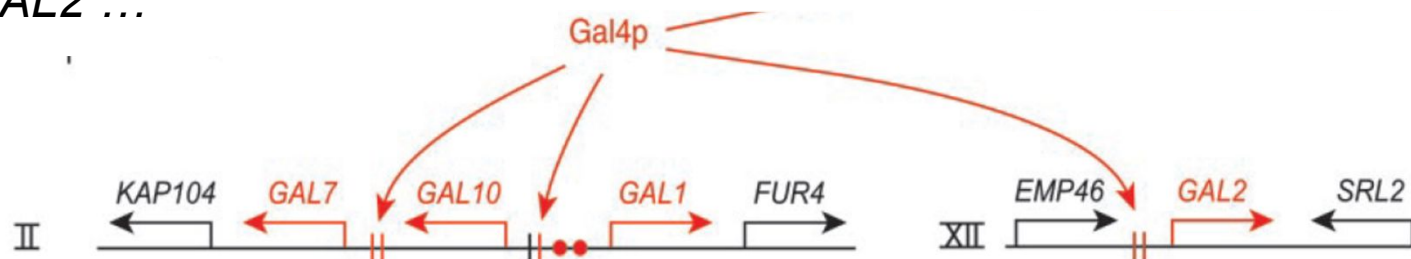
D



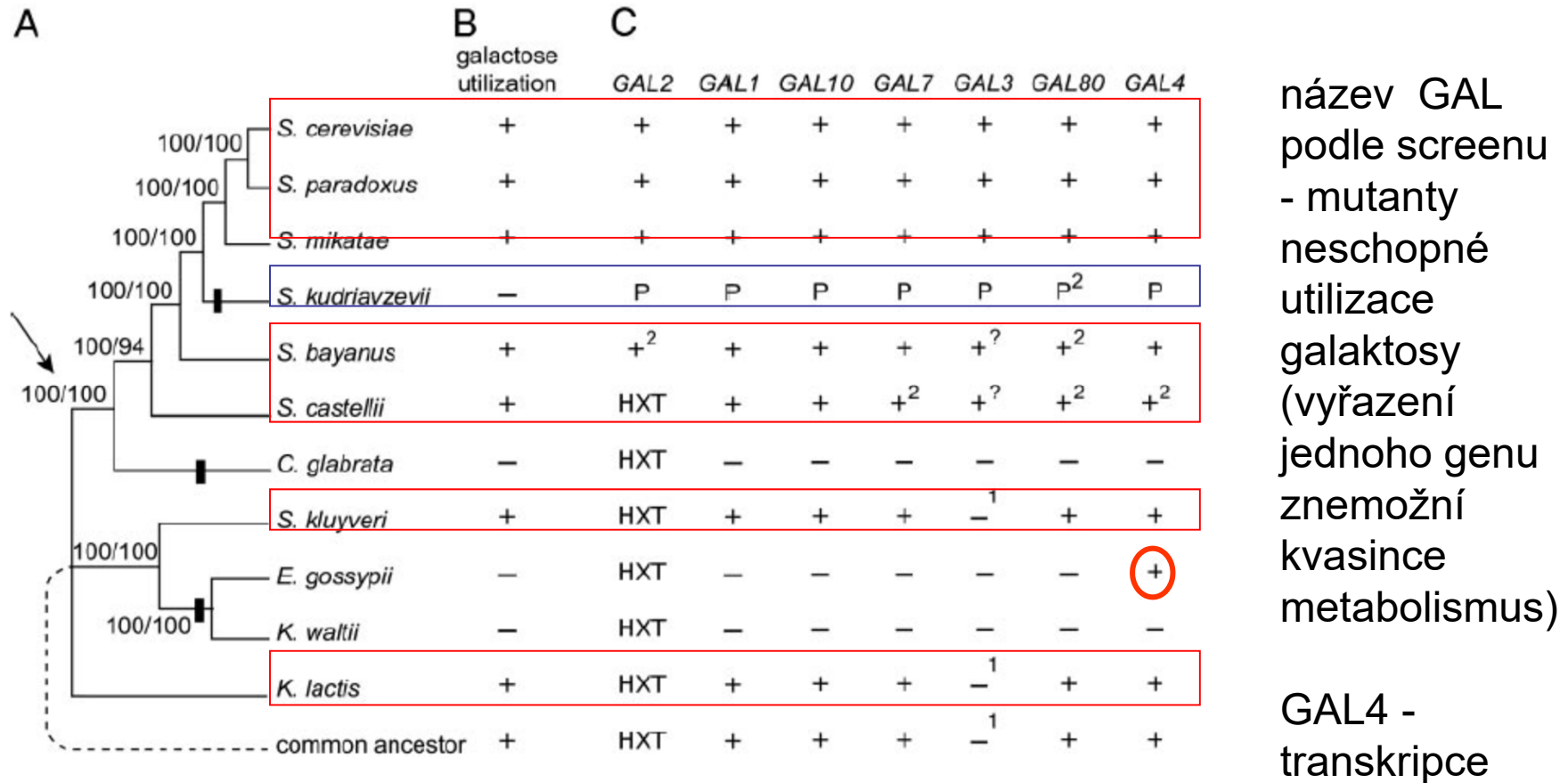
Regulace metabolické dráhy galaktózy



- 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* ...



Rozdíly v utilizaci galaktózy

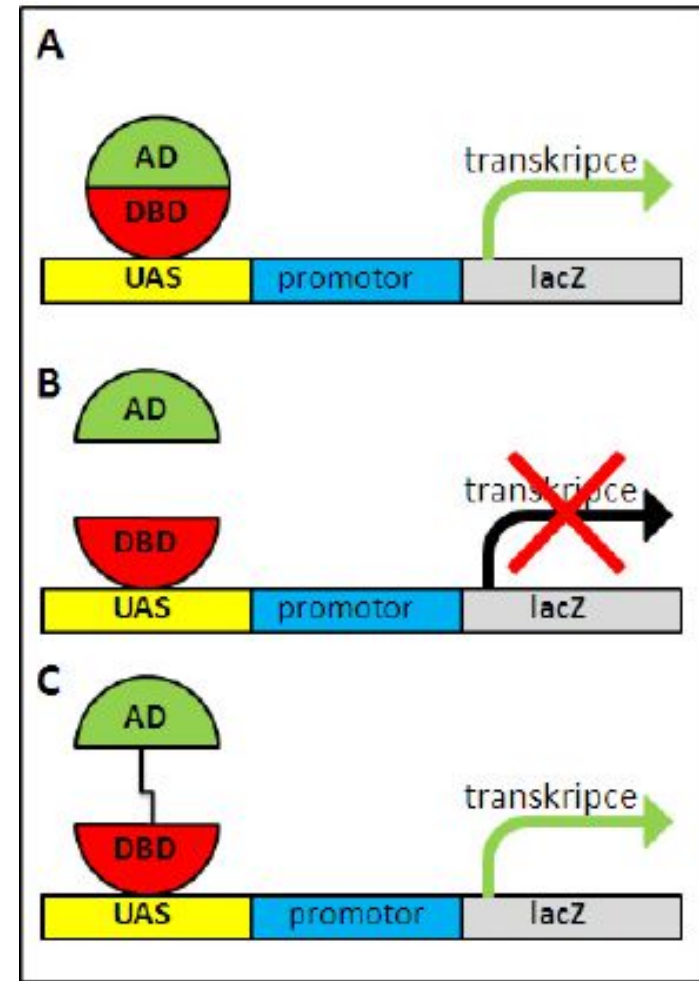
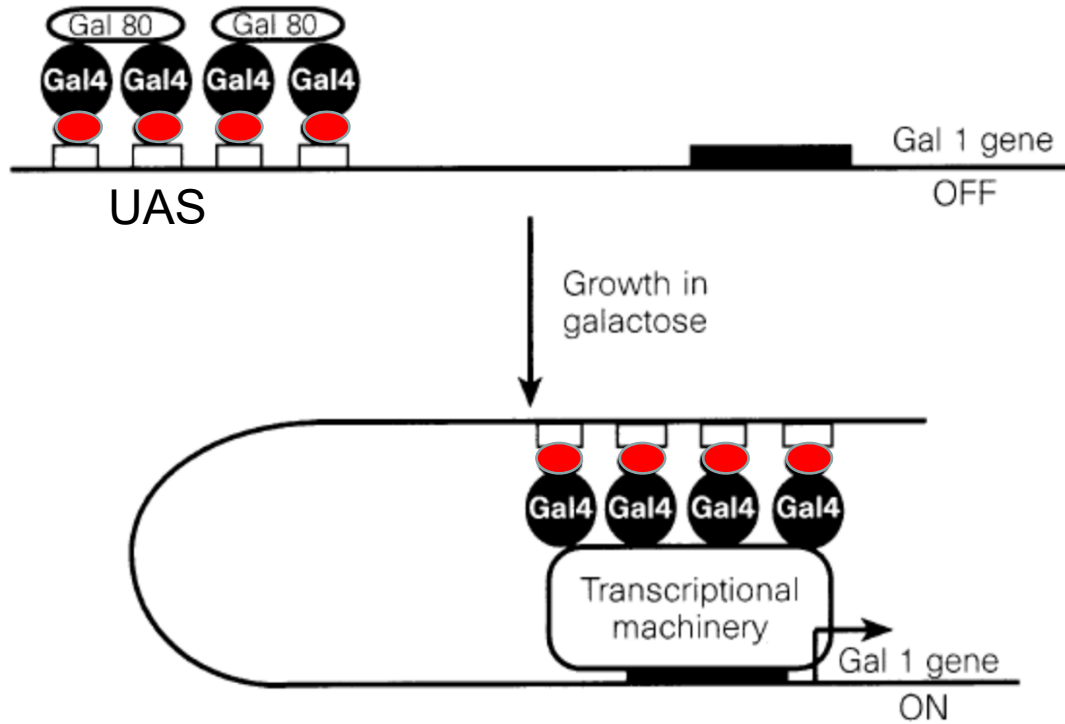


Hittinger et al., PNAS, 2004

- různé kvasinky využívají různé cukry (viz přednáška o určování kvasinek)
- *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. castellii*, *S. kluyveri*, a *K. lactis* využívají galaktosu – mají všechny GAL geny
- *S. kudriavzevii*, *C. glabrata*, *K. waltii*, a *E. gossypii* nemohou využívat galaktosu (GAL geny jim chybí – úplná ztráta – nebo je mají nefunkční = pseudogeny)

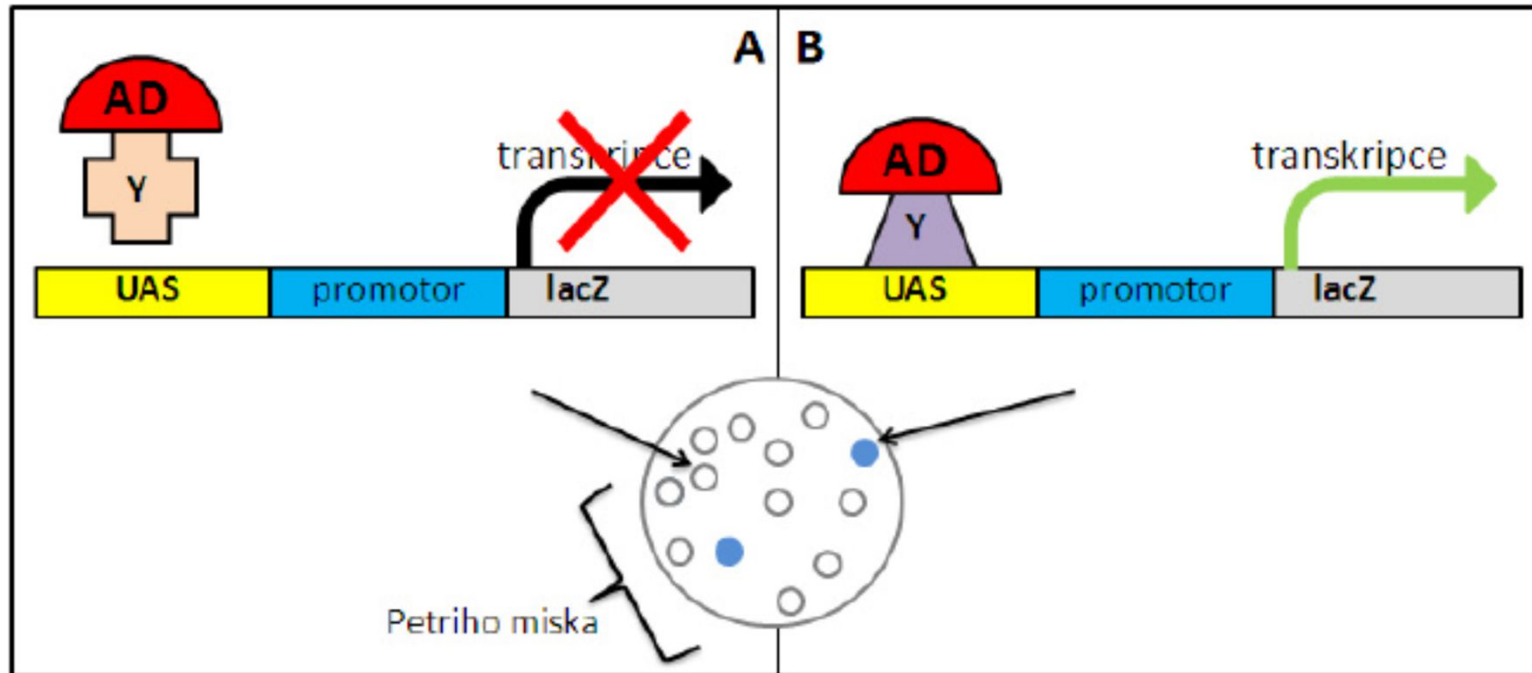
evoluce přístě

Transkripční aktivátor Gal4p



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

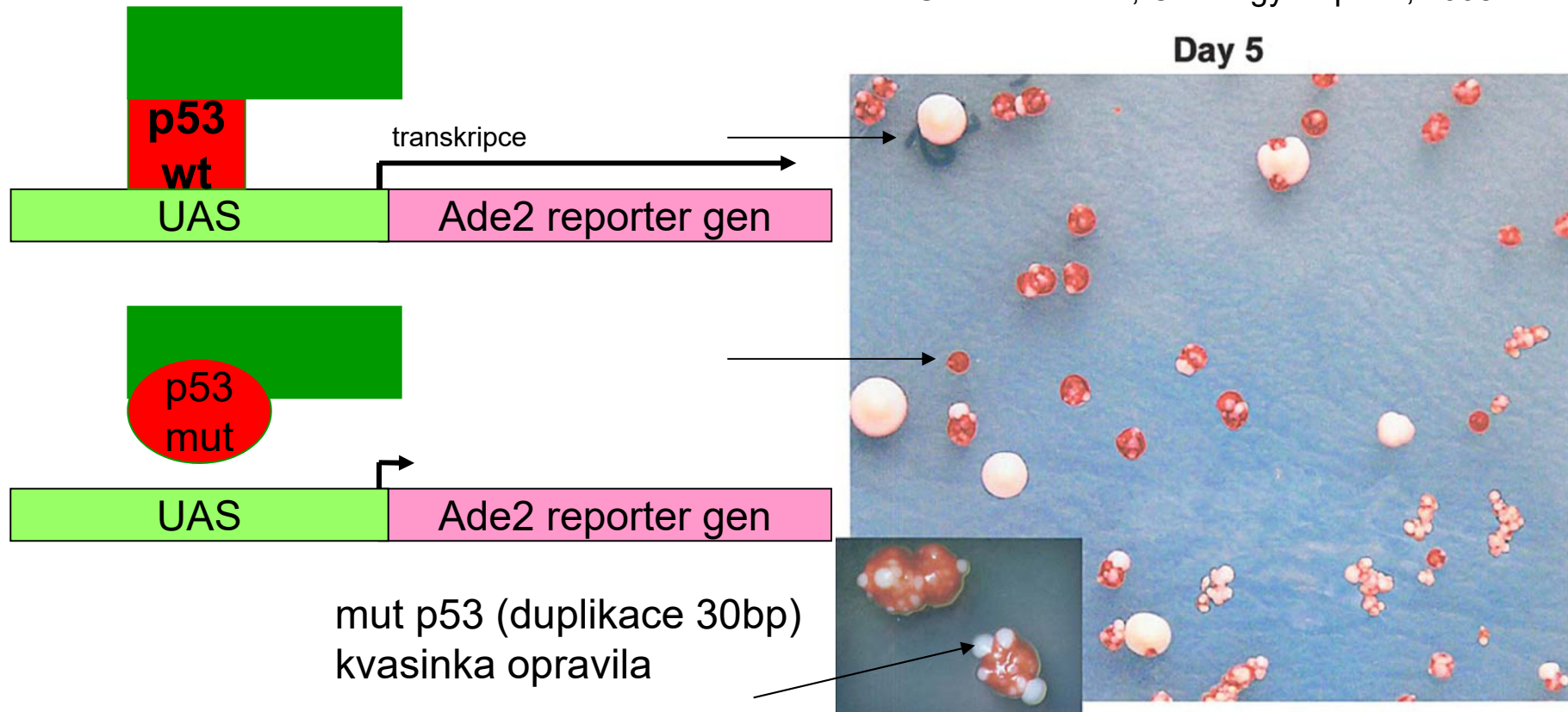
Vznik 1-hybridních systémů



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)

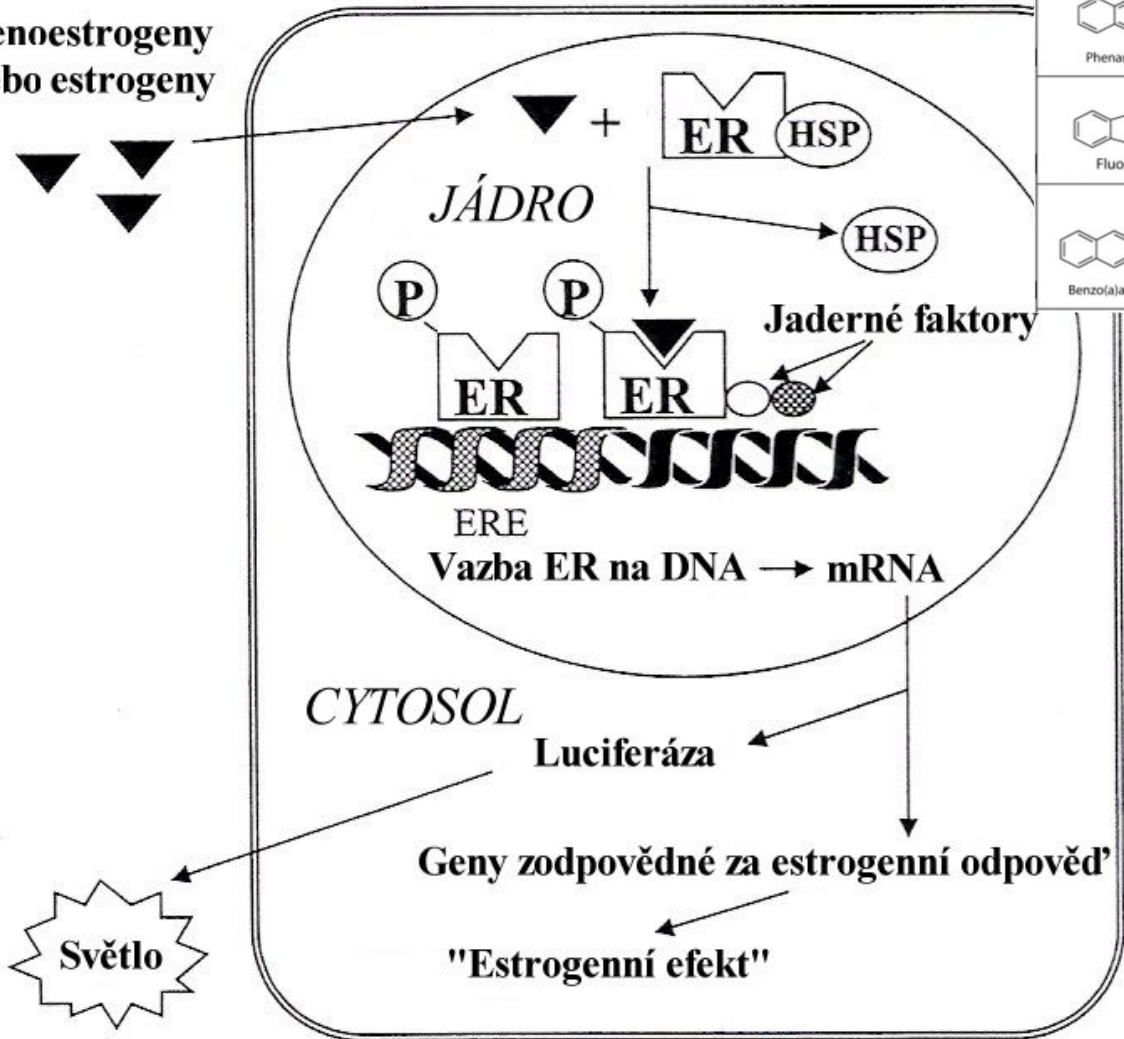


Analýza funkčních vlastností p53

- 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 estrogény



<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)cnc3ccccc23</chem> Acridine	<chem>c1ccc2c(c1)cnc3ccccc23</chem> Phenazine			
<chem>c1ccc2cc3ccccc3cc2c1</chem> Phenanthrene	<chem>c1ccc2c(c1)cnc3ccccc23</chem> Benzo(h)quinoline	<chem>c1ccc2c(c1)cnc3ccccc23</chem> Phenanthridine	<chem>c1ccc2c(c1)cnc3ccccc23</chem> 1,10-phenanthroline	<chem>c1ccc2c(c1)cnc3ccccc23</chem> 1,7-phenanthroline	<chem>c1ccc2c(c1)cnc3ccccc23</chem> 4,7-phenanthroline
<chem>c1ccc2c(c1)ccc3ccccc23</chem> Fluorene	<chem>c1ccc2c(c1)cnc3ccccc23</chem> Carbazole				
<chem>c1ccc2cc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Benzo(a)anthracene	<chem>c1ccc2c(c1)cnc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Benzo(a)acridine	<chem>c1ccc2c(c1)cnc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Benzo(c)acridine			

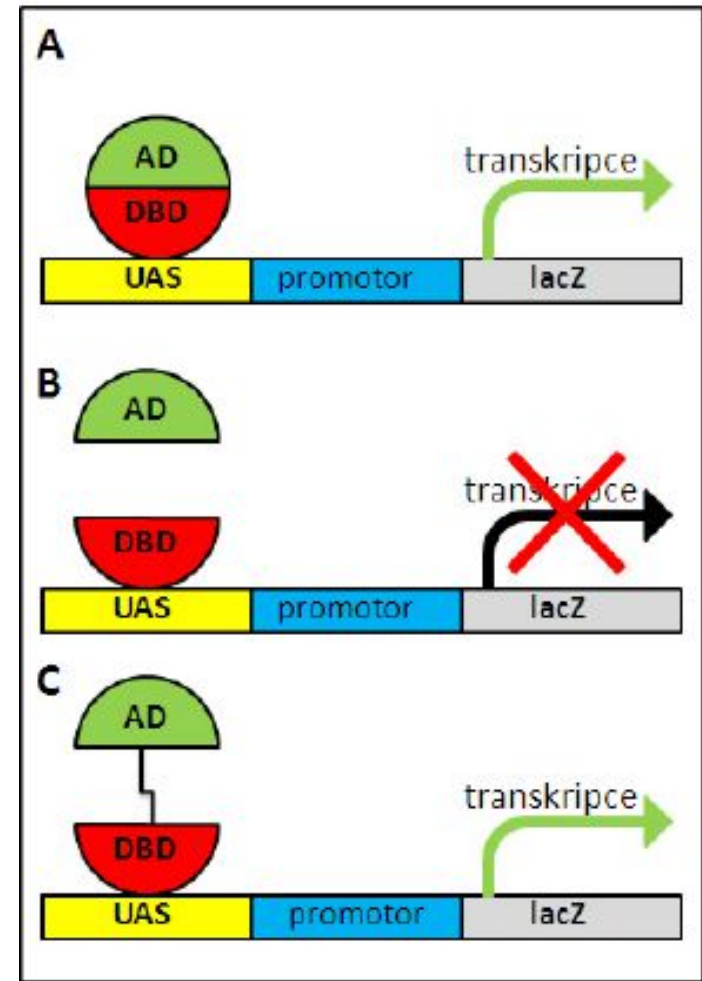
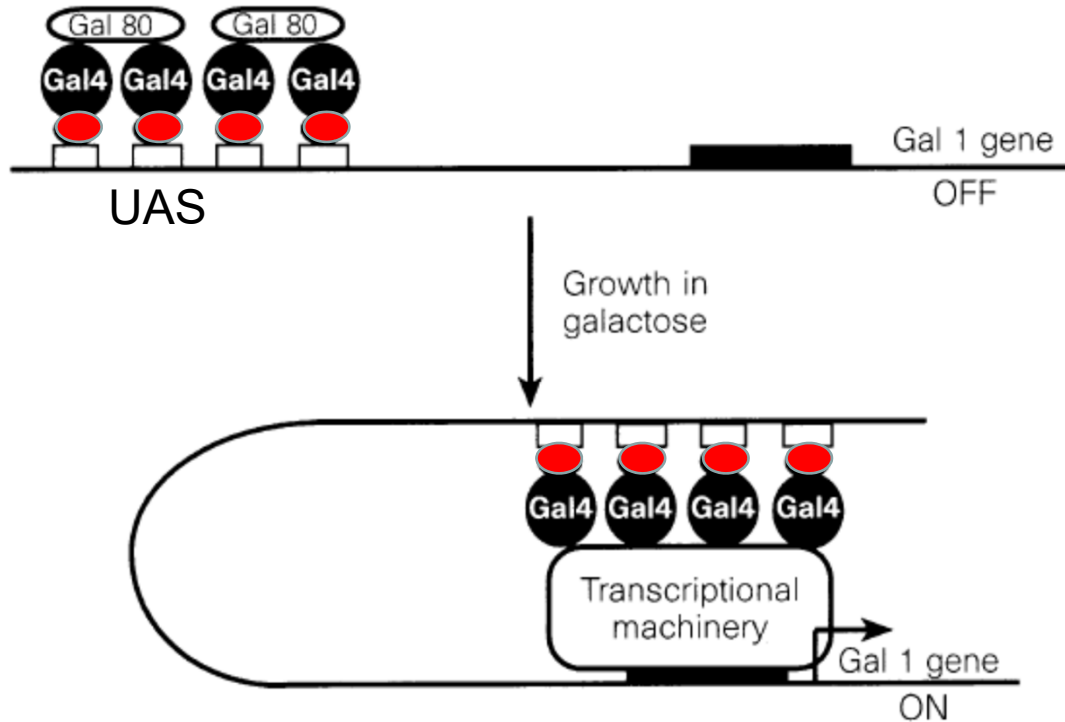
V tomto systému byly testovány různé polutanty – efekt na „estrogenní“ dráhu

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

Bartos et al, Env Tox, 2006

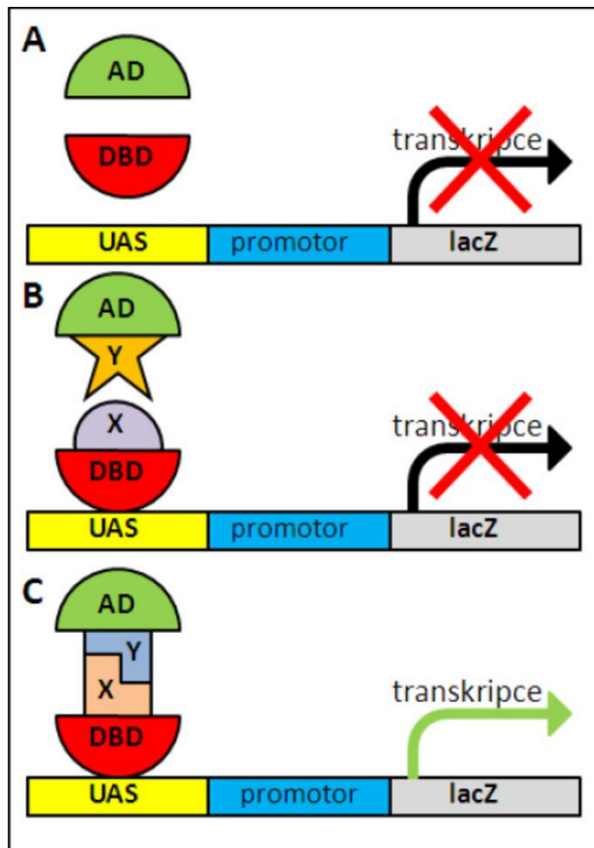


Transkripční aktivátor Gal4p



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 λ repressor cI

Binds cI operator sequences (580)

Tet repressor

Binds Tet operator sequences (716)

Klasický Y2H systém

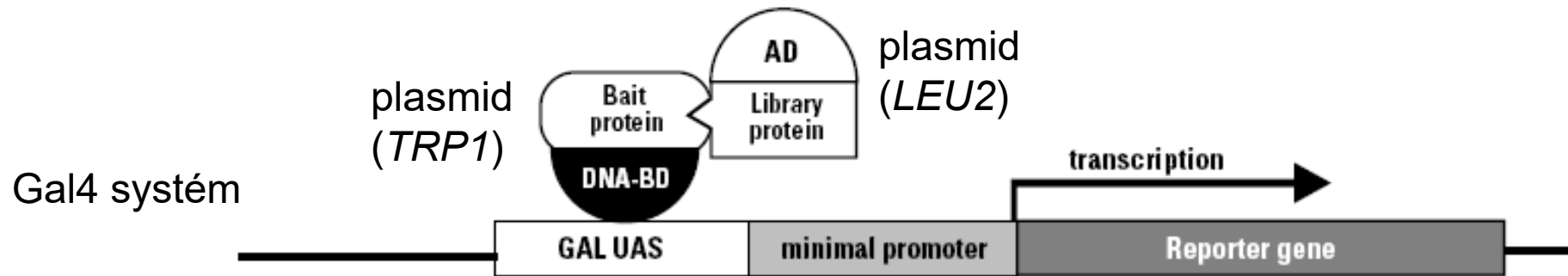


Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

AH109

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

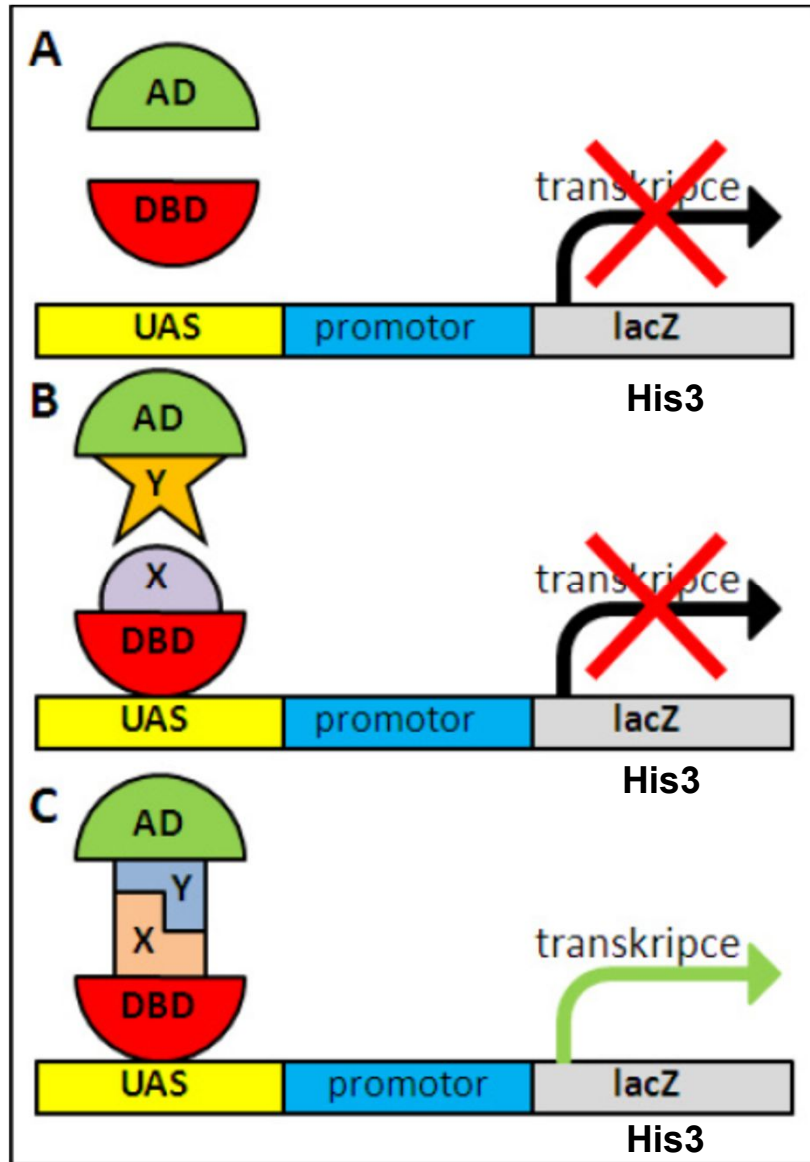
Nejčastěji používaný kmen PJ69-4a

AH109 Constructs

různé promotory

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

2-hybridní systém



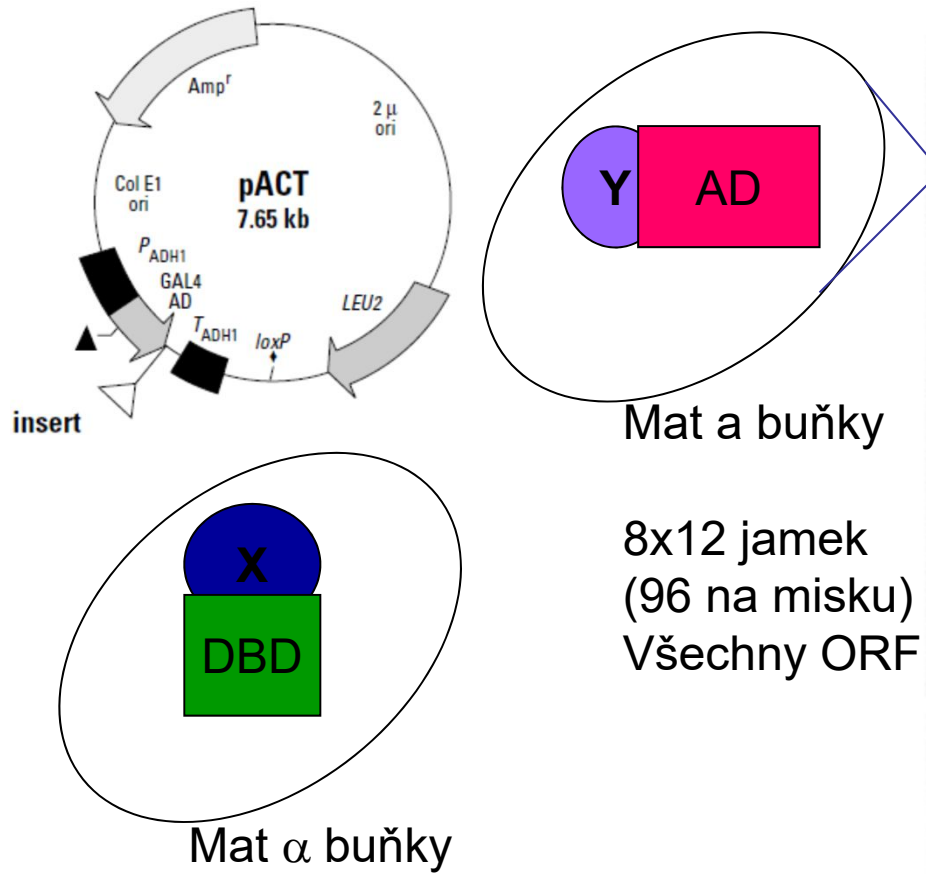
60 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
30 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
20 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
15 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
10 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
5 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
Kontrola (- Leu, Trp)			
	BD-Nse3 + V1AD	BD-Nse3 + AD-Nse1 (1-116)	VBD + AD-Nse1 (1- 116)

Reportérové geny

Reporter genes

<i>E. coli lacZ*</i>	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)

Kvasinkový „INTERACTOME“

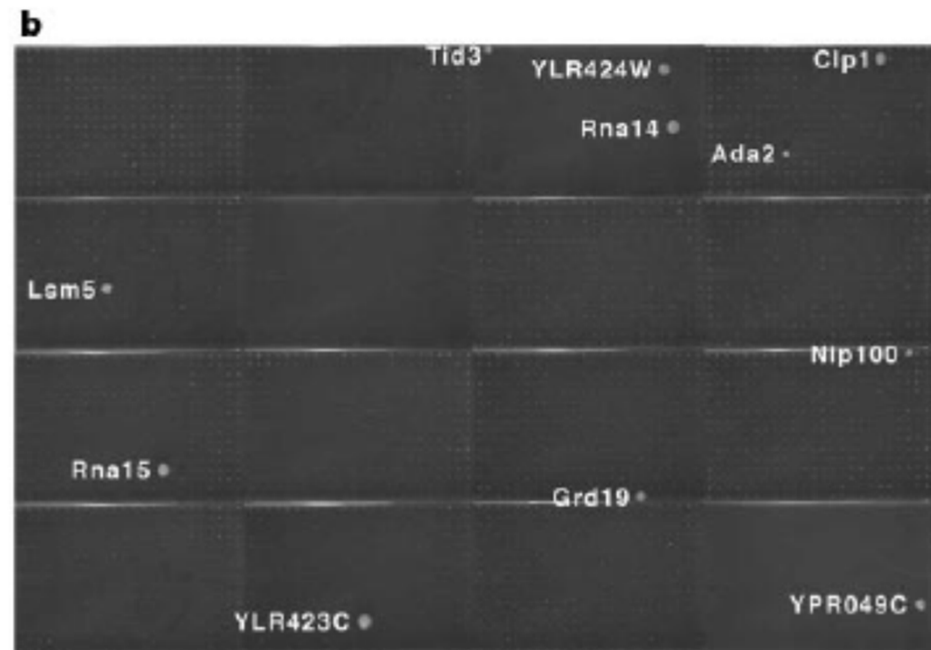
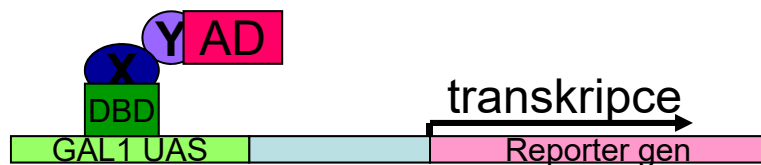


Mat a buňky

8x12 jamek
(96 na misku)
Všechny ORF

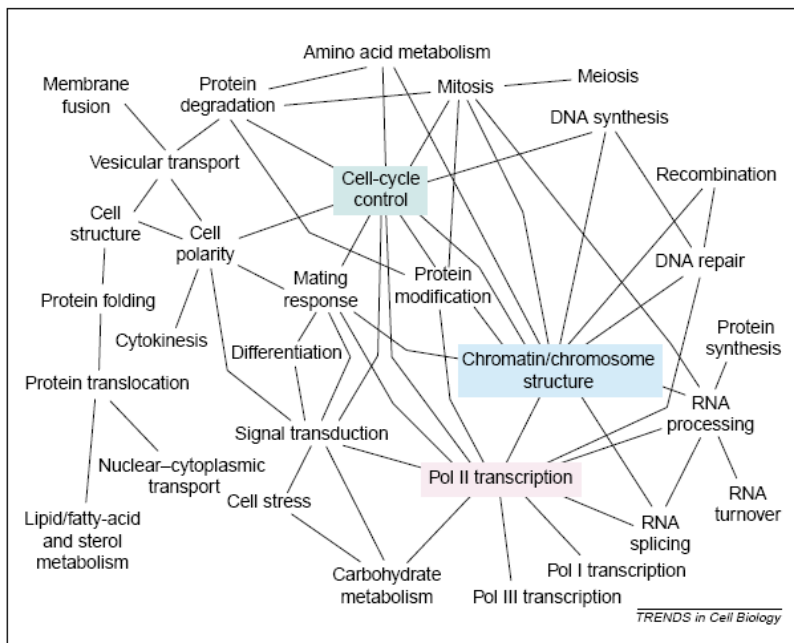
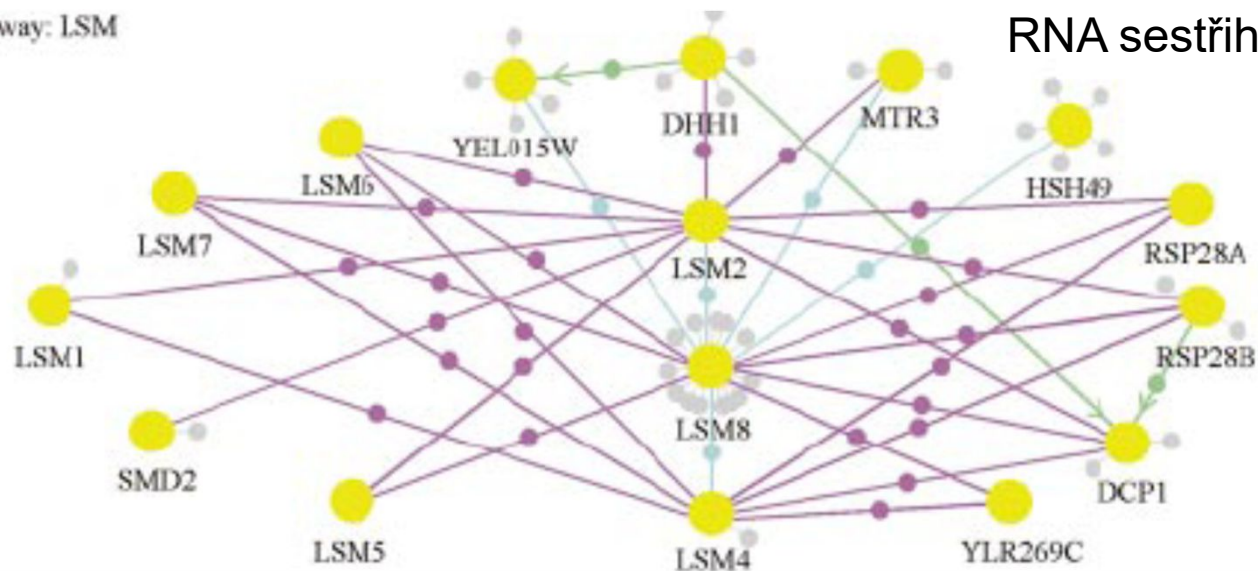
Mat α buňky

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



Protein „networks“

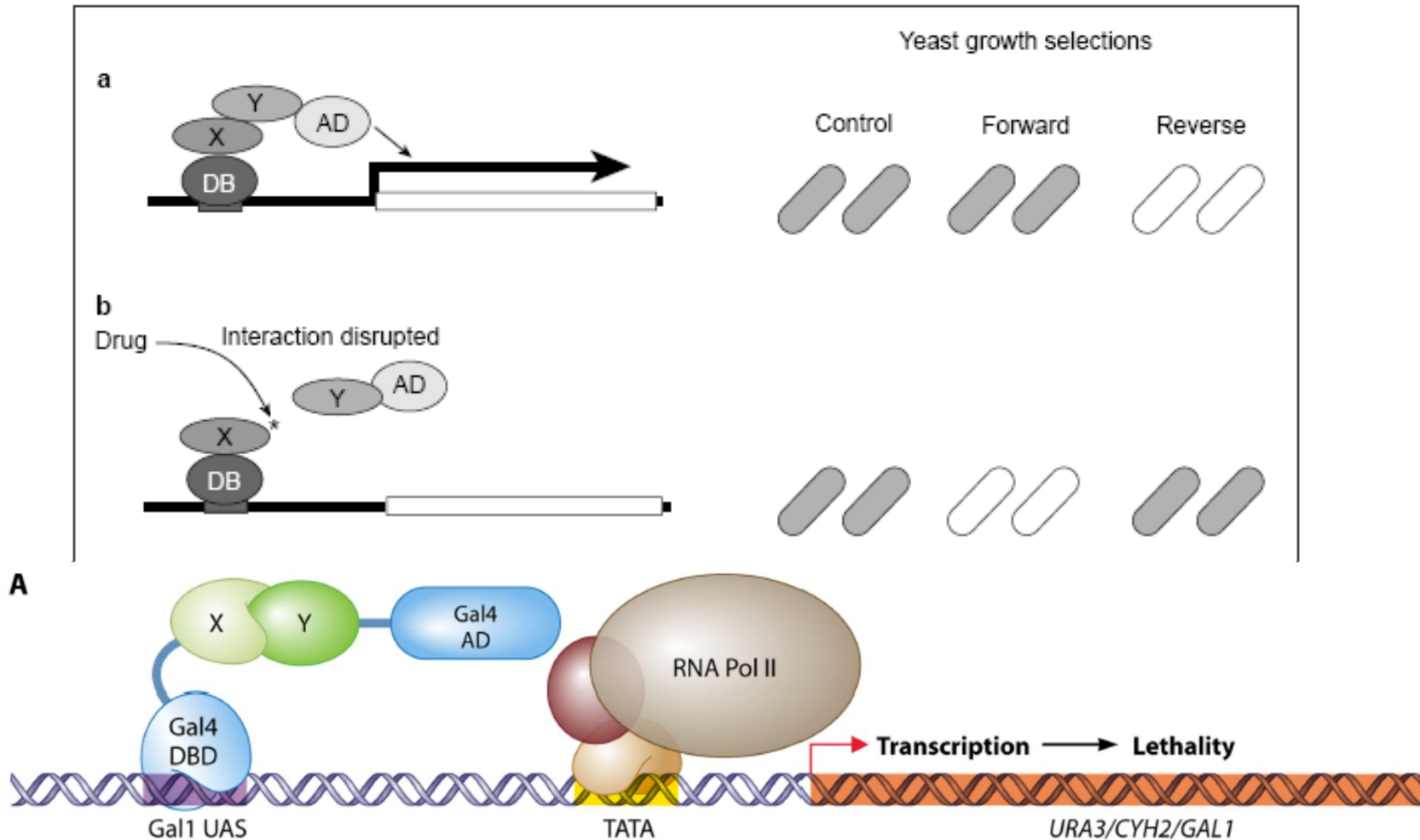
Pathway: LSM



- „high-throughput“ screen - interaktom *S. cerevisiae* >30 000 interakcí (~6000 proteinů)
- pomocí Y2H podobný „high-throughput“ screen pro lidské a jiné proteiny ...

Network/síť naznačuje funkční vztahy
Tucker et al, TiCB, 2001

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

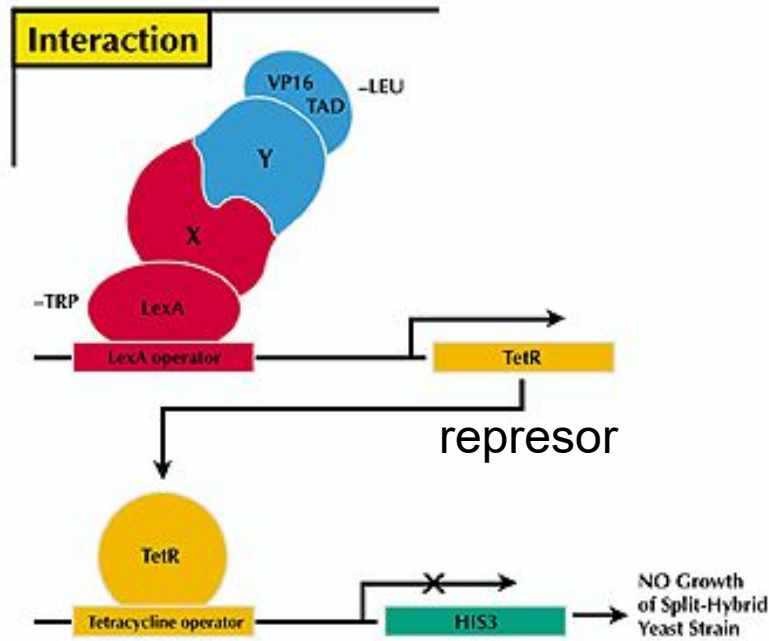


Fig. 1
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells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

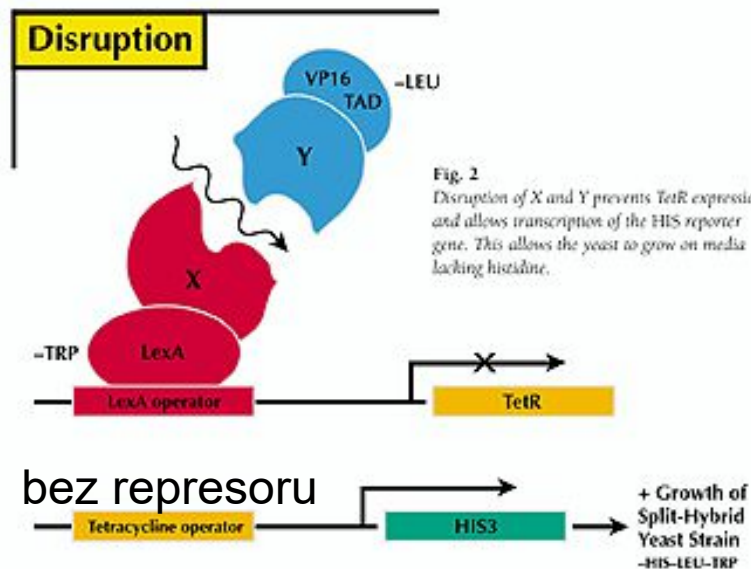
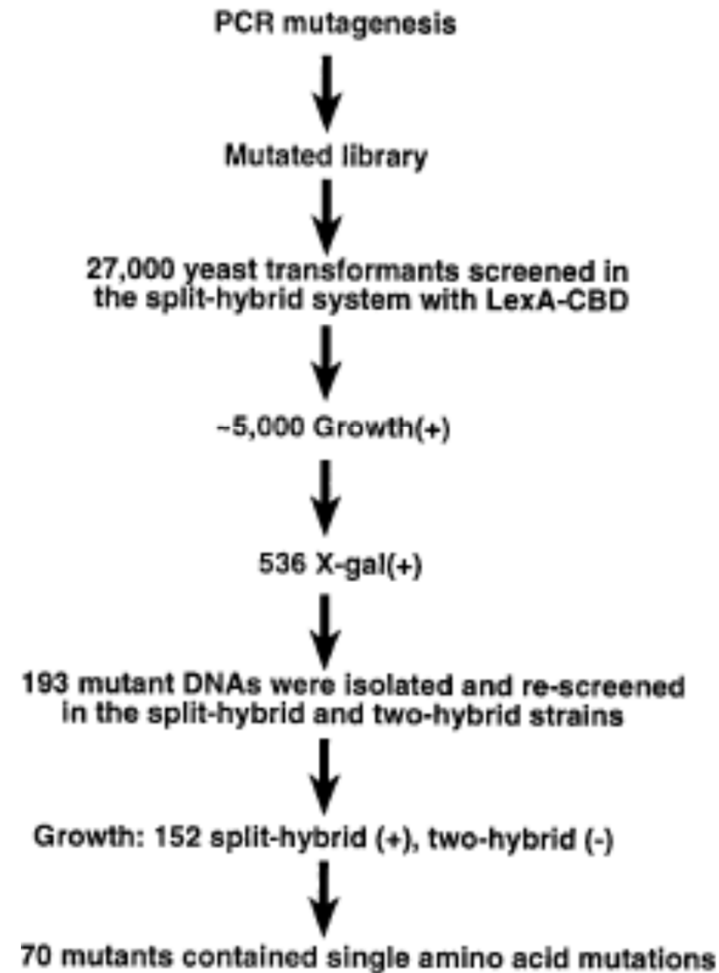
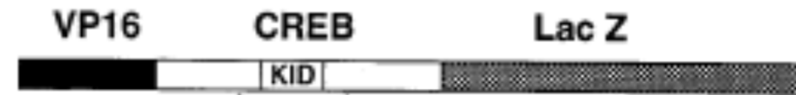
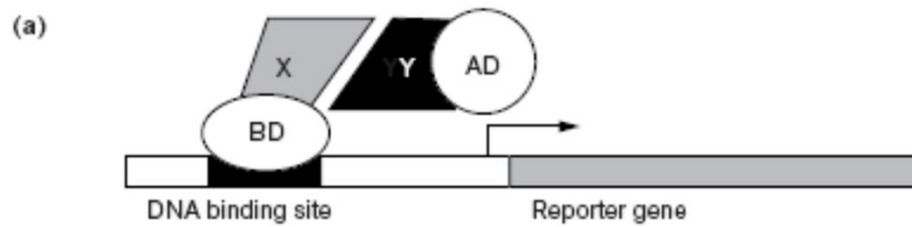
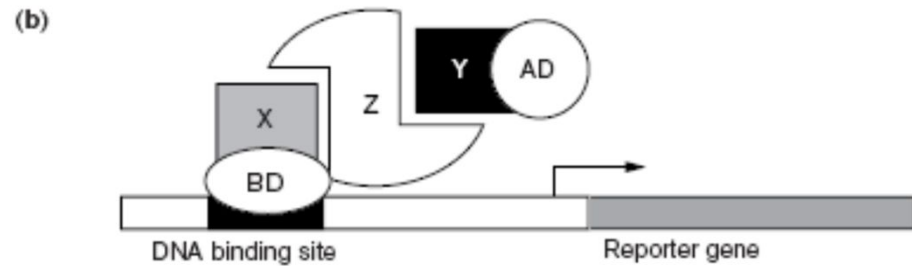


Fig. 2
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.

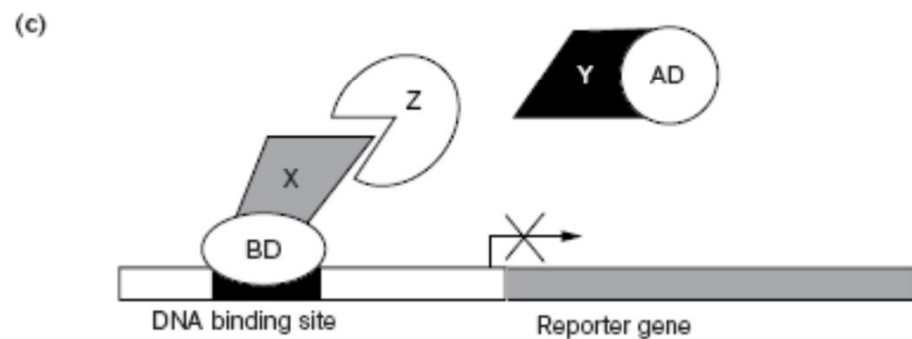




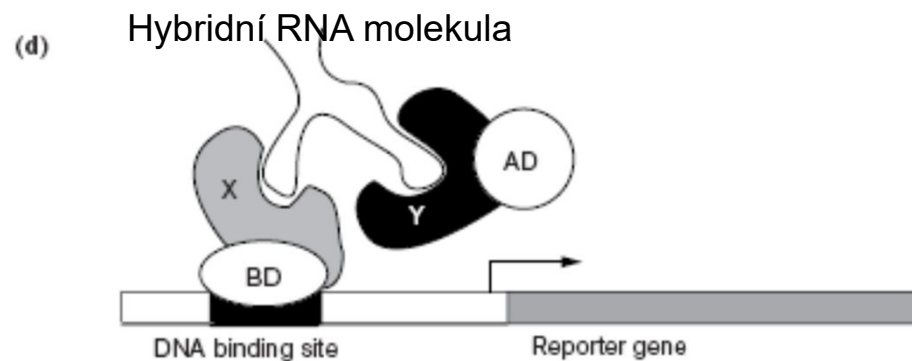
Klasický dvoj-hybridní systém



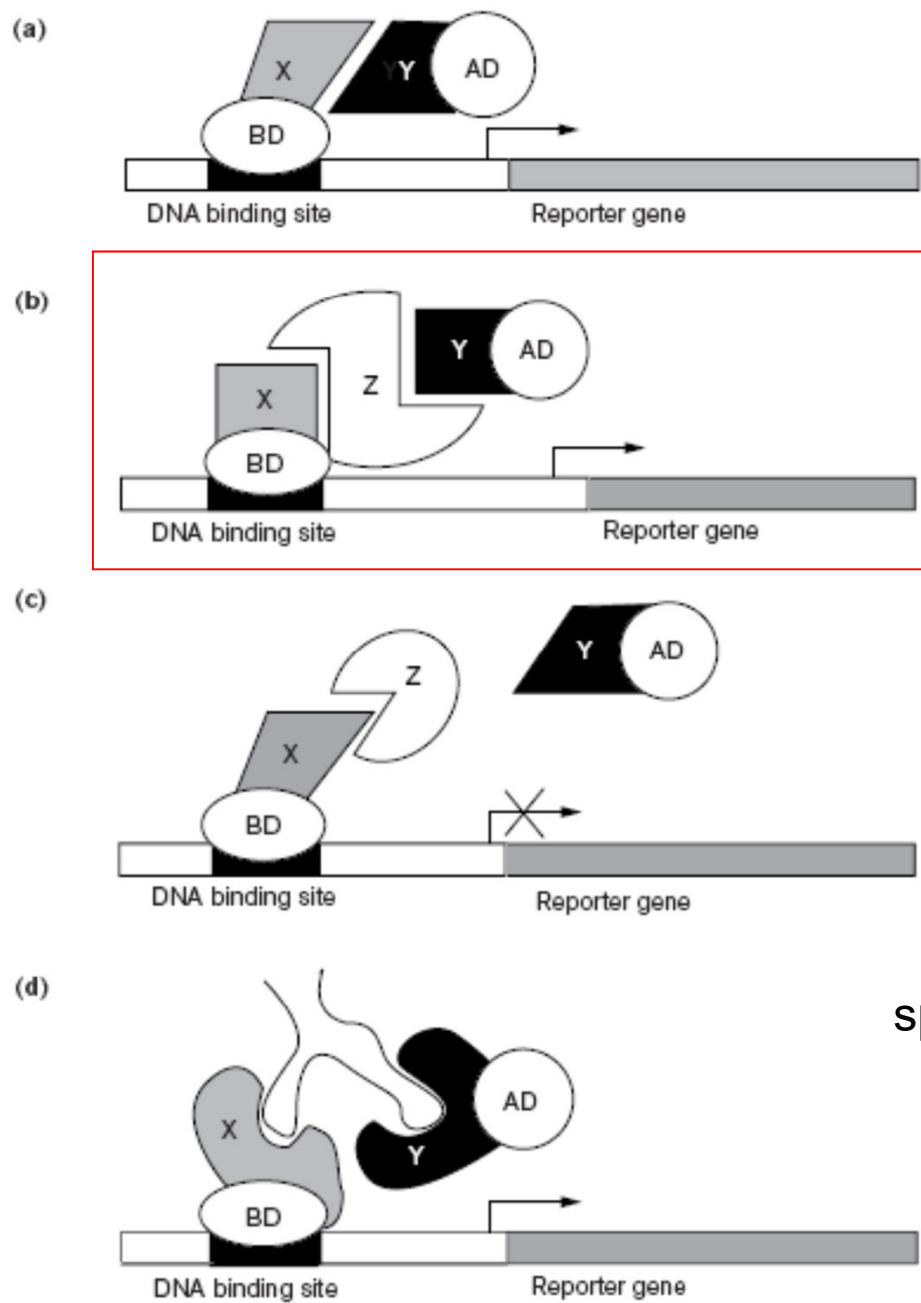
Troj-komponentní (dvoj-H) systém
– heterotrimerní proteinové komplexy
- posttranslační modifikace



Dvoj-hybridní systém
- proteinový inhibitor interakce



Troj-hybridní systém
– RNA interakce
- ligand/receptor

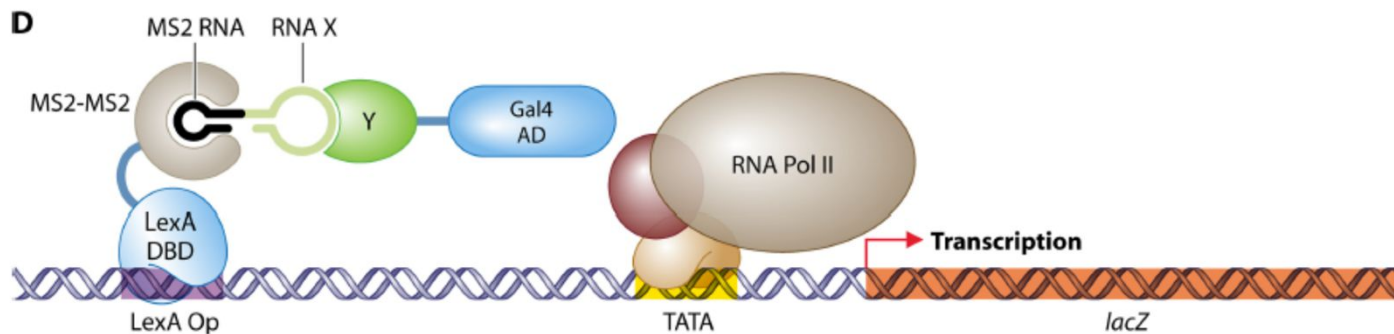


150 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
90 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
30 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
20 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
15 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
10 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					
5 mM 3 - AT (-Leu, -Trp, -Ura, -His)					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

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

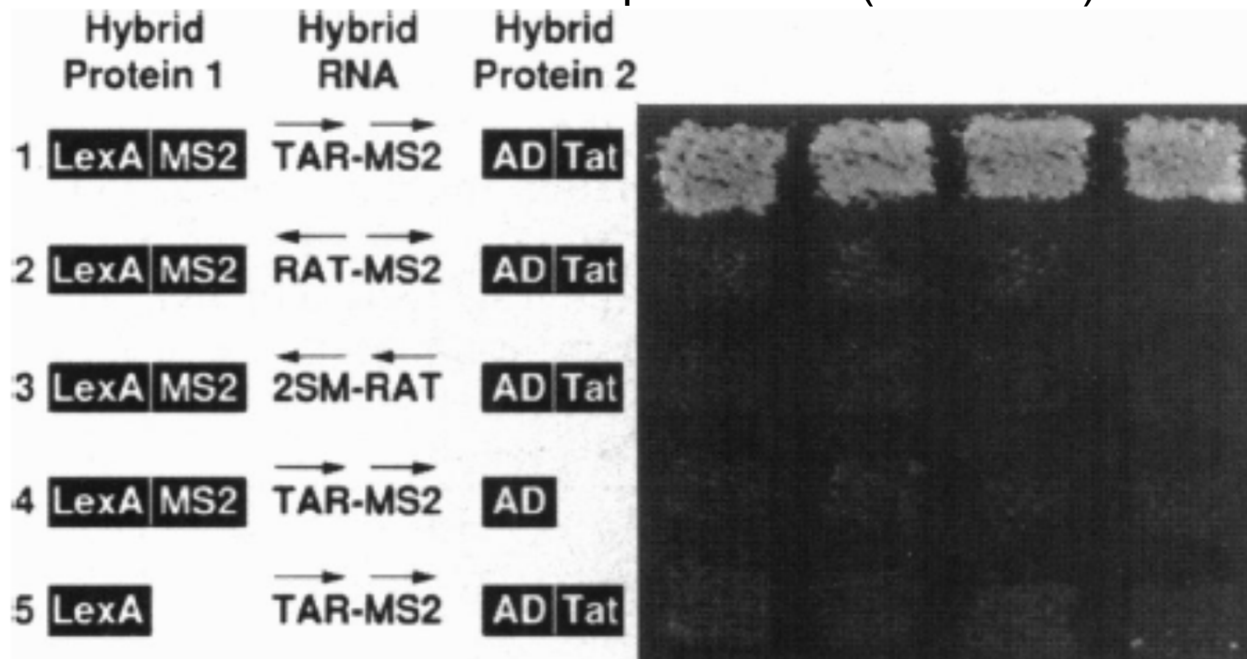
BD-Nse1+V2AD+VP	VBD+AD-Nse4+VP	BD-Nse1+AD-Nse4 AD+VP	BD-Nse1+AD- Nse4+pPM-Nse3
-----------------	----------------	--------------------------	------------------------------

Analýza vazby protein-RNA (Y3H)

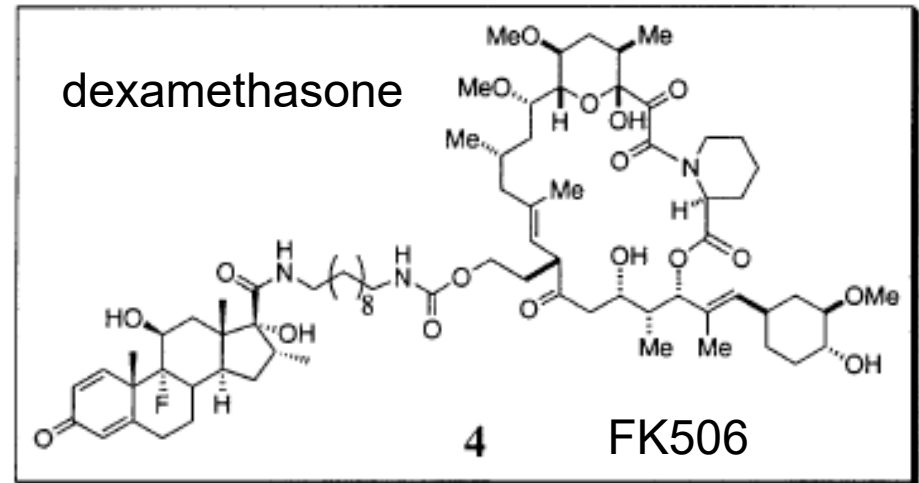
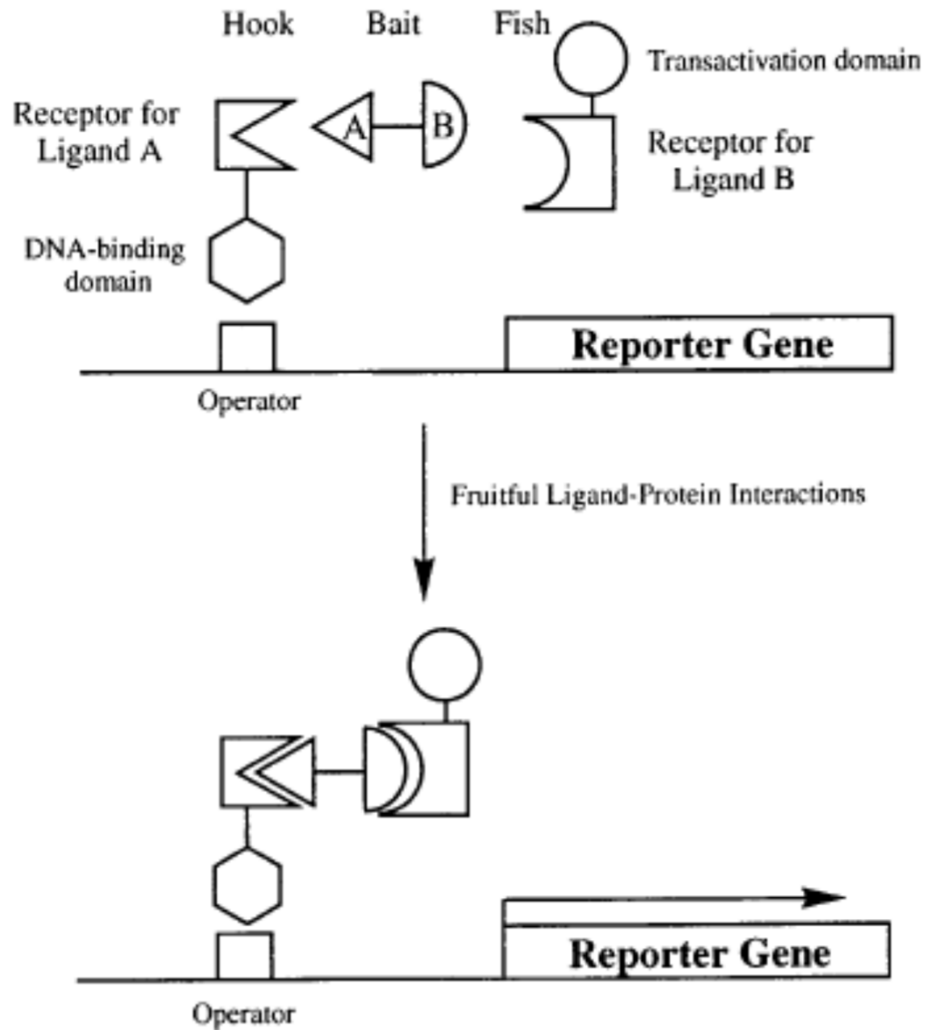


Tři hybridní/fúzní konstrukty:

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)



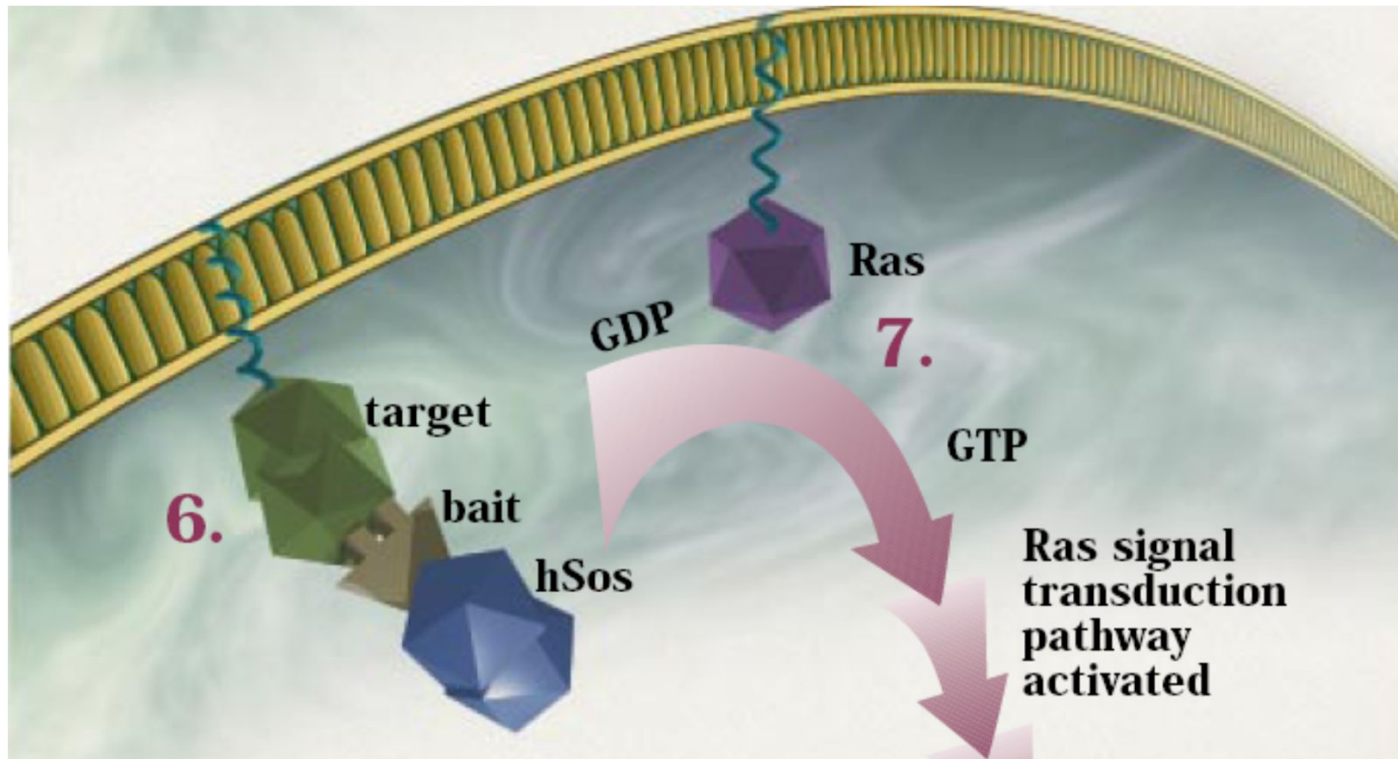
Tři hybridní/fúzní konstrukty:

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

CytoTrap 2-hybridní systém

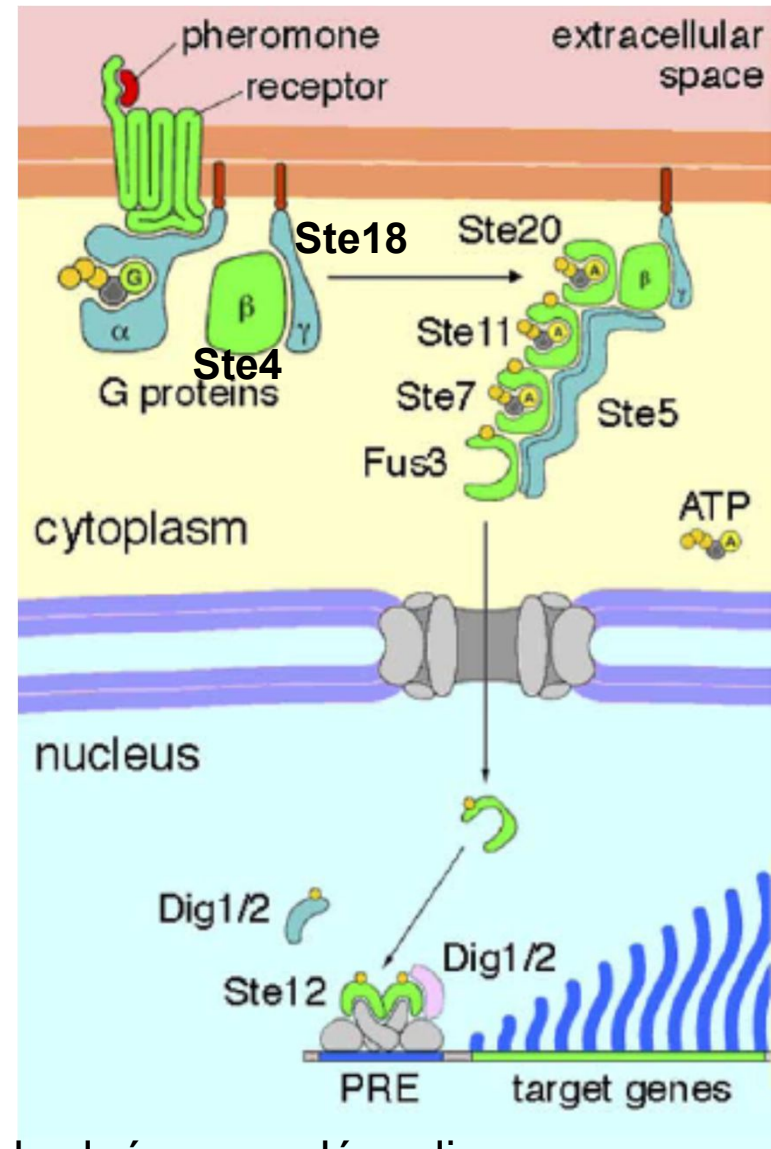
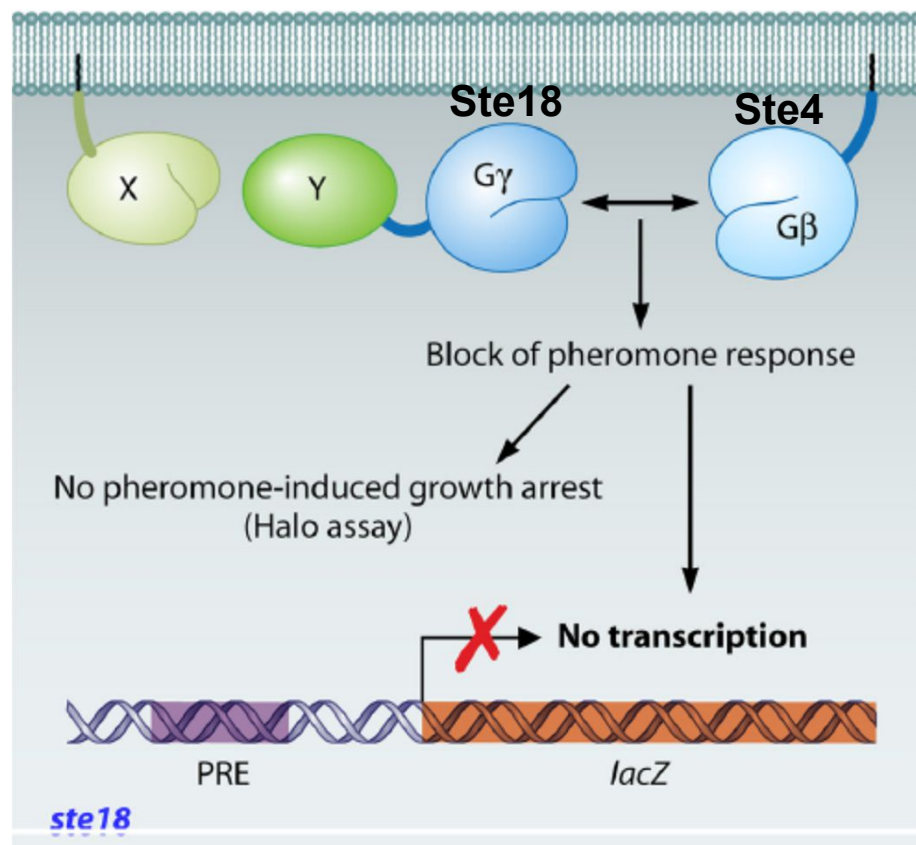
Kvasinkový *cdc25-2* ts mutant – lidský hSOS (guanine exchange factor) aktivuje RAS pokud je ukotven na membránu v jeho blízkosti

- 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 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

Přehled kvasinkových PPI biotechnologií

