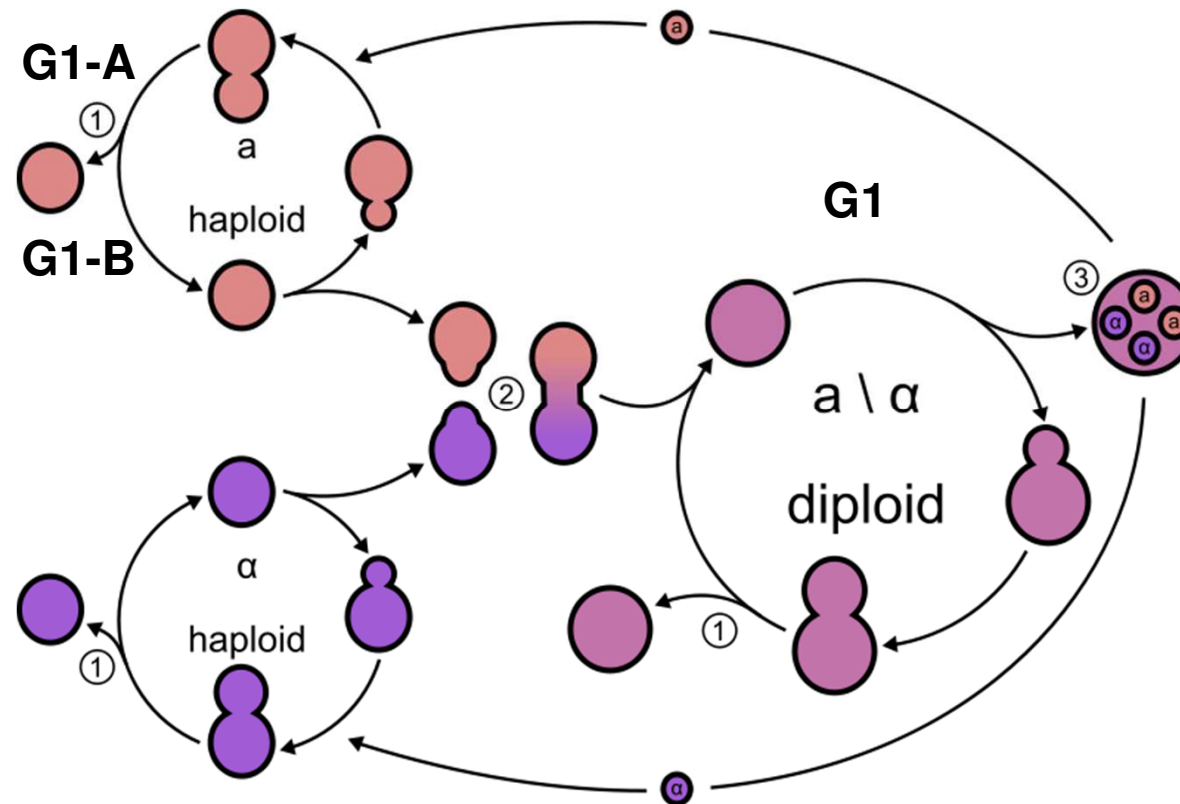


Osnova

- Regulace transkripce
 - Přepínání párovacího typu
 - Regulace transkripce specifických genů
 - Gal4 transkripční faktor
- Hybridní systémy
 - transkripční hybridní systémy
 - alternativní kvasinkové hybridní systémy

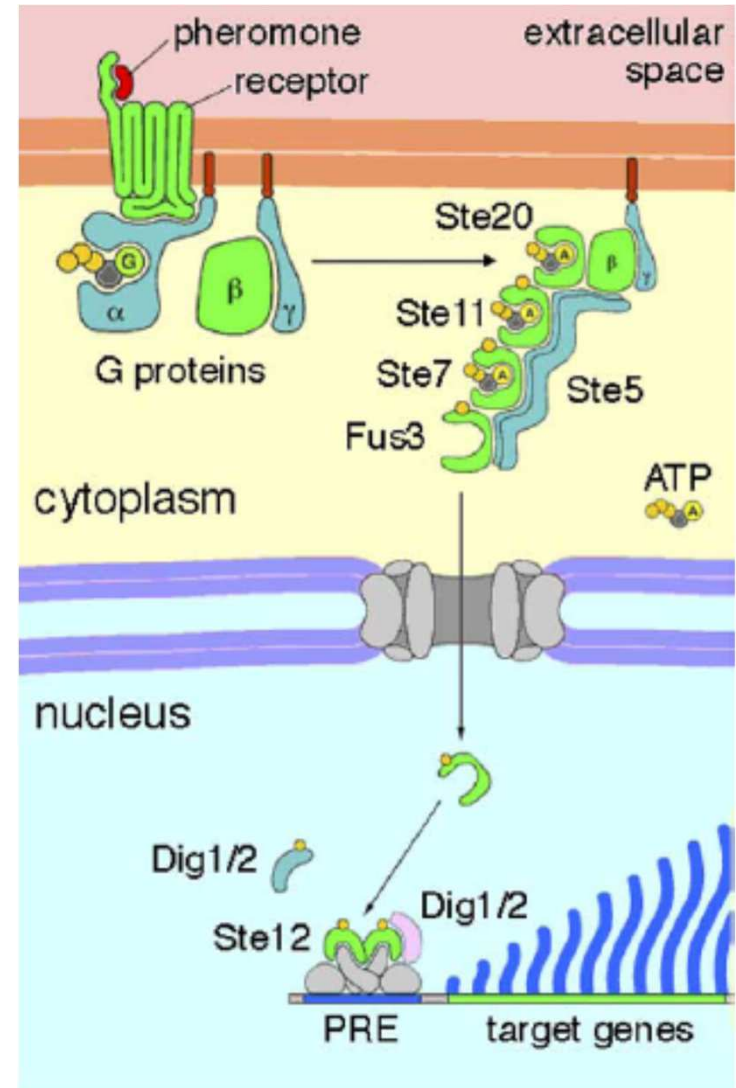
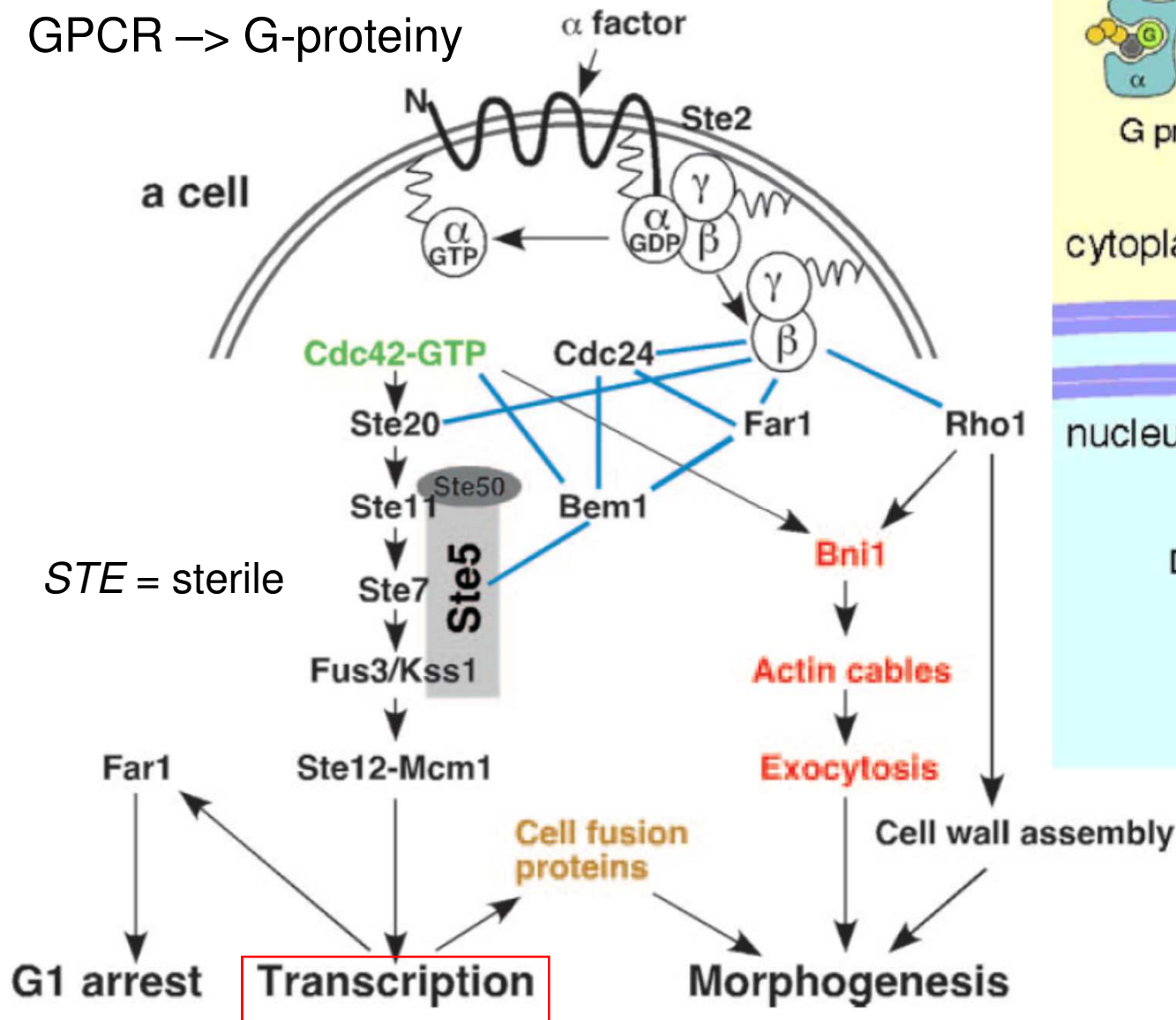
Párování/mating kvasinkových buněk



- haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
- párování doprovázeno zásadními změnami v morfologii (dynamické)
- haploidní vs diploidní buňky (stav buněk)

Signální dráha – α faktor

GPCR \rightarrow G-proteiny



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

Specifita párovacího typu je kódována MAT lokusem

Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

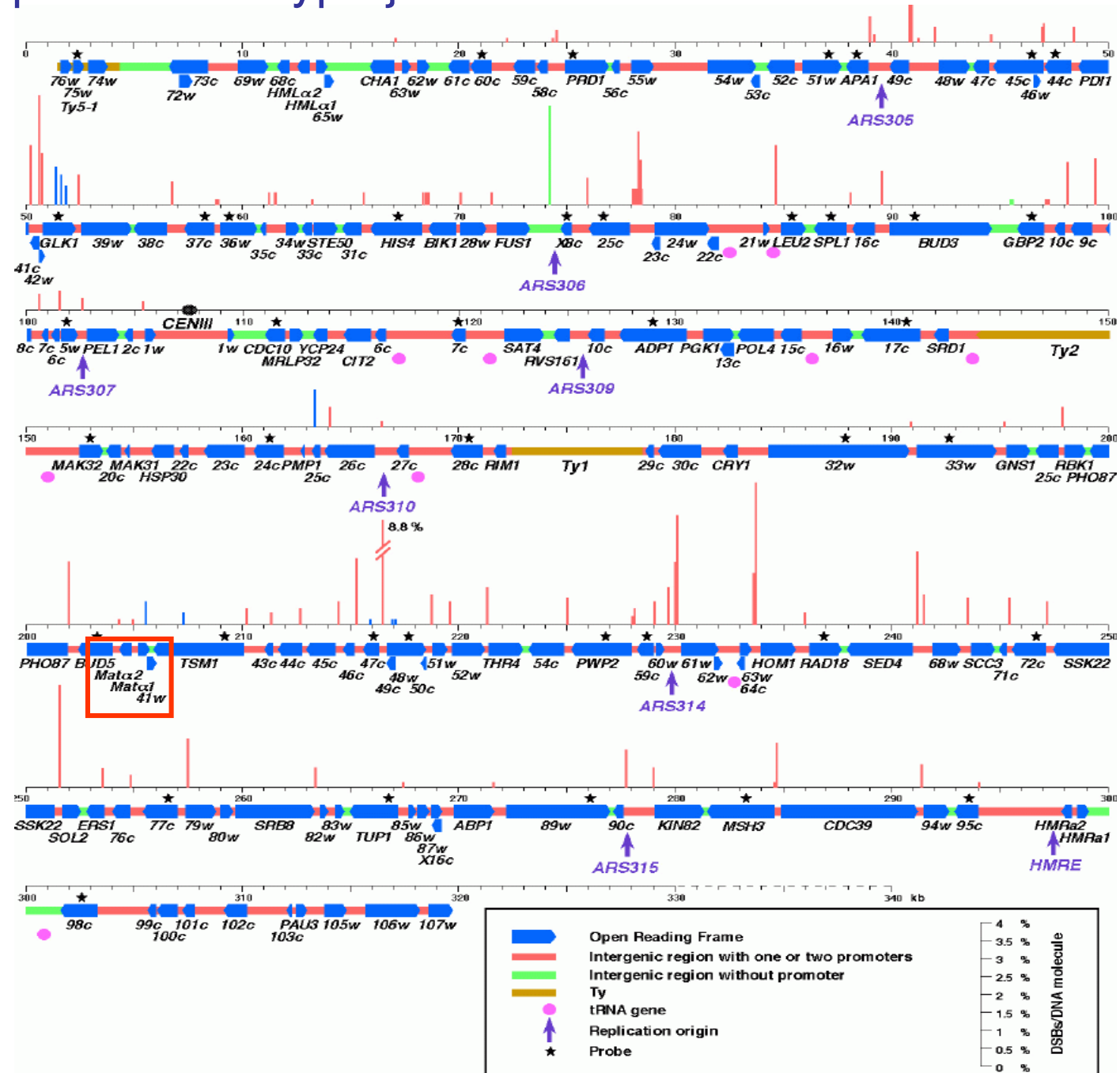
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

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

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.= *MF α 1,2* (α -feromon), *STE3* (a-receptor), *STE13*, *KEX2* (proteasy)

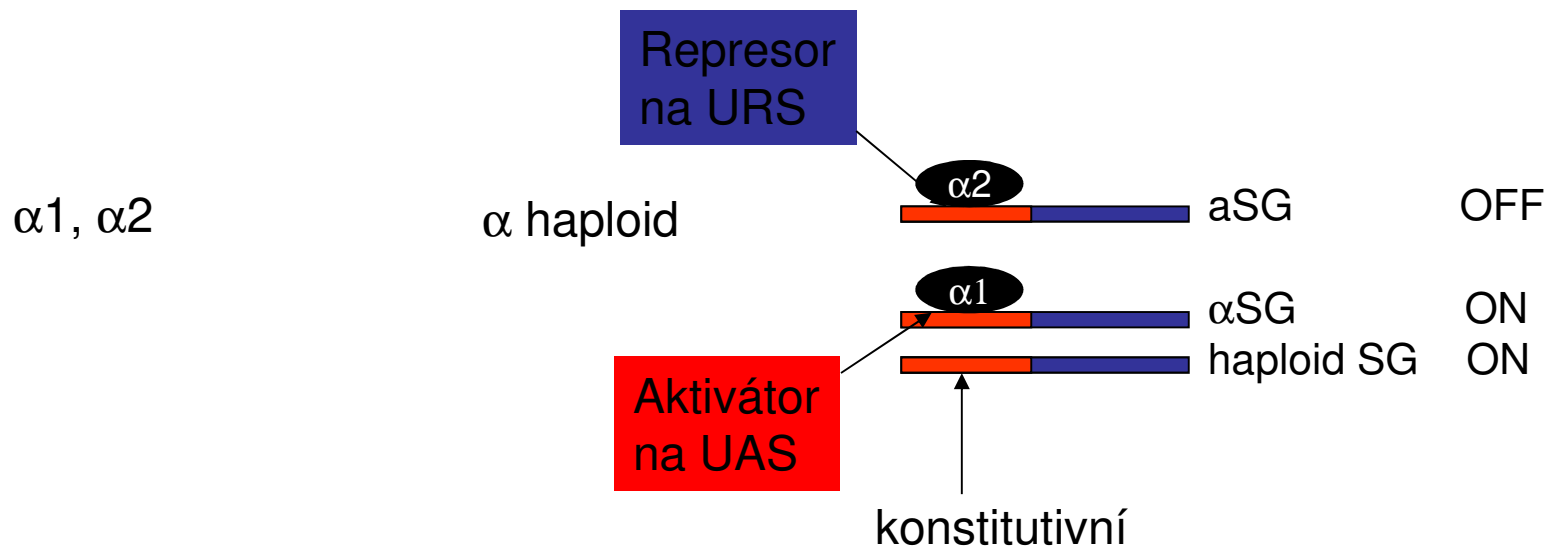
haploid spec.= *STE4,18* (podjednotky G-proteinu), *RME1* (inhibitor meiosy), *HO*, *NEJ1*, *LIF1*

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

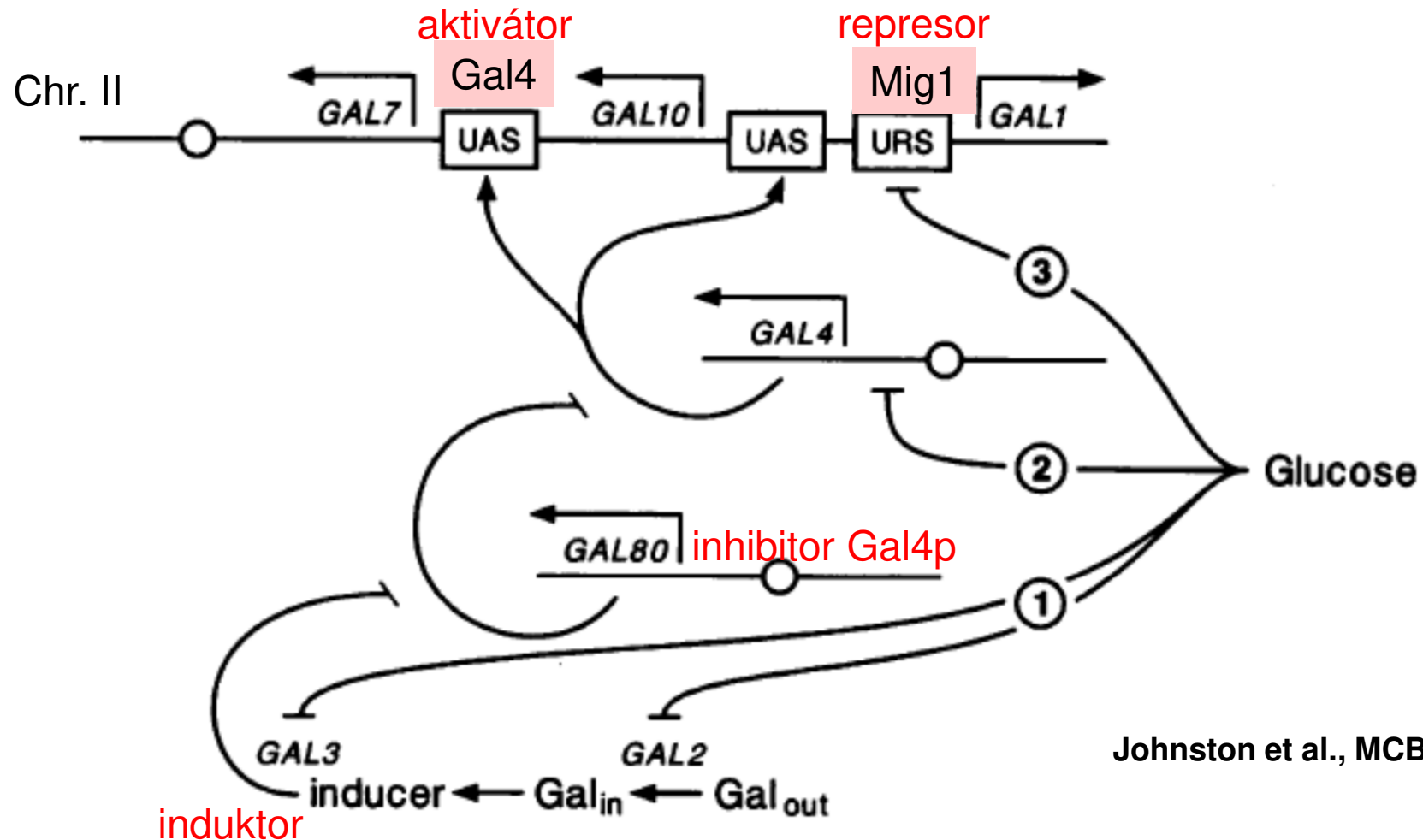
Struktura promotorů

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 motivy (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)



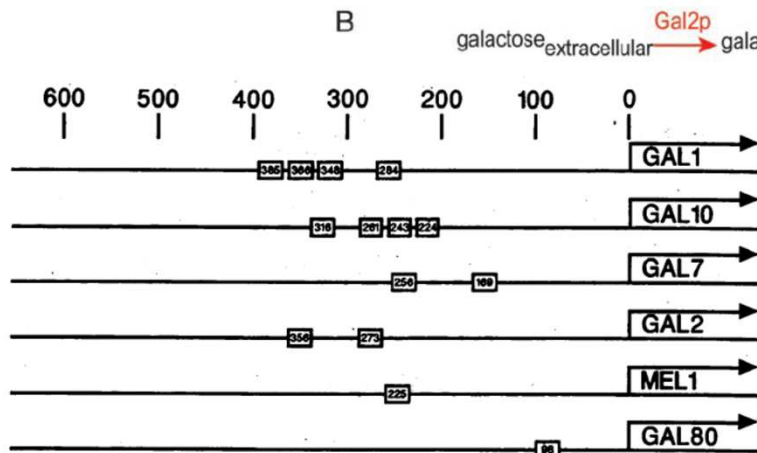
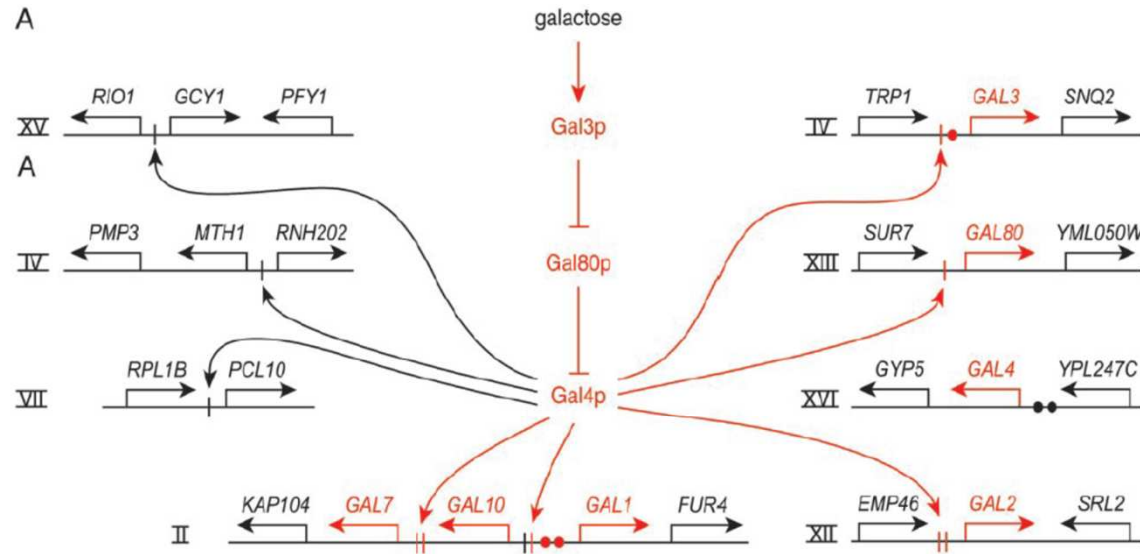
Regulace transkripce *GAL* genů



Johnston et al., MCB, 1994

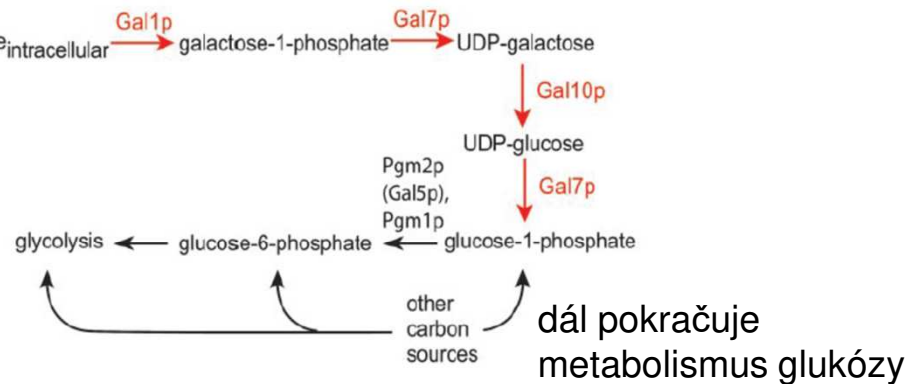
- glukosa reguluje transkripci *GAL* genů na různých úrovních:
 - blokuje Gal3 (induktor) a Gal2 (permeasu), *GAL4*
 - reprimuje transaktivaci Gal4 transkripčním aktivátorem a ovlivňuje Mig1 represor (URS) v promotoru *GAL1* genu
 - Gal80 blokuje Gal4 aktivační doménu (galaktosa zablokuje pouze Gal80)

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



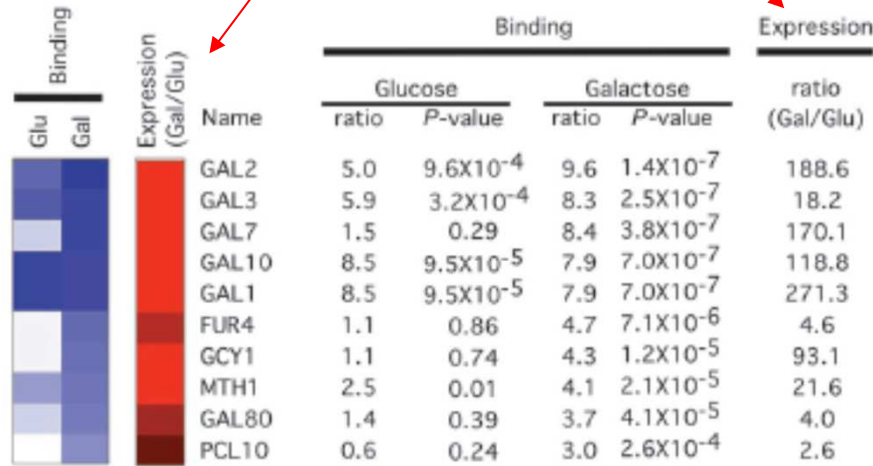
GAL4 gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS *GAL1*, *GAL7*, *GAL10* ...

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

ChIP Gal4p

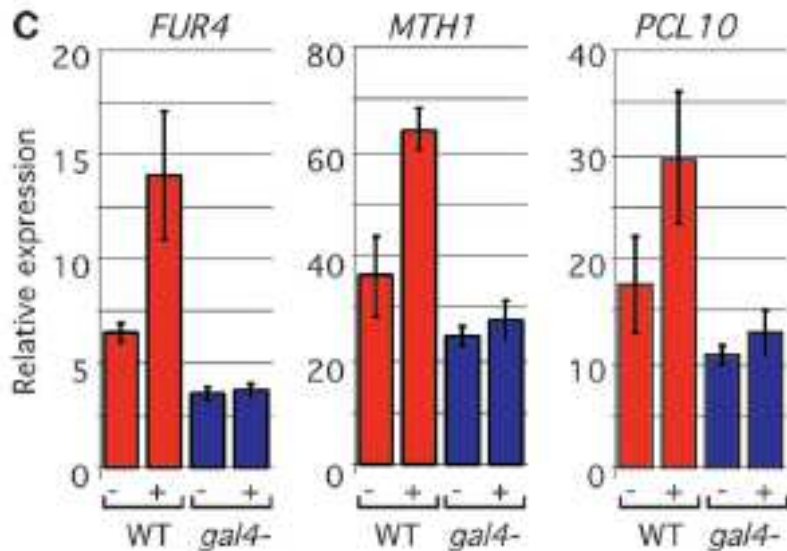
microarray po galaktose

A

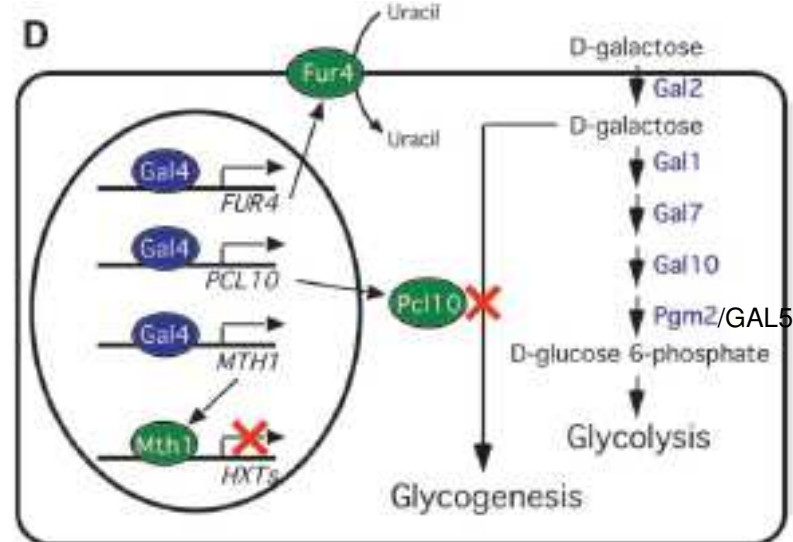


FUR4 zvyšuje množství uracilu pro UDP-Gal
 MTH1 potlačuje transport glukosy (zlepšuje příjem gal)
 PCL10 potlačuje glycogenezi (maximalizuje zisk z gal)

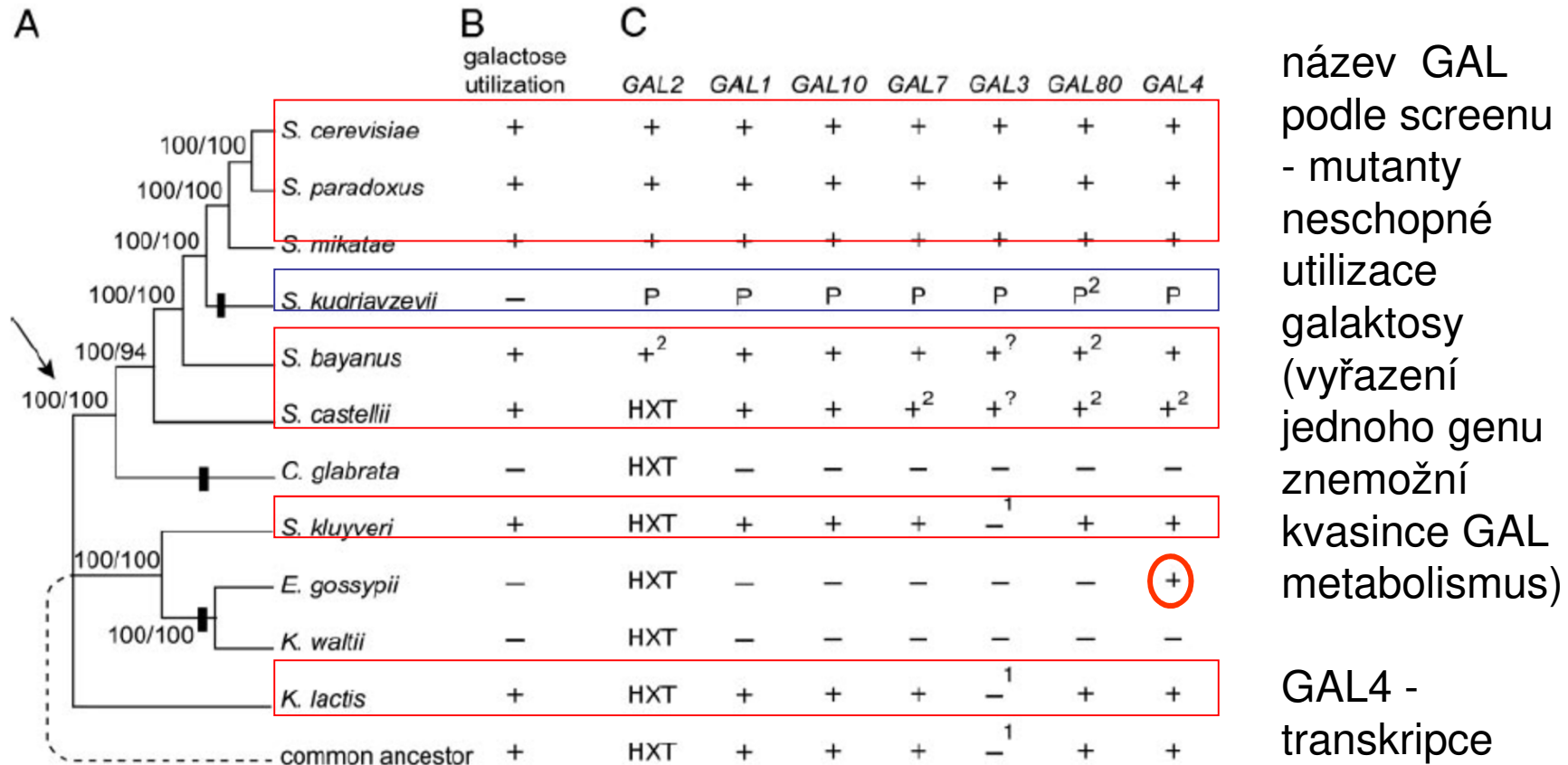
C



D



Rozdíly v utilizaci galaktózy

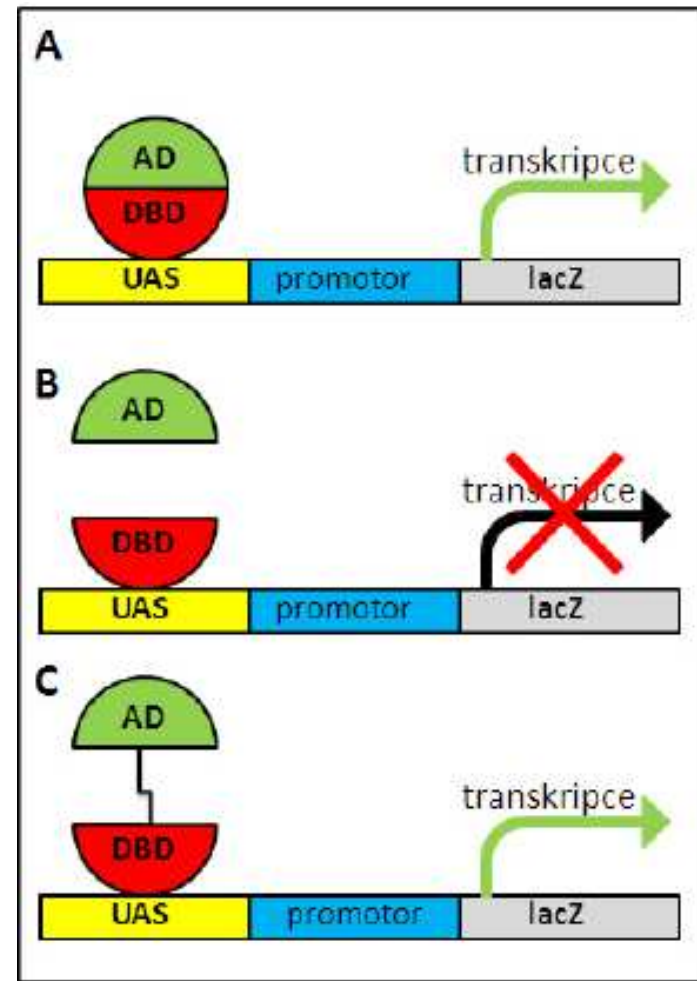
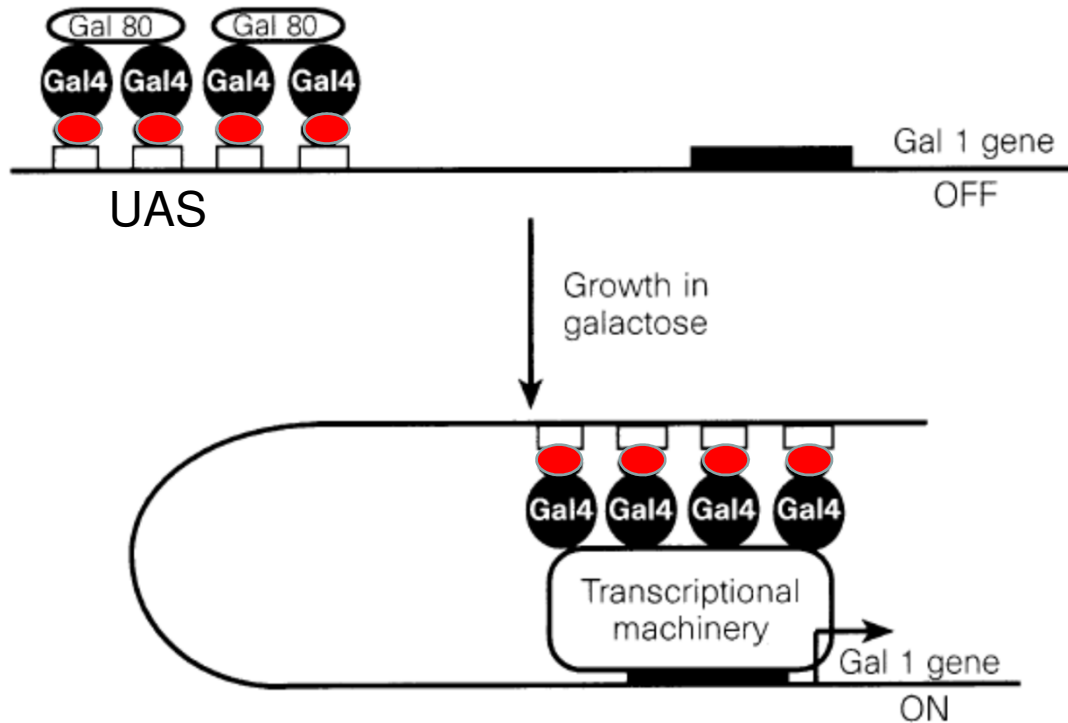


Hittinger et al., PNAS, 2004

- 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)

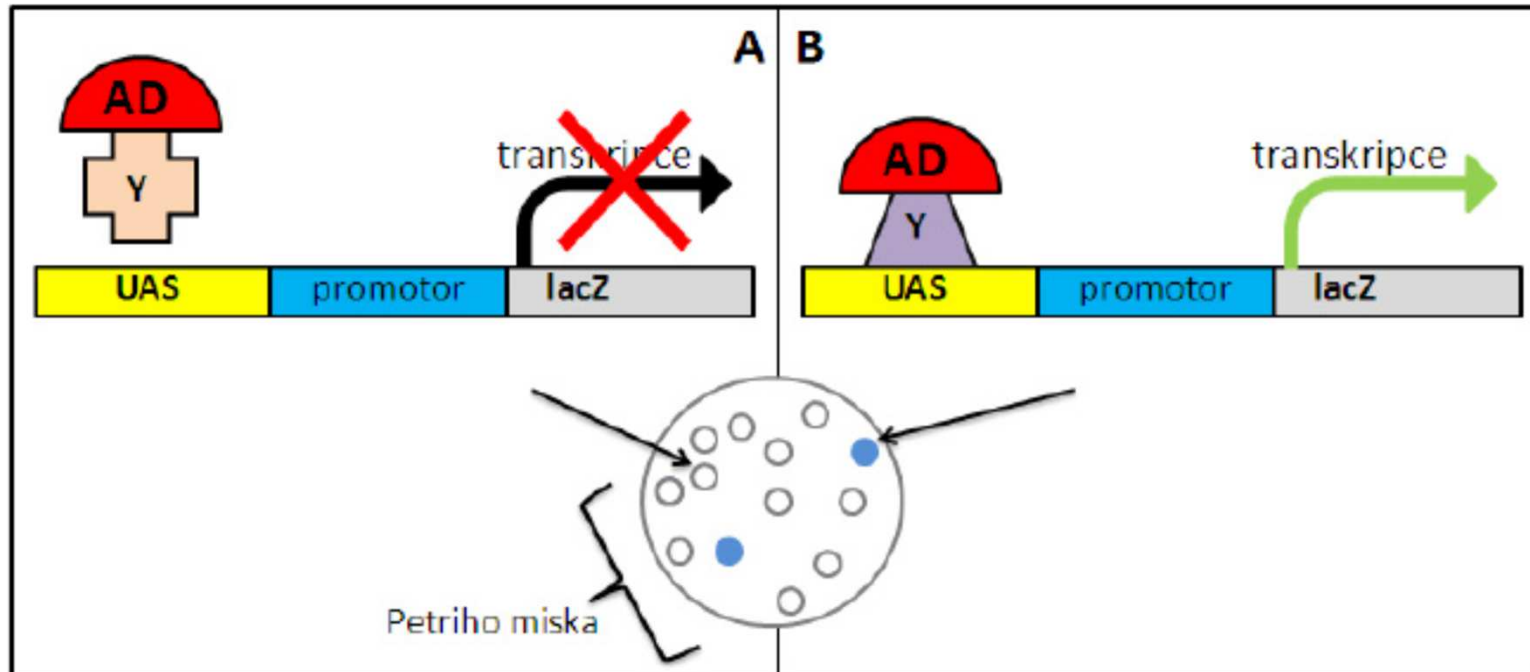
evoluce přístě

Transkripční aktivátor Gal4p



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

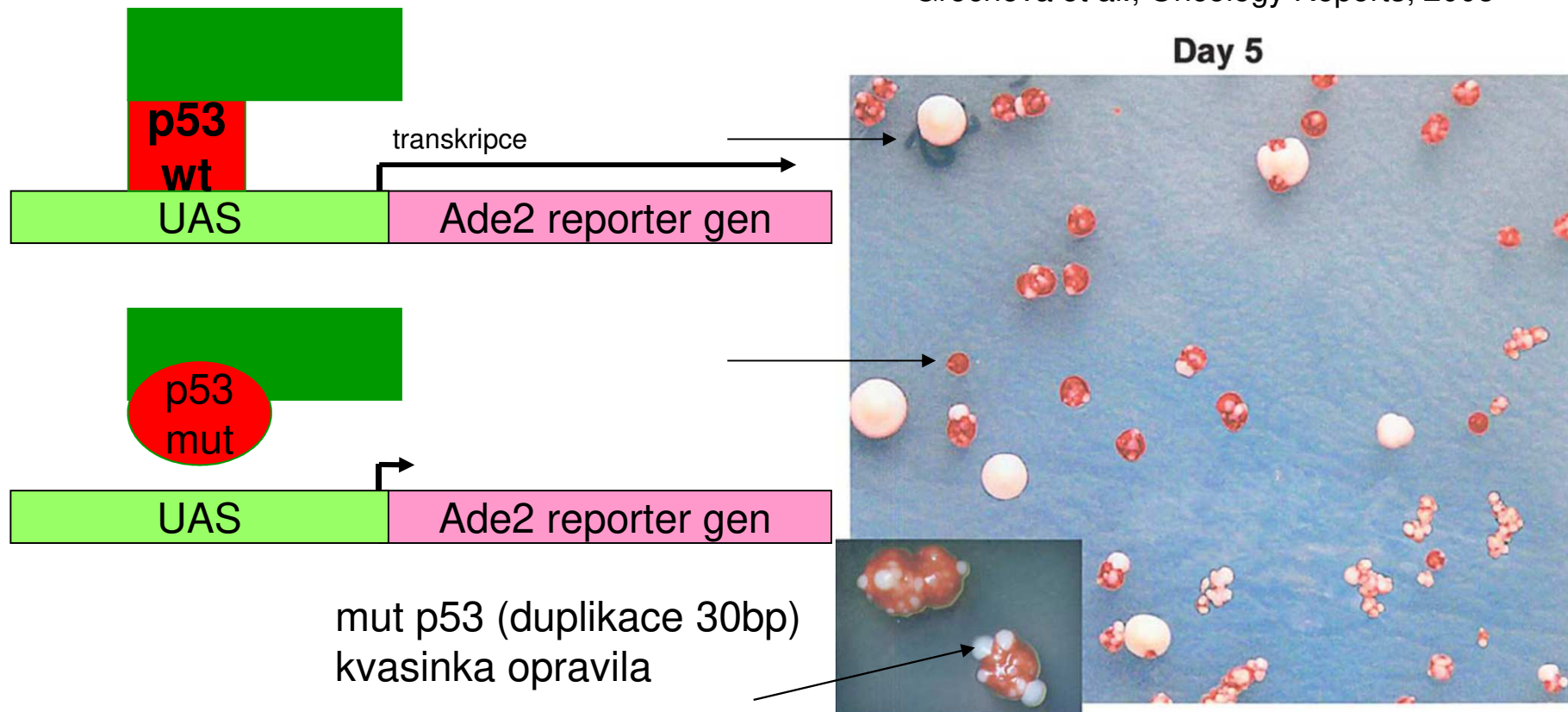
Vznik 1-hybridních systémů



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)

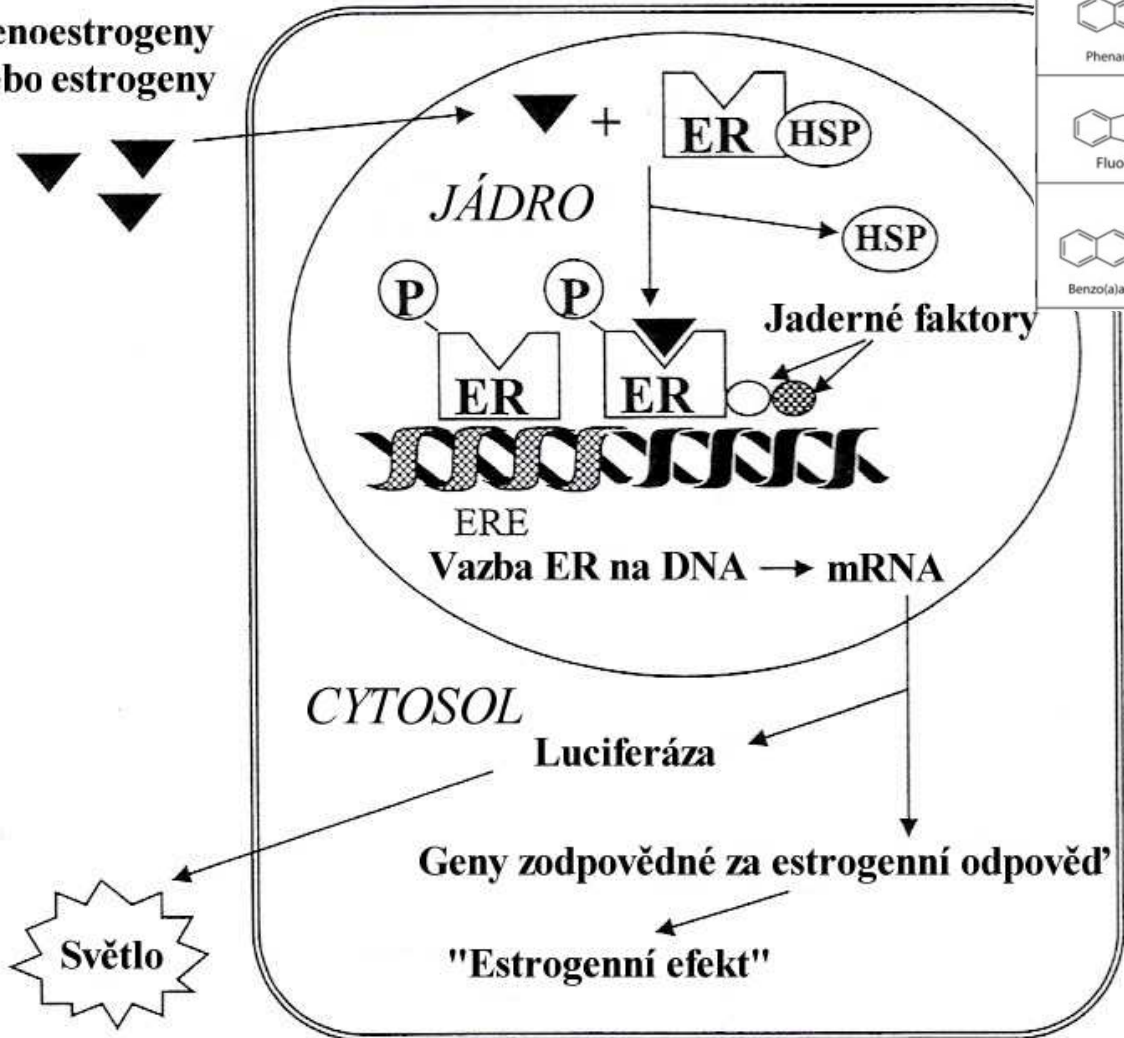


Analýza funkčních vlastností p53

- stanovení aberací p53 v klinickém materiálu - imunoanalýza, FISH, sekv. 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



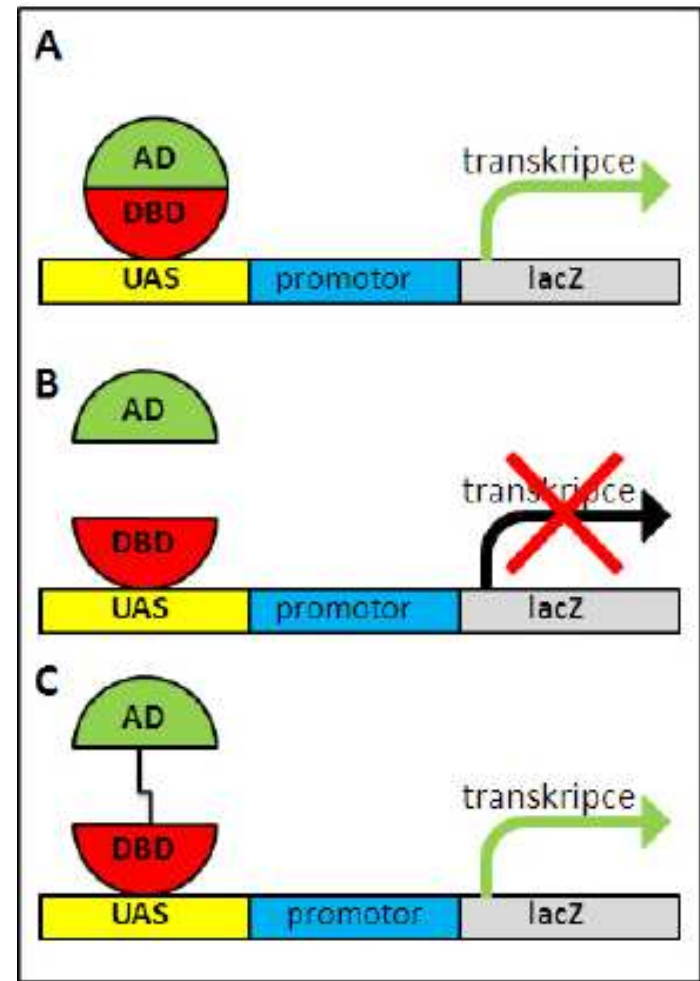
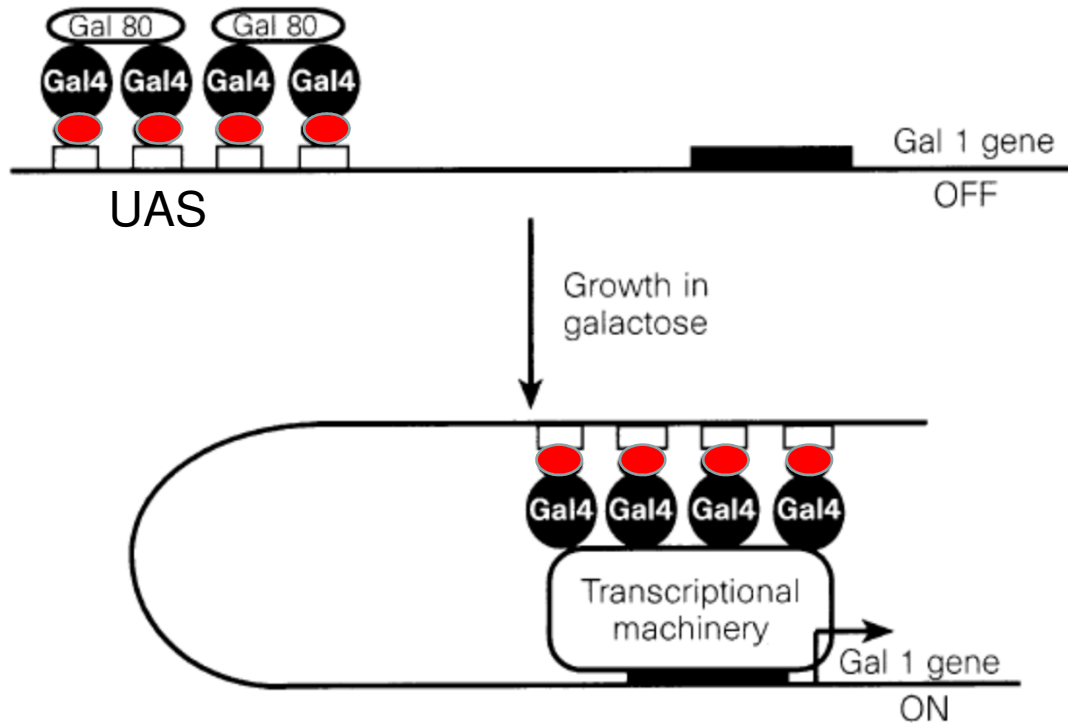
<chem>c1ccc2ccccc2c1</chem> Naphthalene	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Quinoline	<chem>Cc1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> 6-methylquinoline	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Isoquinoline	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Quinazoline	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Phthalazine
<chem>c1ccc2cc3ccccc3cc2c1</chem> Anthracene	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Acridine	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Phenazine			
<chem>c1ccc2cc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Phenanthrene	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Benzo(h)quinoline	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Phenanthridine	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> 1,10-phenanthroline	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> 1,7-phenanthroline	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> 4,7-phenanthroline
<chem>c1ccc2cc3ccccc3cc2c1</chem> Fluorene			<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Carbazole		
<chem>c1ccc2cc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Benzo(a)anthracene	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Benzo(a)acridine			<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Benzo(c)acridine	

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

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

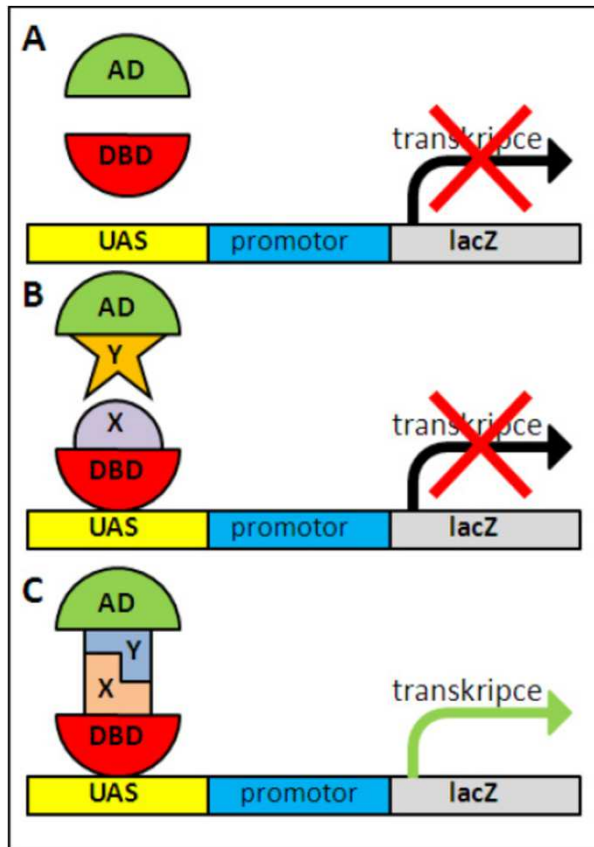
Bartos et al, Env Tox, 2006

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

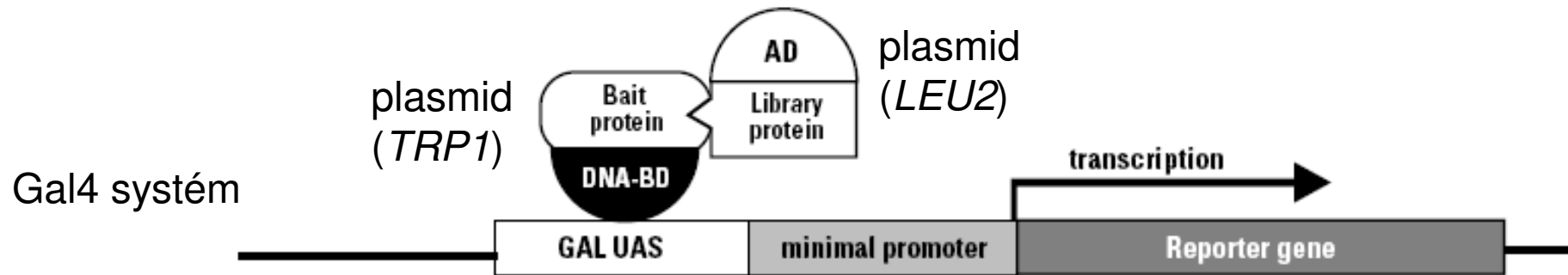


Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

Nejčastěji používaný kmen PJ69-4a

MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200

gal4Δ gal80Δ

LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ

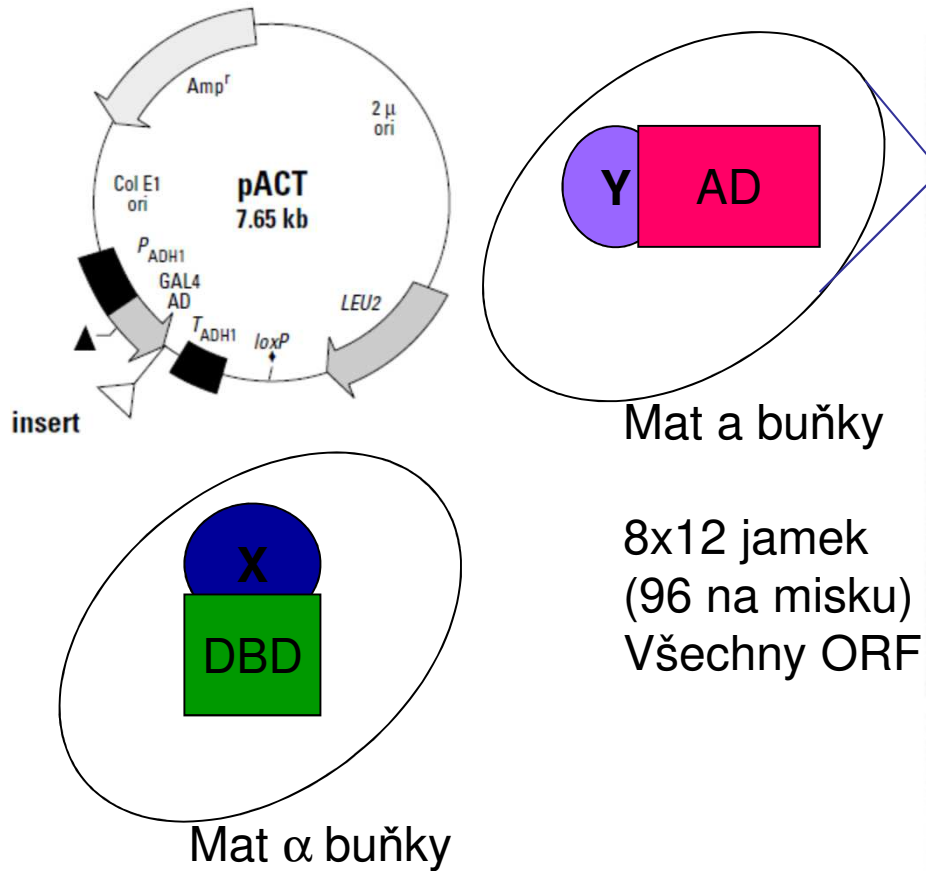
různé promotory	GAL1 UAS	GAL1 TATA	velmi citlivý (3AT) <i>HIS3</i>
	GAL2 UAS	GAL2 TATA	velmi stringetní <i>ADE2</i>
	MEL1 UAS	MEL1 TATA	semikvanitativní (β-gal) <i>lacZ</i>
	MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>MEL1</i>

Reportérové geny

Reporter genes

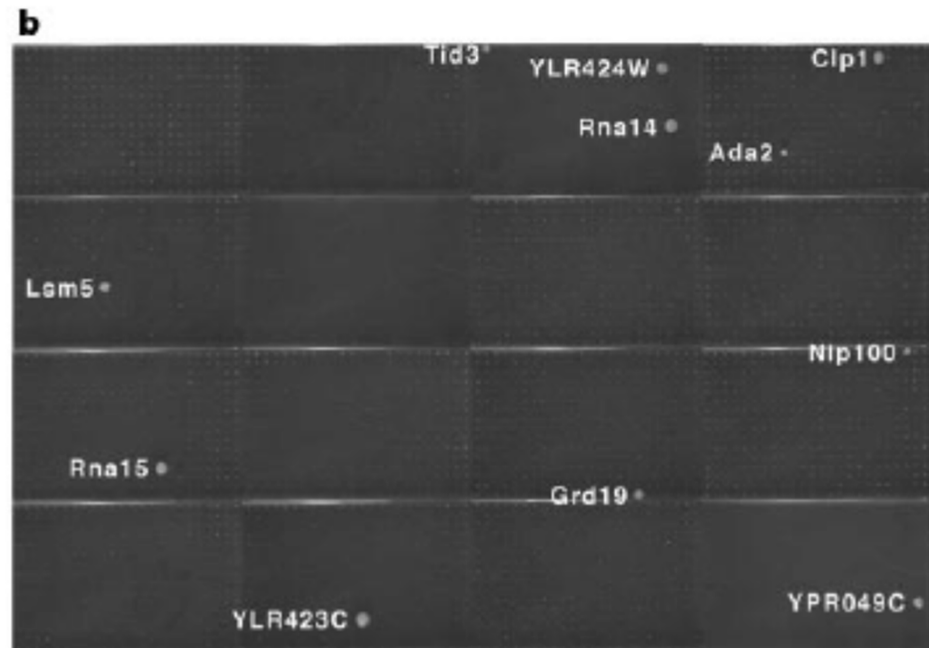
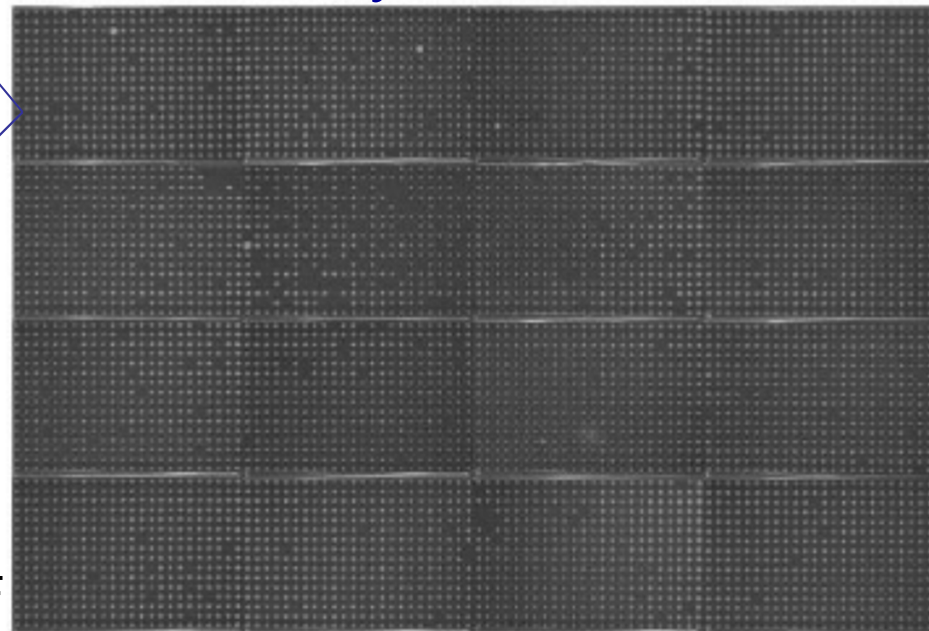
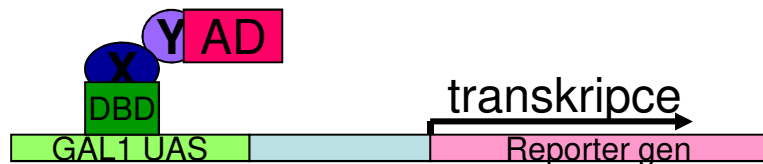
<i>E. coli lacZ*</i>	β -Galactosidase chromogenic reporter (178)	
<i>S. cerevisiae MEL1</i>	Secretory α -galactosidase chromogenic reporter (5)	kvantitativní
<i>E. coli gusA</i>	β -Glucuronidase chromogenic reporter (580)	
<i>Aspergillus oryzae lacA3</i>	Engineered secretory β -galactosidase chromogenic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

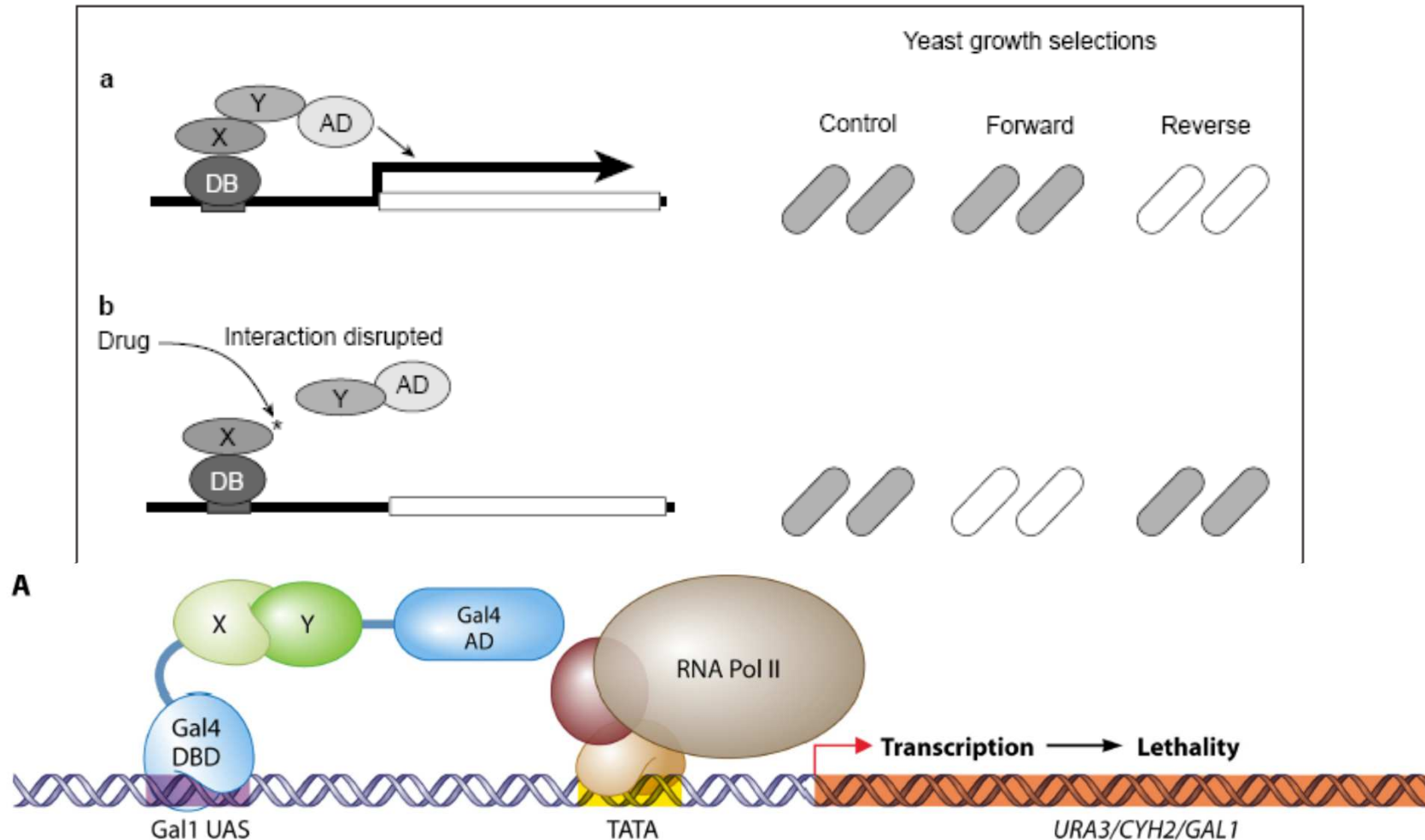


8x12 jamek
(96 na misku)
Všechny ORF

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

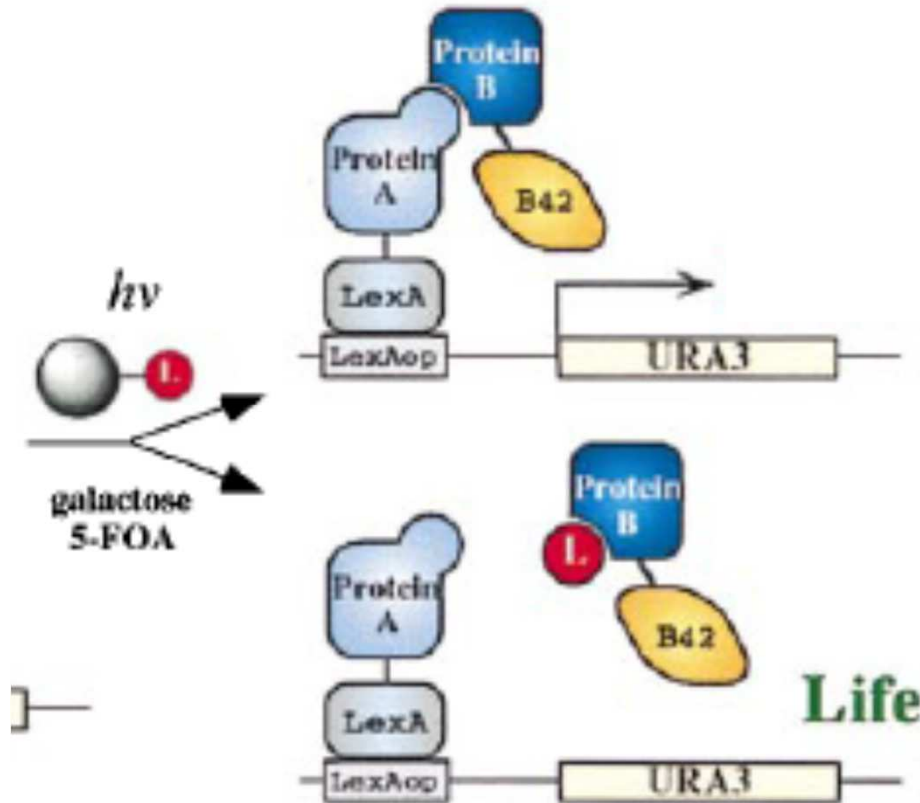


Reversní systém (Y2H)



- 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)

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 μ M
A			
B			
A-B			

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

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

Split-hybrid systém

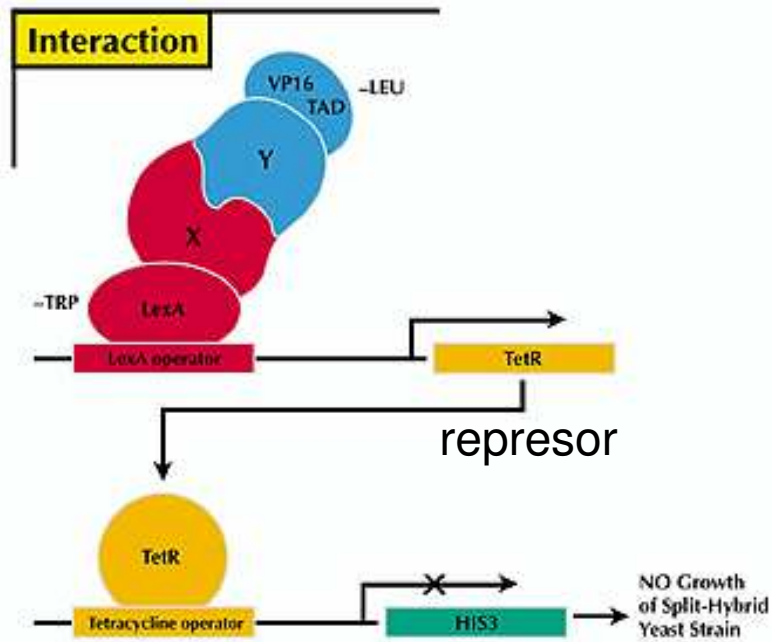


Fig. 1
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells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

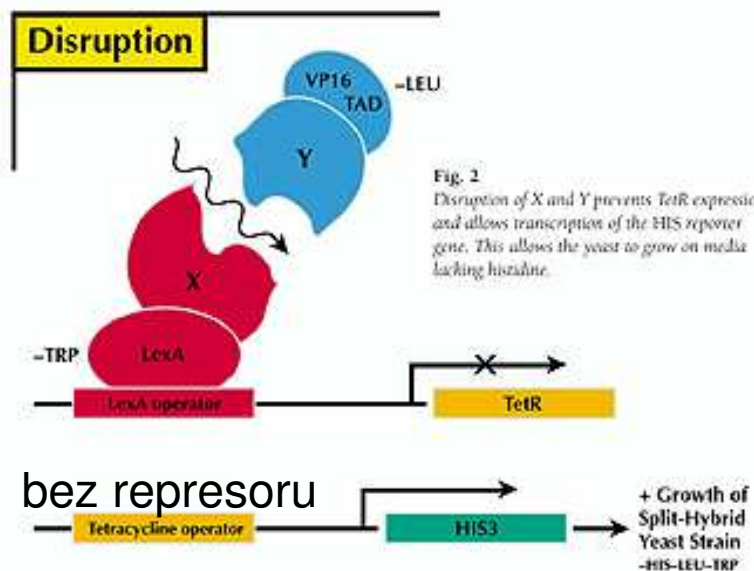


Fig. 2
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.



PCR mutagenesis

Mutated library

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

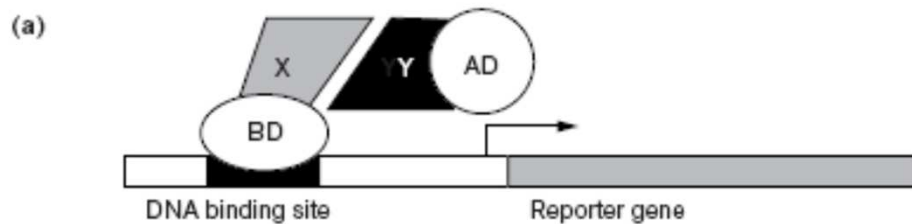
-5,000 Growth(+)

536 X-gal(+)

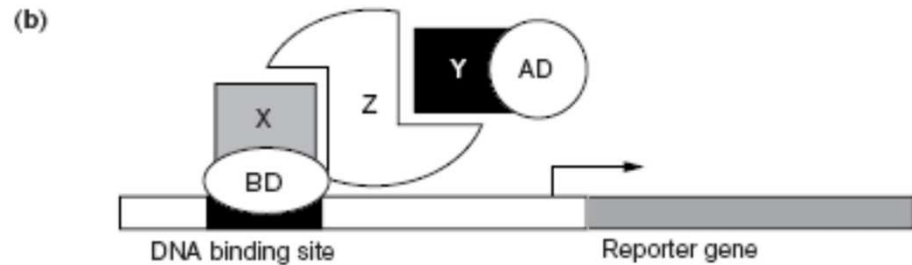
193 mutant DNAs were isolated and re-screened in the split-hybrid and two-hybrid strains

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

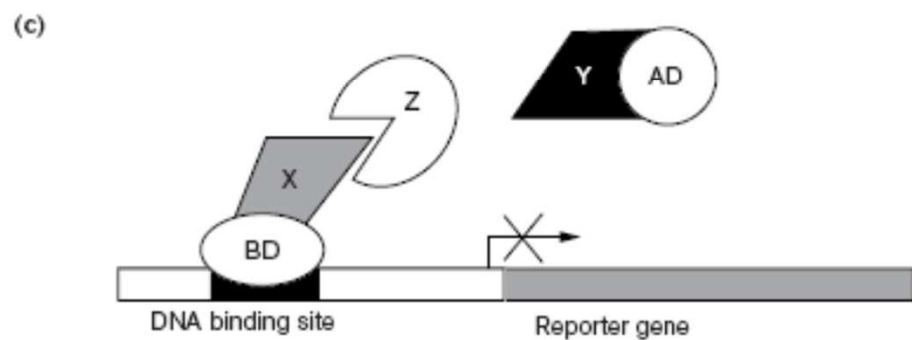
70 mutants contained single amino acid mutations



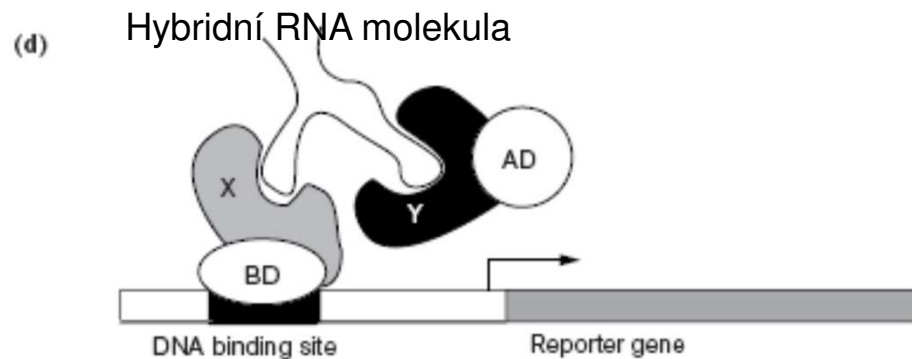
Klasický dvoj-hybridní systém



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

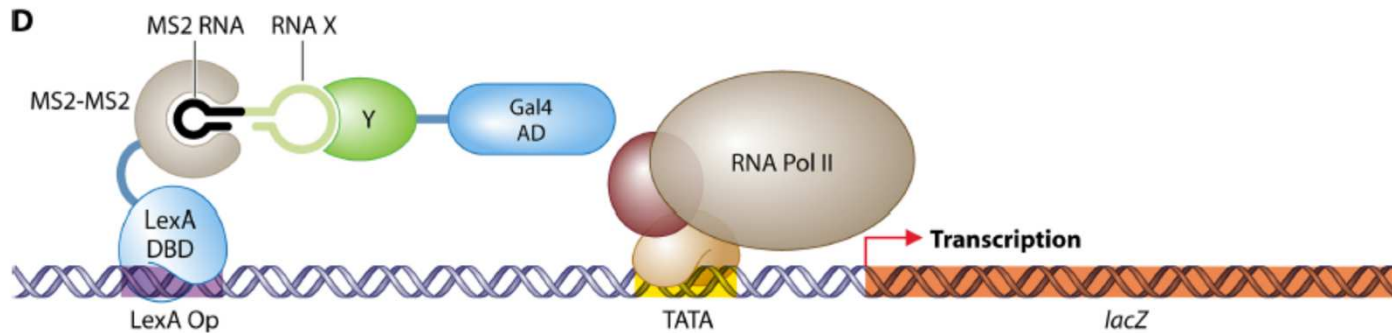


Dvoj-hybridní systém
- proteinový inhibitor interakce



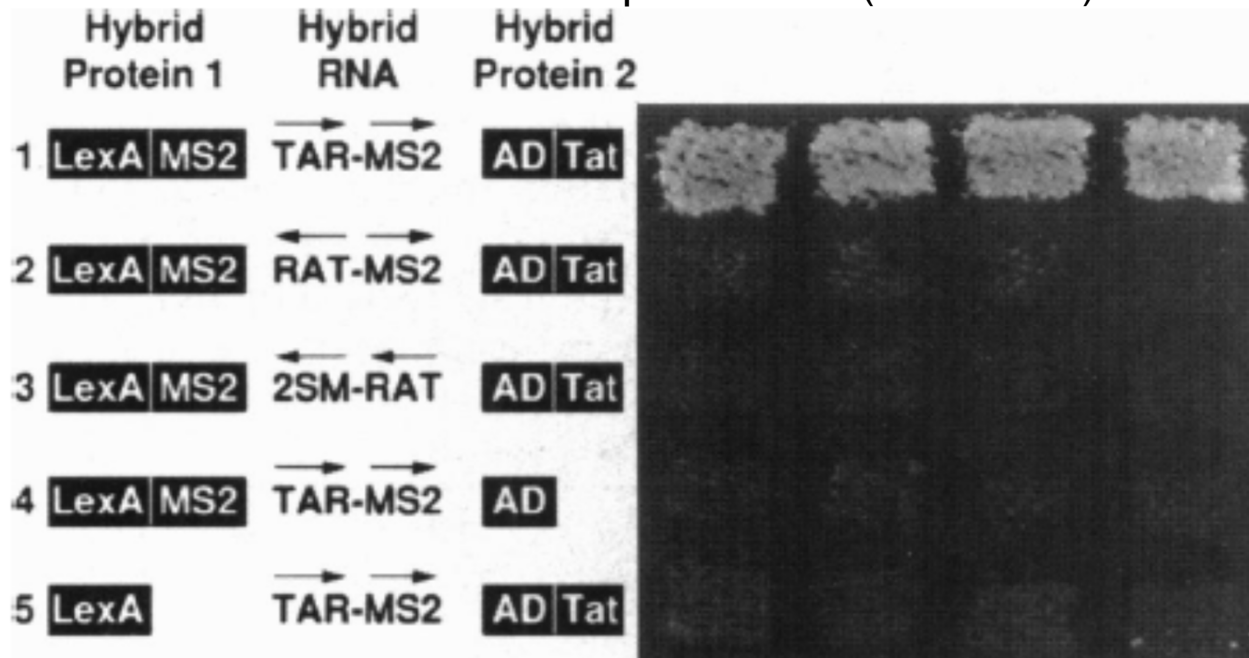
Troj-hybridní systém
– RNA interakce
- ligand/receptor

Analýza vazby protein-RNA (Y3H)

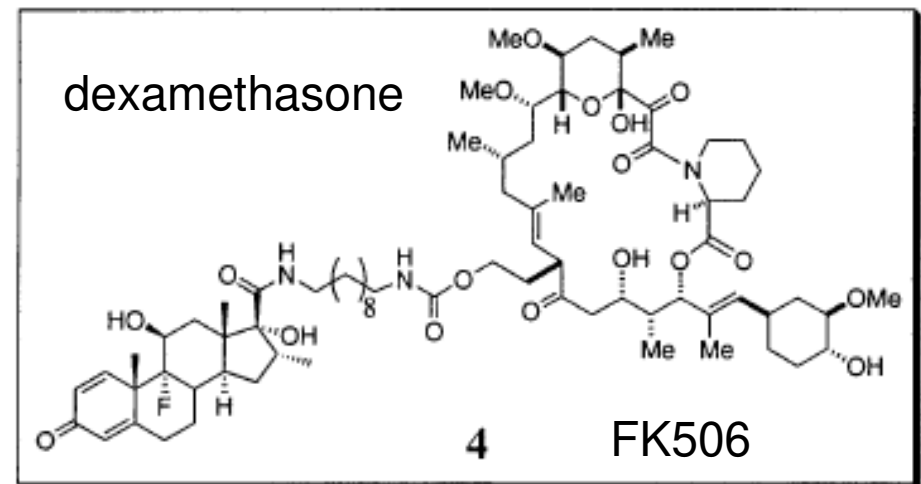
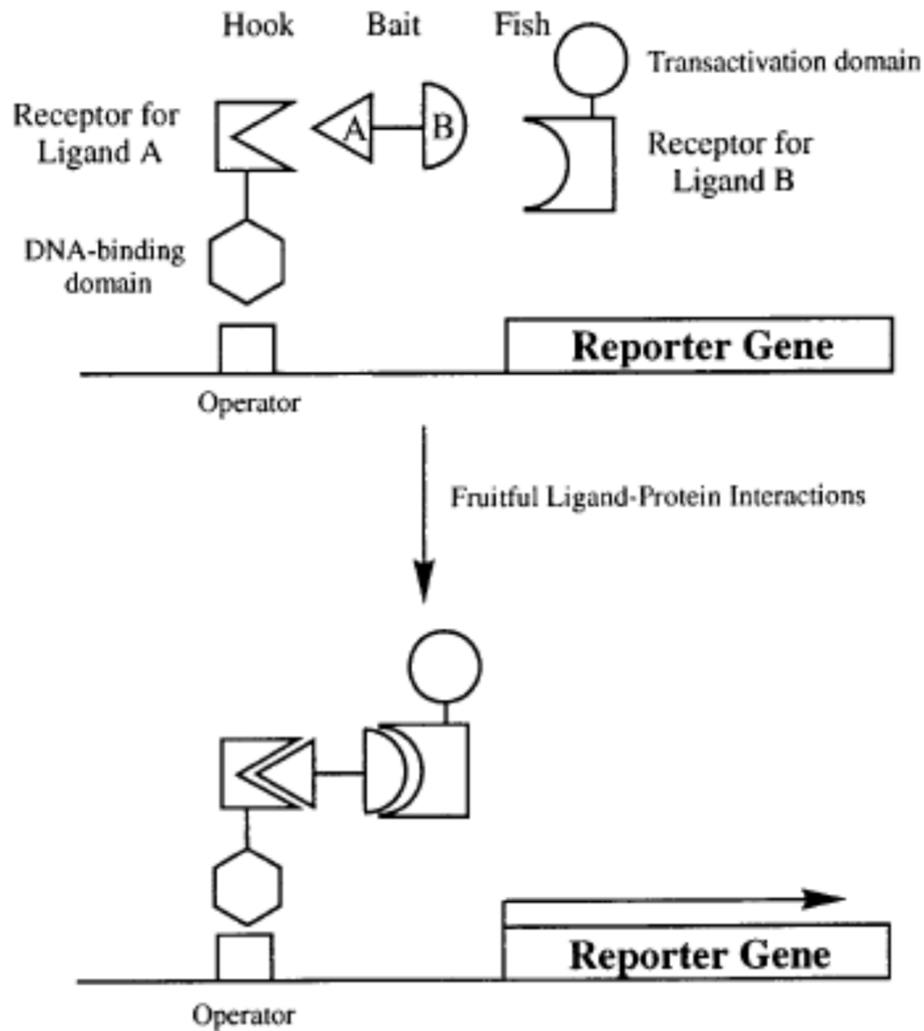


Tři hybridní/fúzní konstrukty:

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)



Vazba ligand-receptor (Y3H)



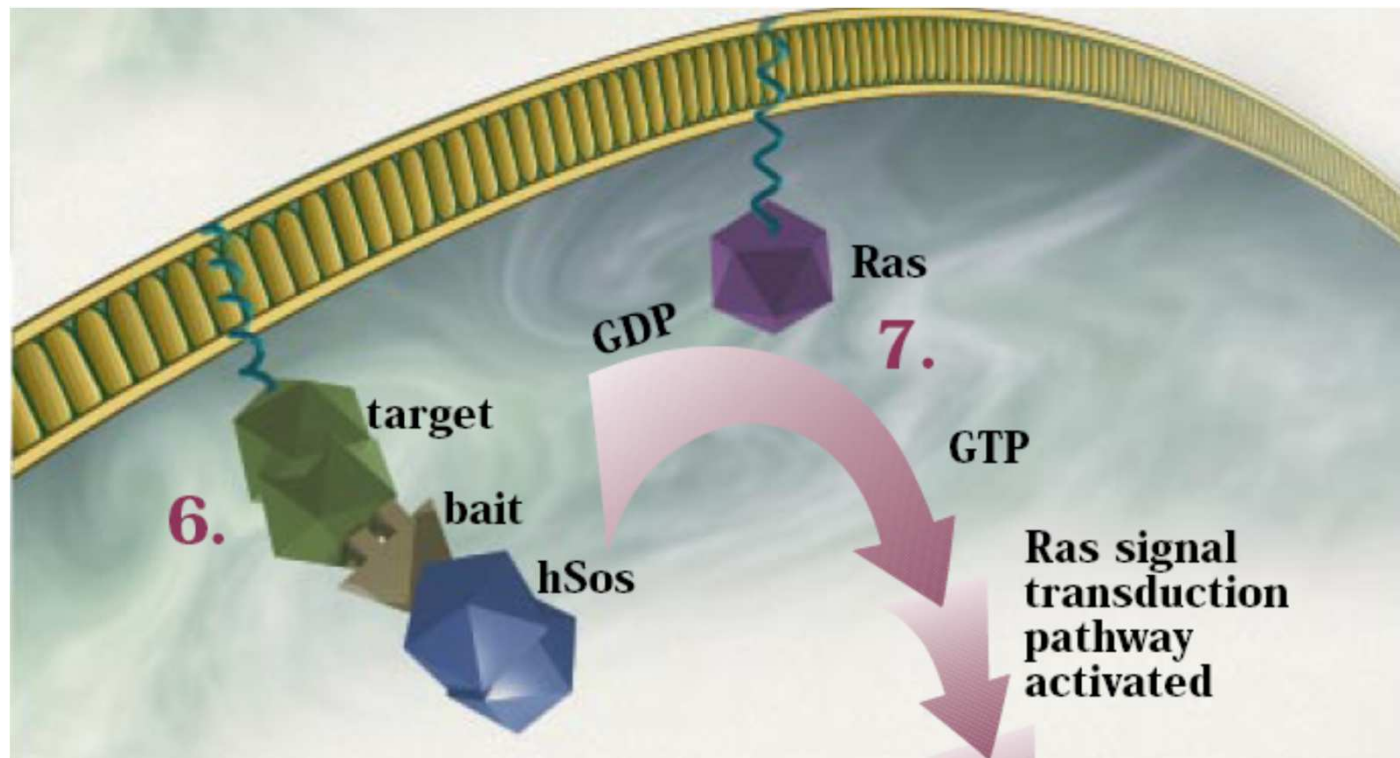
Tři hybridní/fúzní konstrukty:

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)

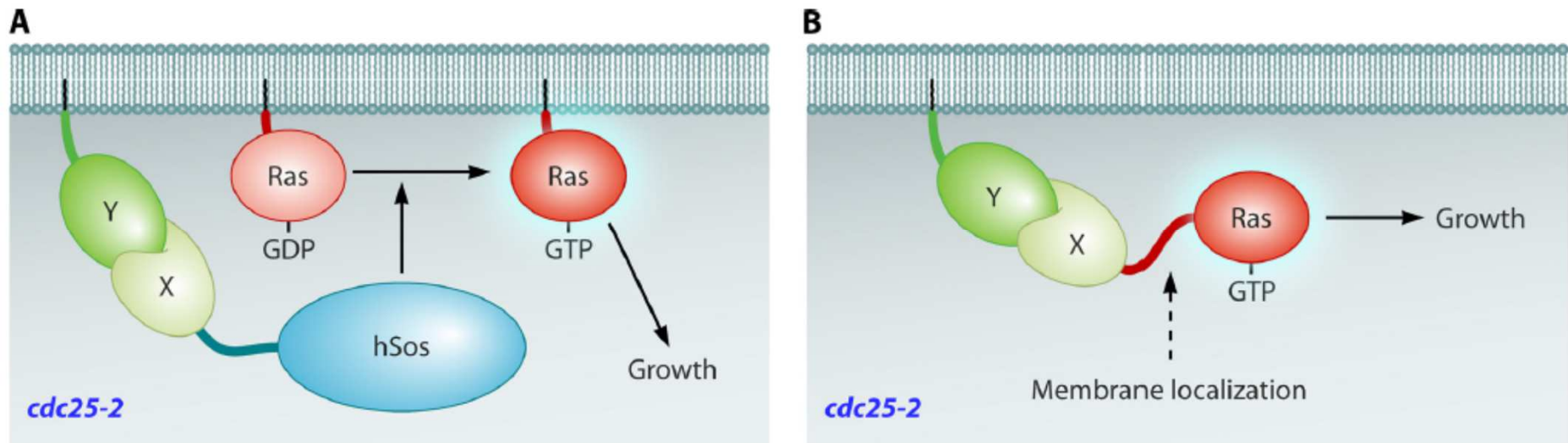


alternativní Ras hybridní systémy

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

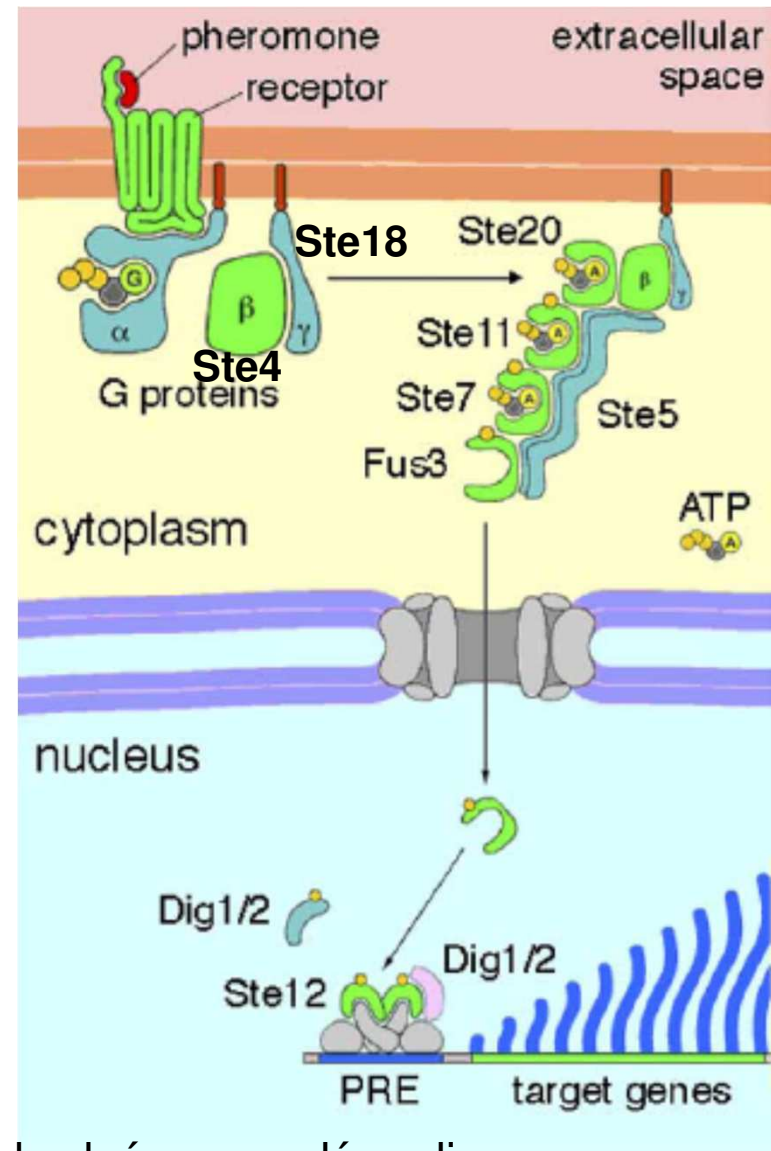
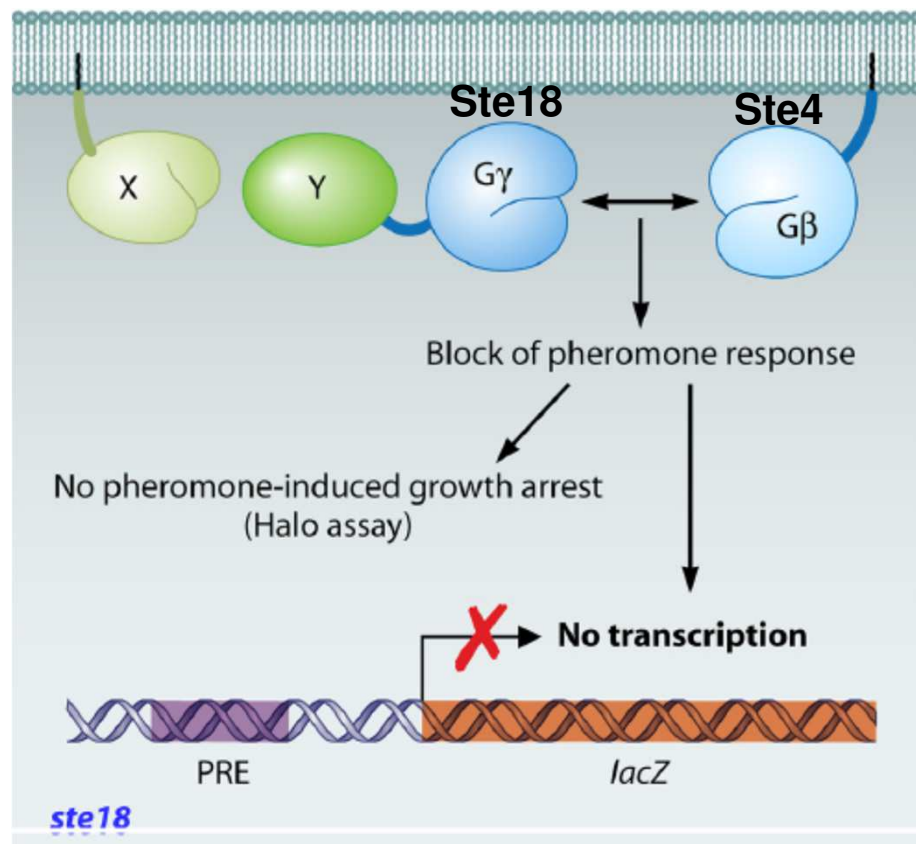
- jeden partner je myristylován (signální sekvence) a ukotven na membránu a druhý (interakční) partner je fuzován k hSOS – spustí Ras dráhu (roste i na vyšší teplotě)

(B) – savčí konstitutivně aktivní Ras protein (bez signální sekvence pro ukotvení) je fúzován s proteinem, který interaguje s partnerem ukotveným v membráně (spustí se Ras dráha a *cdc25-2* kvasinky rostou 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

