

Souhrn předchozí přednášky

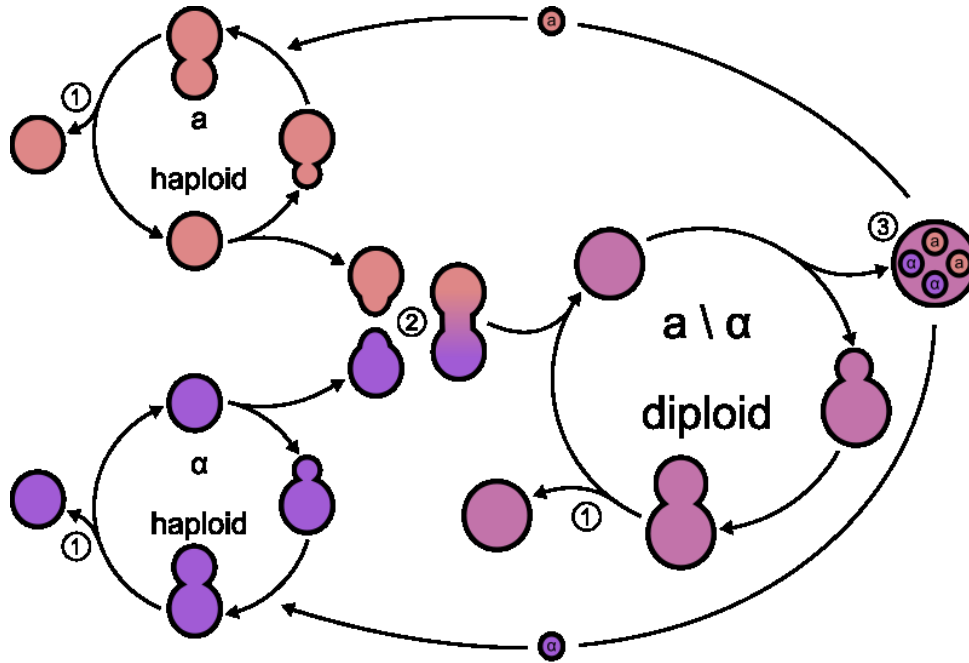
- Genetické metody
 - mutageneze/“screen“
 - komplementace
 - identifikace
- Buněčný cyklus
 - Průběh a regulace BC
 - Synchronizace buněk
 - **Mechanismy regulace párování**
 - Homothalické kmeny

Cvičení: 5.12., A7 (2.17) - pláště, psací a kreslicí potřeby

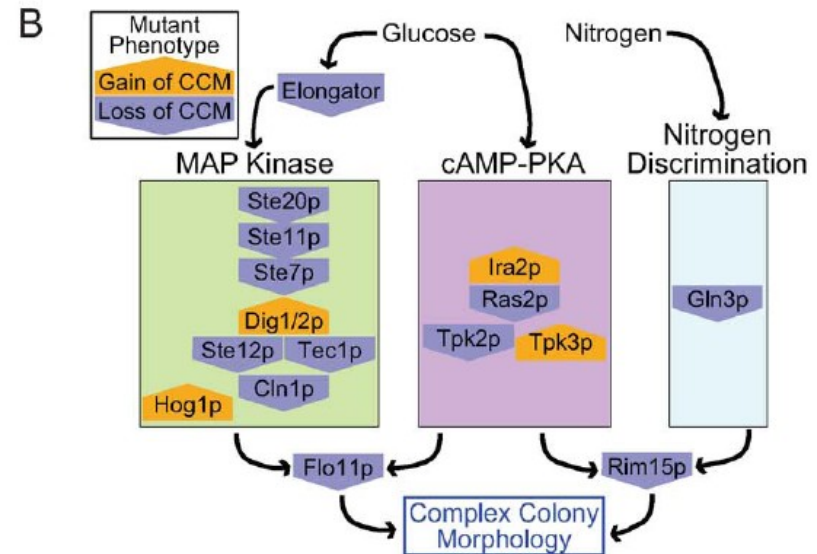
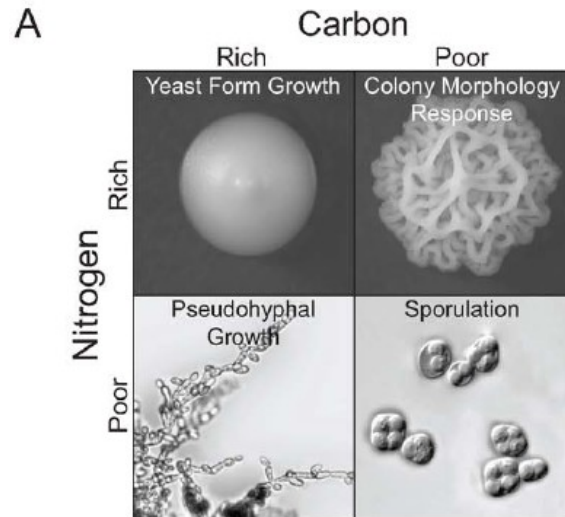
Osnova přednášky

- Regulace transkripce
 - při párování a sporulaci
 - Gal4 transkripční faktor
 - hybridní systémy
 - aplikace
 - modifikované kvasinkové hybridní systémy

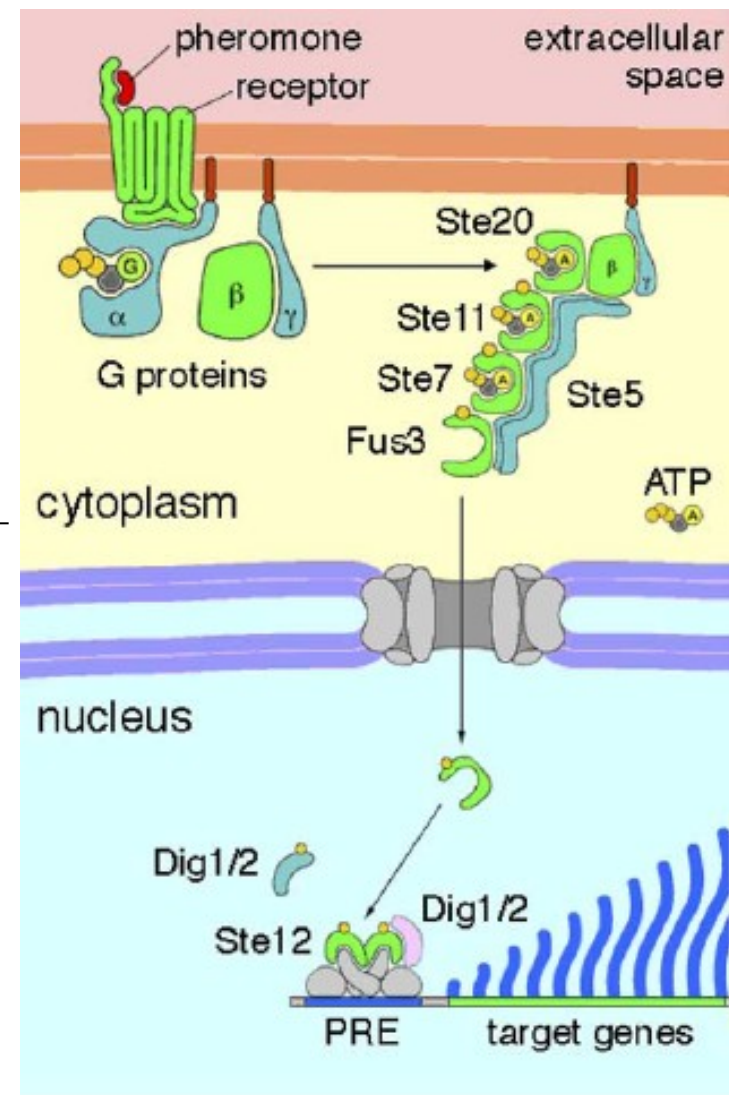
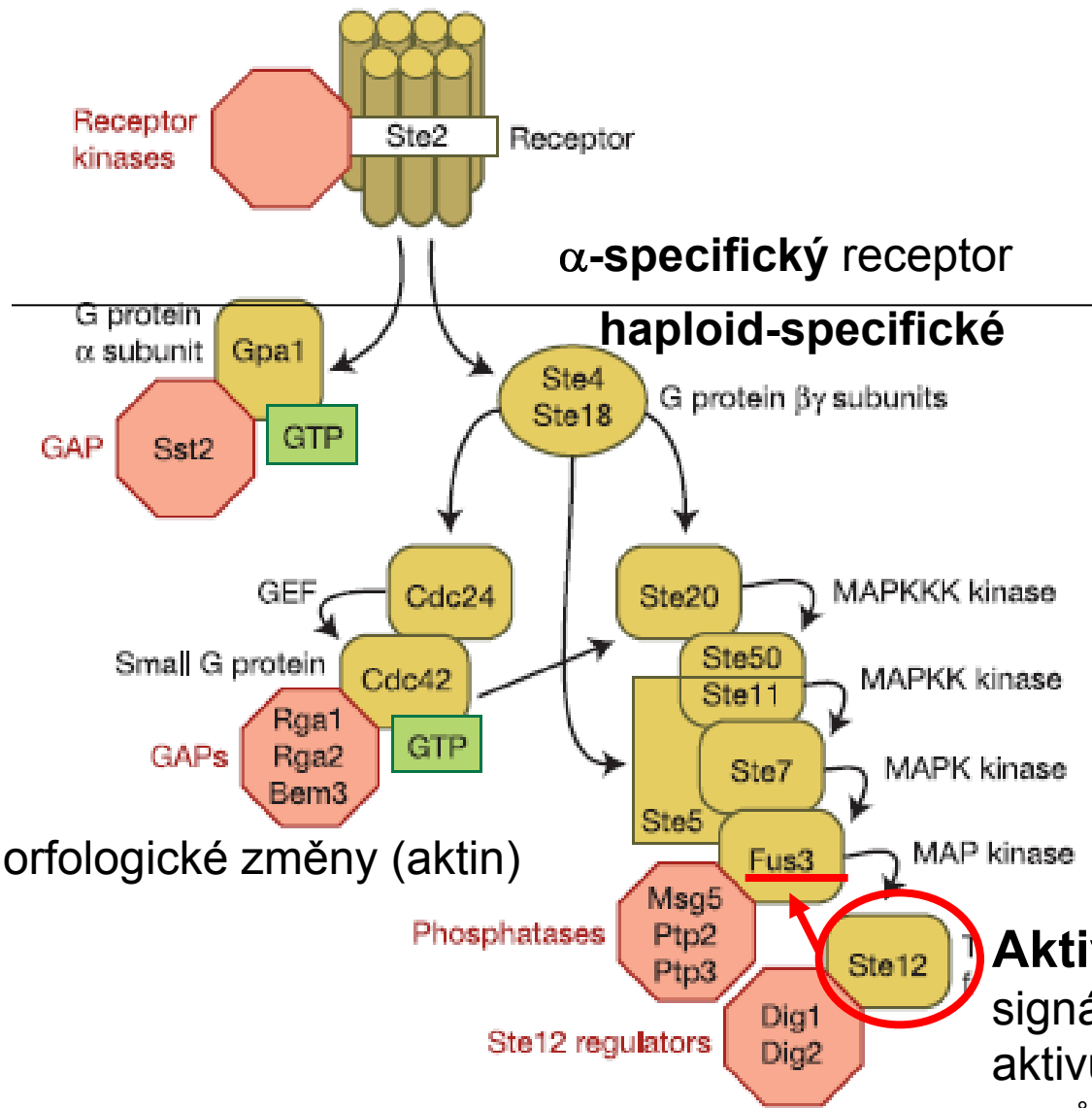
Regulace buněčných programů



- haploidní buňky se mohou párovat (za vzniku diploidních buněk)
- diploidní buňky mohou sporulovat (za vzniku haploidních buněk, diploidní se nepárují)
- diploidní buňky indukují meiosis ... (haploidní neindukují meiosis)
- sporulace závisí na C a N



Signální dráha – α faktor

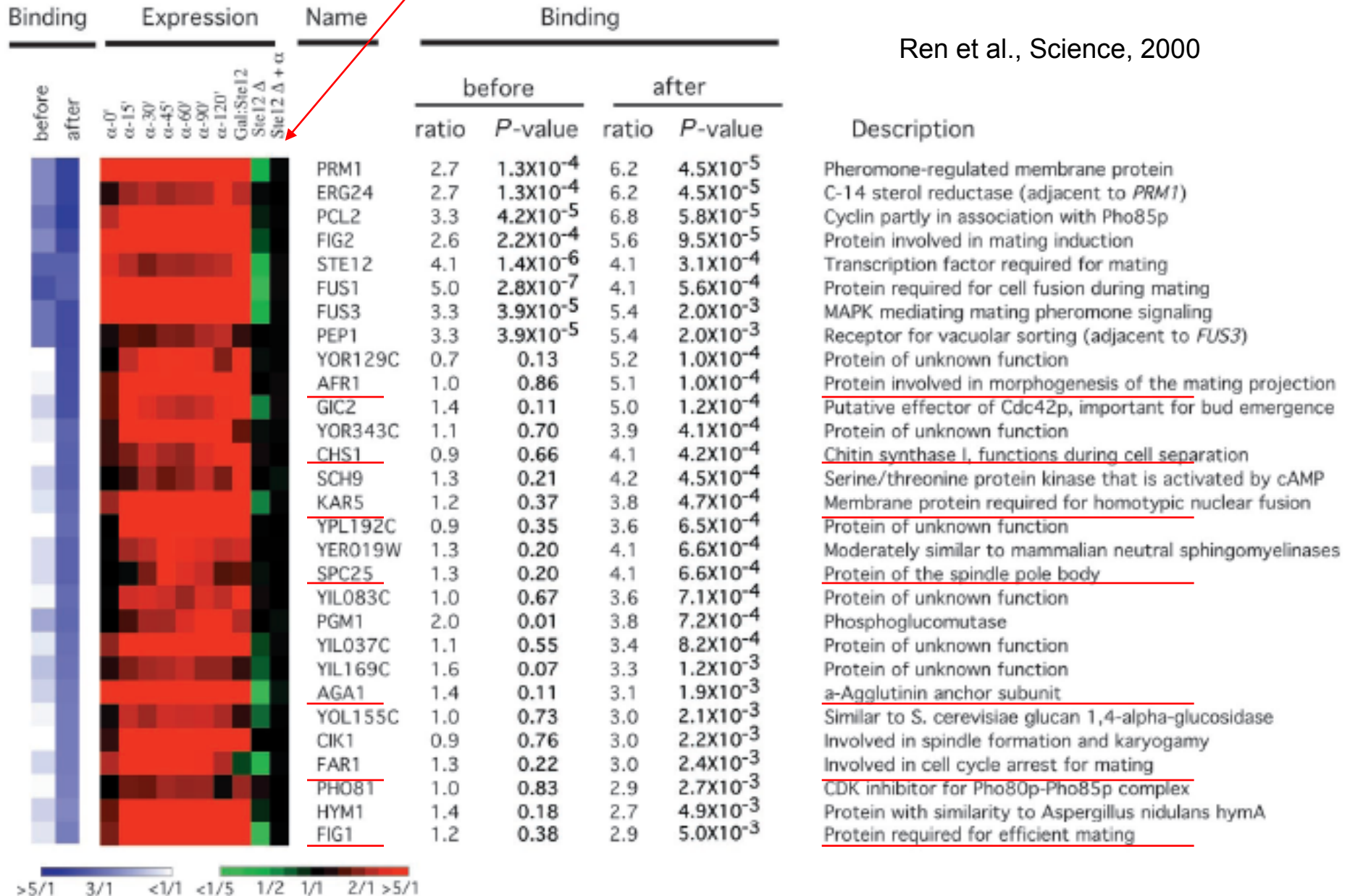


Aktivace transkripce (čím více je signálu tj. α -faktoru, tím více se aktivuje transkripce specifických genů)

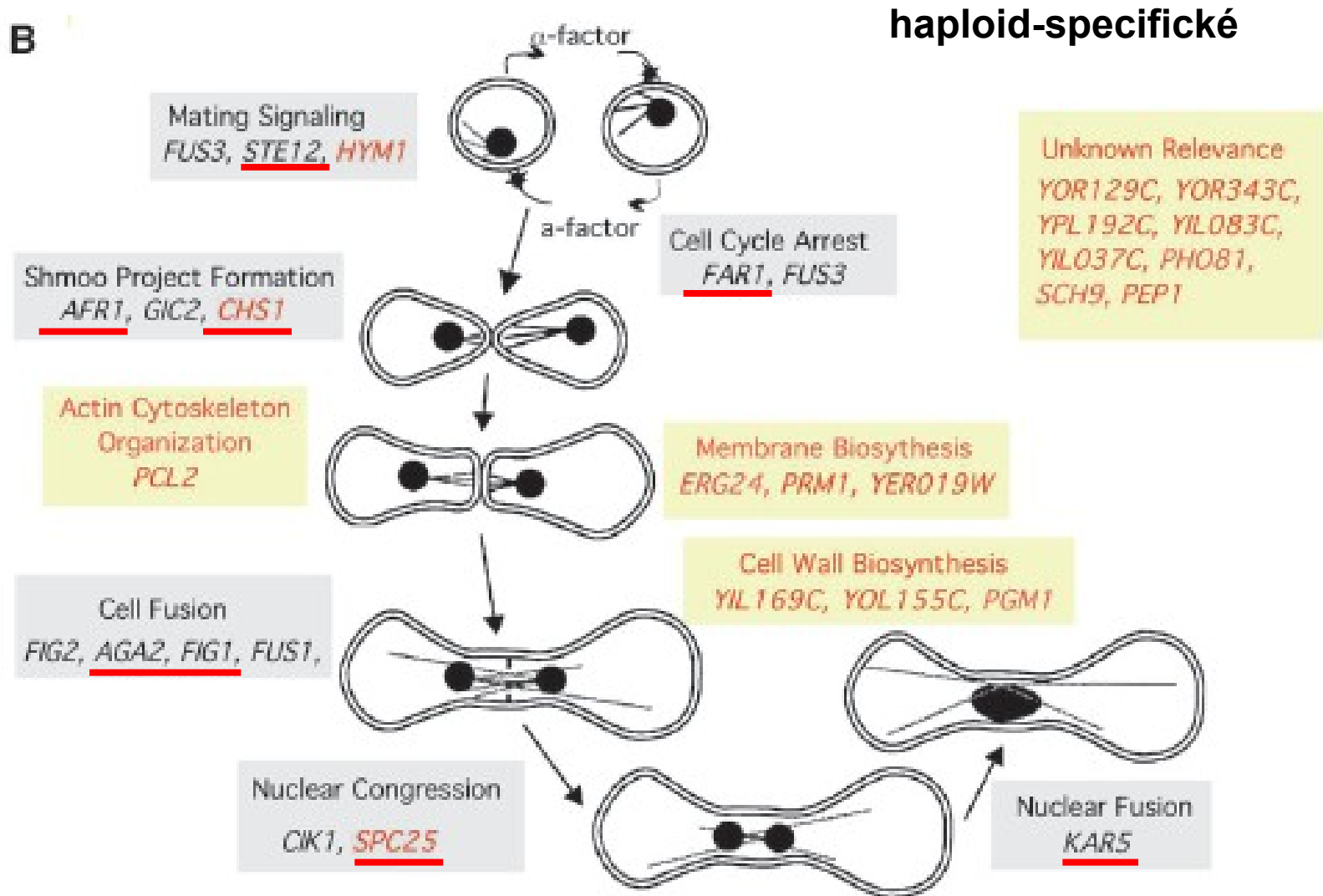
A ChIP Ste12p
microarray po
α-faktoru

transkripce
závislá na STE12

Ren et al., Science, 2000



Funkce proteinů v průběhu párování/matingu



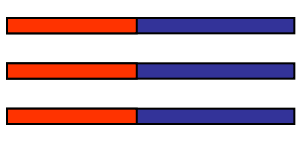
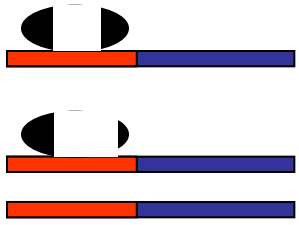
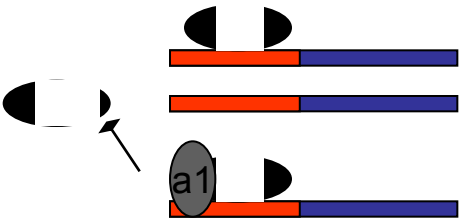
Regulace (transkripce) párovacího typu

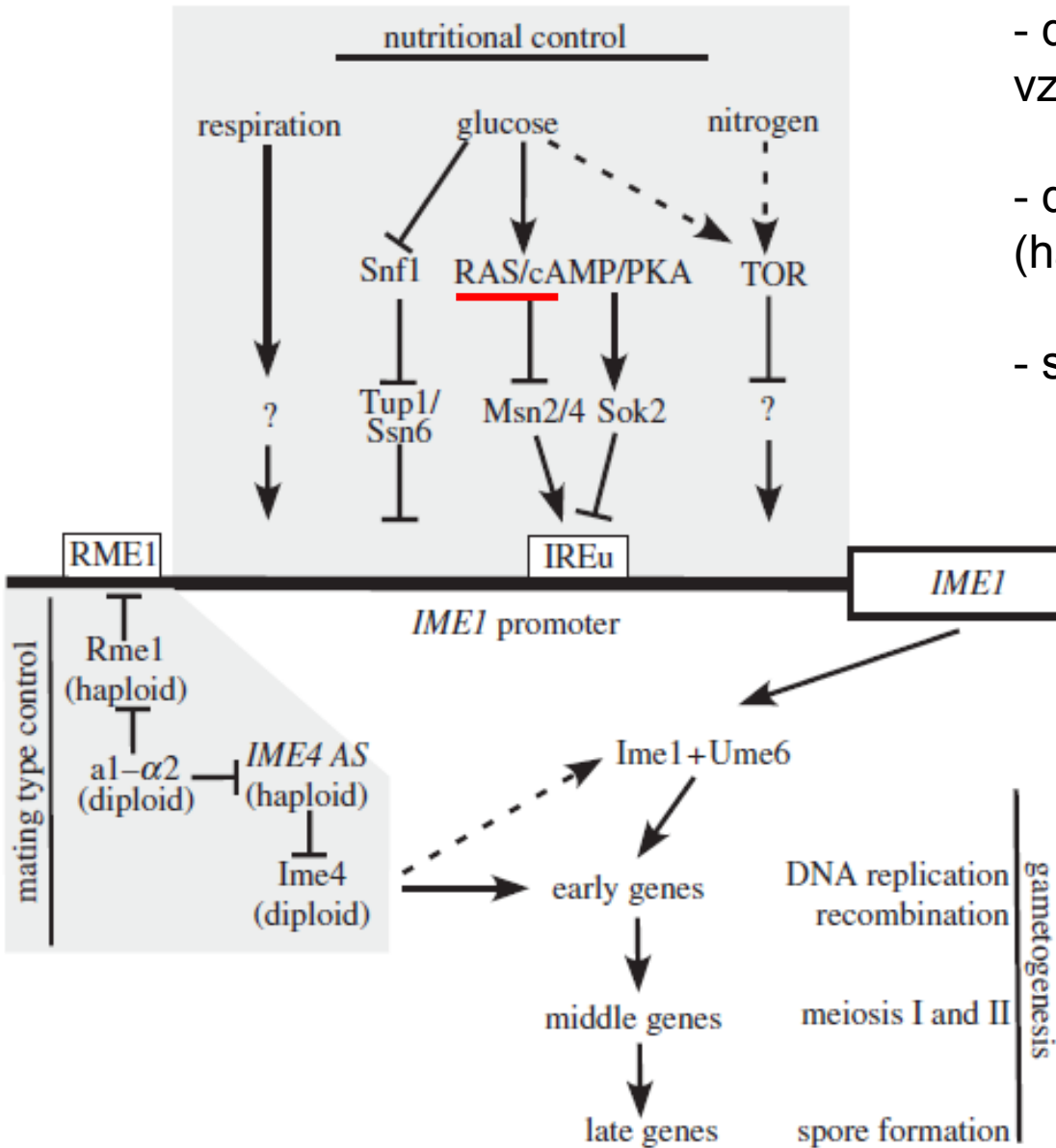
a1, a2 + α 1, α 2 kódují transkripční faktory, které ovlivňují transkripci 3 skupin genů

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.= ... *RME1* (reprimuje ... vstup do meiosis)

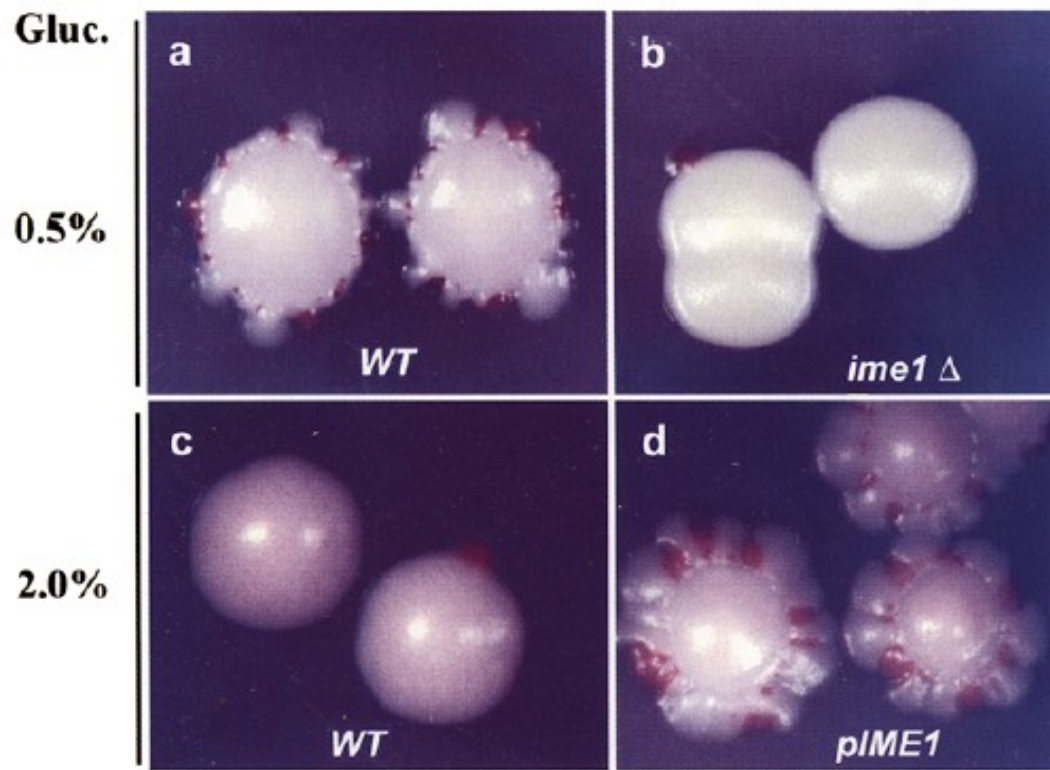
MAT lokus	Typ buňky	Geny kontrolované MAT lokusem
a1, a2	a haploid	 aSG ON α SG OFF haploid SG ON
α 1, α 2	α haploid	 aSG OFF α SG ON haploid SG ON
α 1, α 2 a1, a2	diploid	 aSG OFF α SG OFF haploid SG OFF



- diploidní buňky mohou sporulovat (za vzniku haploidních buněk)
- diploidní buňky indukují meiosu ... (haploidní nesmí indukovat meiosu)
- sporulace závisí na C a N

Regulace sporulace (RNAi v kvasinkách)

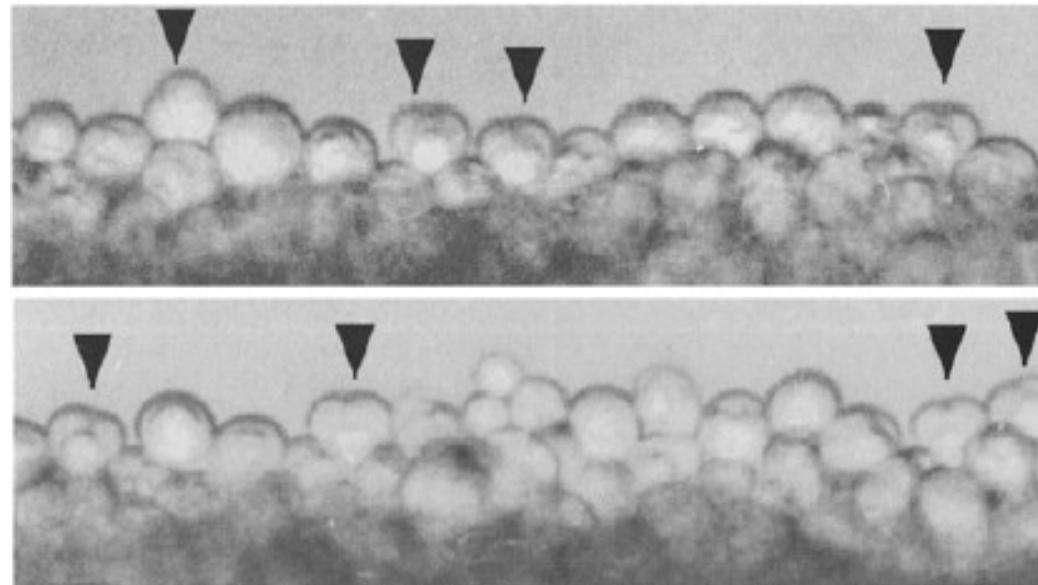
- jeden z nejvíce regulovaných promotorů u *S.c.* (2kb) je *IME1* (induktor **meoisy 1**)
- v haploidních buňkách je inhibován represorem *RME1* (haploid SG) – přímá vazba na promotor + lncRNA (pokrývá *IME1* promotor a brání aktivátorům)
- v diploidních buňkách je *RME1* a *IME4AS* reprimován $a1-\alpha2$ represorem
- *IME4AS* je antisense RNA – brání indukcii meiosis v haploidních buňkách (v diploidních je reprimována – *IME4* gen indukuje meiosu)



- při vyčerpání živin na misce mohou (krajní) buňky začít meiotické dělení (diploidní *S. cerevisiae*)
- meiosa je indukována *IME1* transkripčním faktorem (v *ime1* Δ se meiosa neindukuje vs. v *pIME1* overexprimovaných buňkách je indukována meiosa i bez vyčerpání živin tj. 2% glukosa)

ade2 (červená barva) ukazuje haploidizaci heterozygotního diploida

šipky ukazují vřecka se čtyřmi sporami



Struktura promotorů

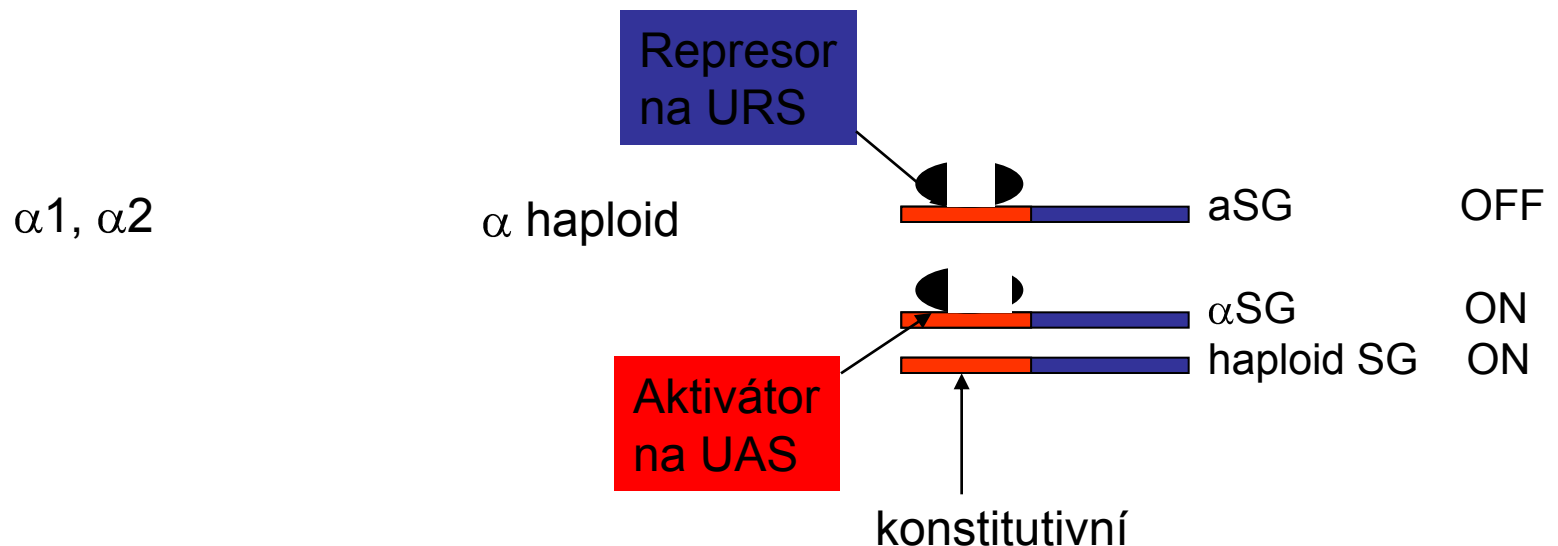
Kvasinkové promotory se liší od bakteriálních a vyšších eukaryot (kvasinky netranskribují z takových promotorů – kvasinkové plasmidy ...)

- 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 bakterií)

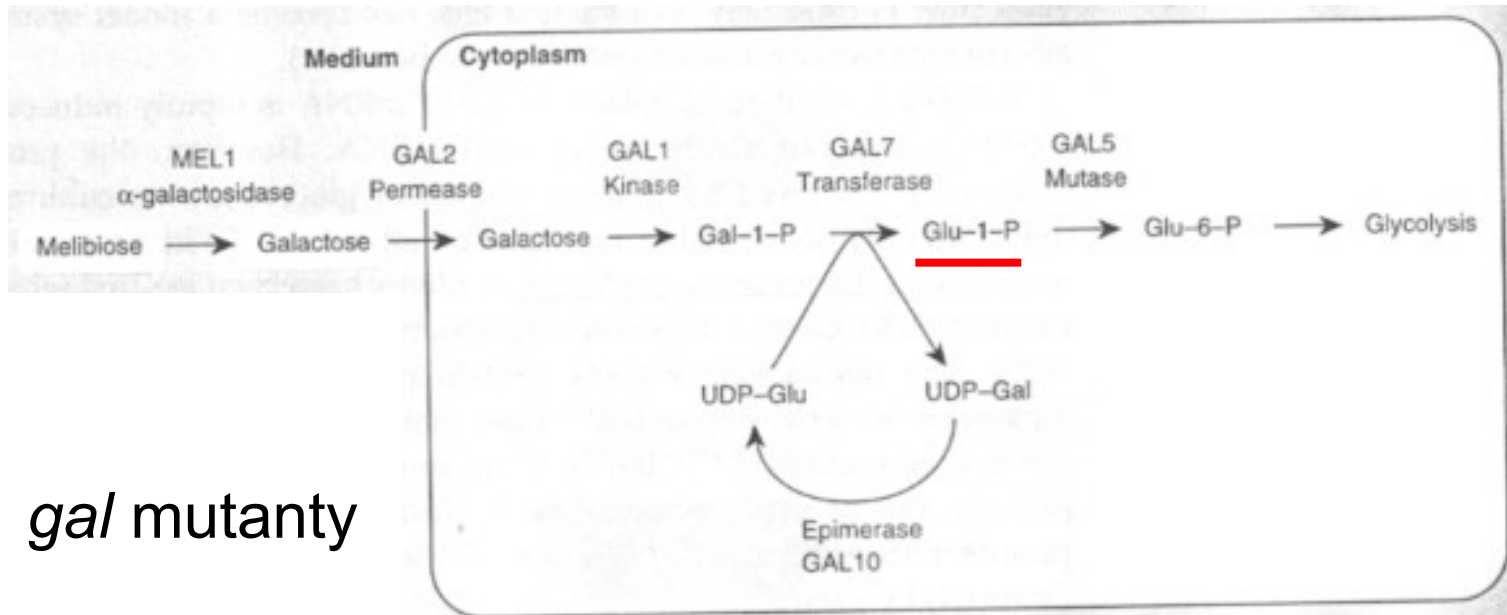
- UAS (upstream activating sequences) a URS (upstream repressing sequences)

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



Regulace metabolické dráhy galaktózy

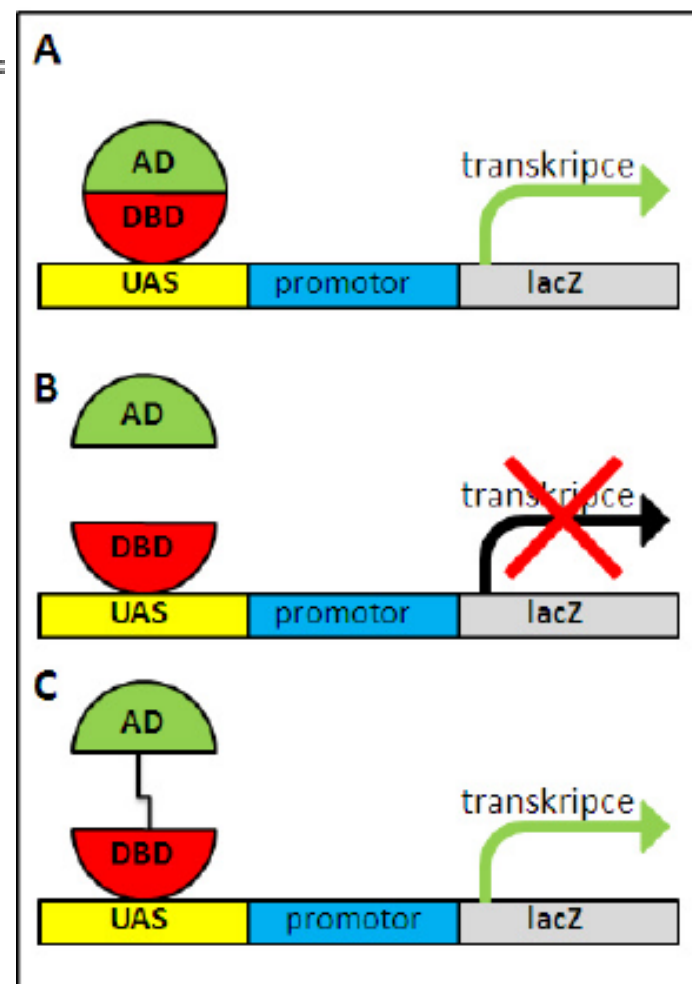
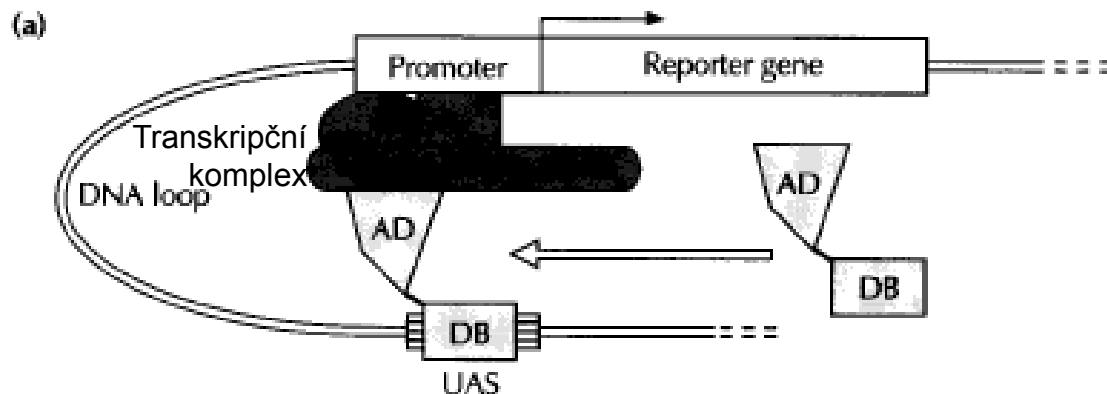
Různé kvasinky využívají různé cukry (viz přednáška o určování kvasinek)



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

Transkripční aktivátor Gal4p

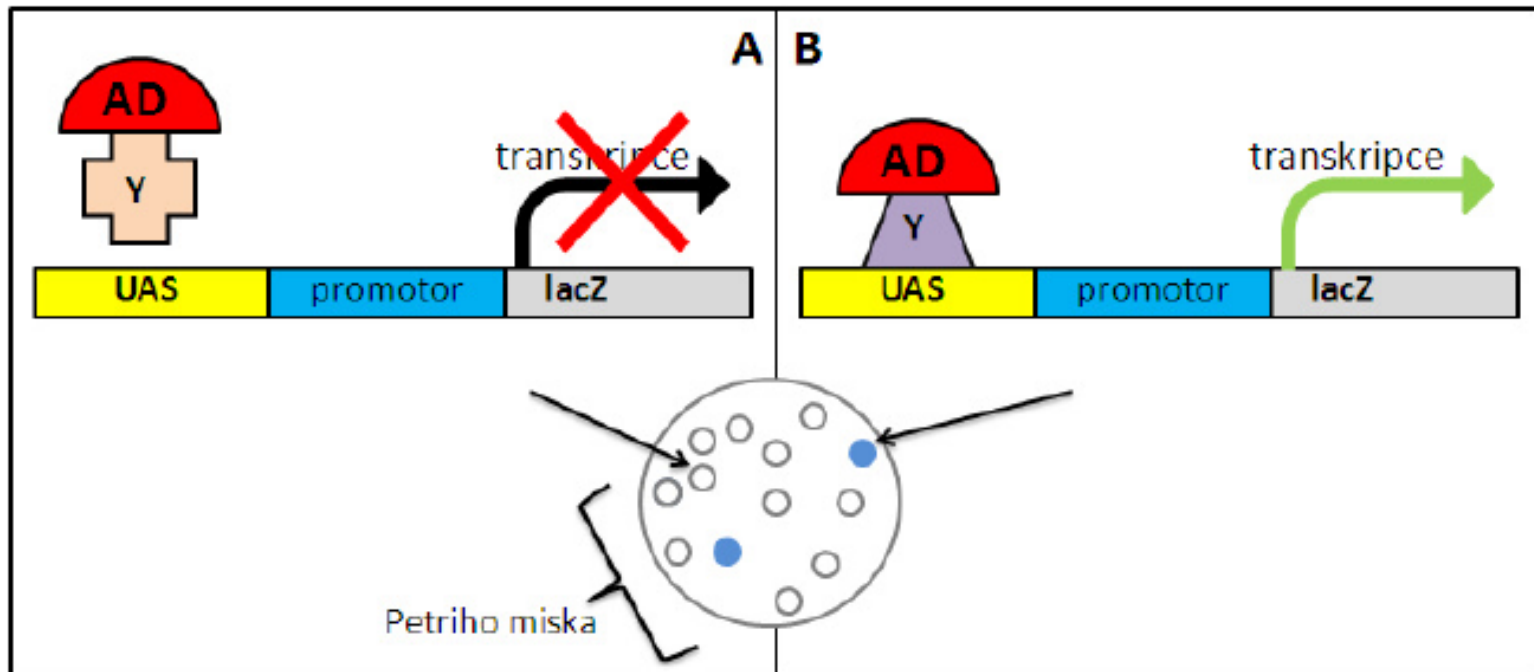


GAL4



DNA BINDING
 DIMERIZATION (DNA-INDEPENDENT)
 TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION

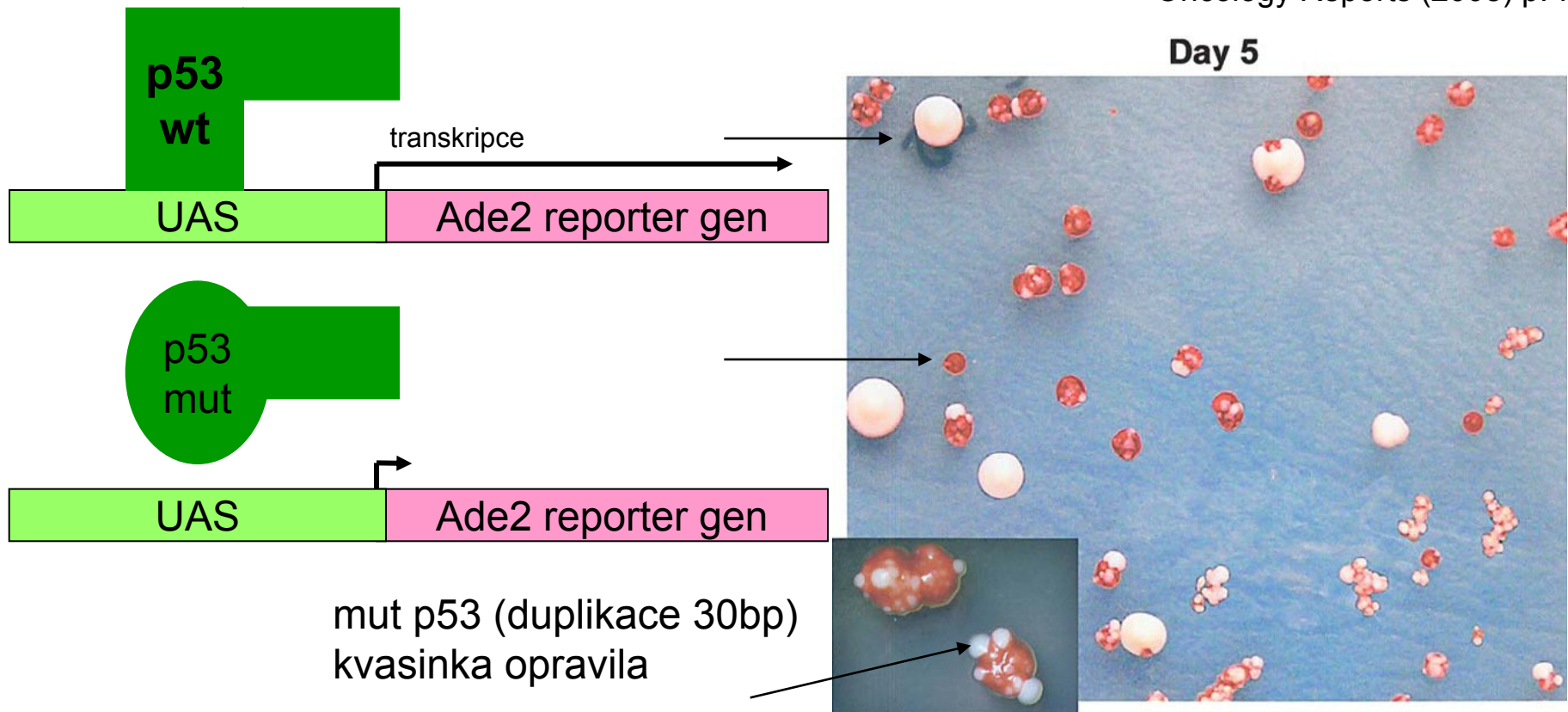
Vznik 1-hybridních systémů



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

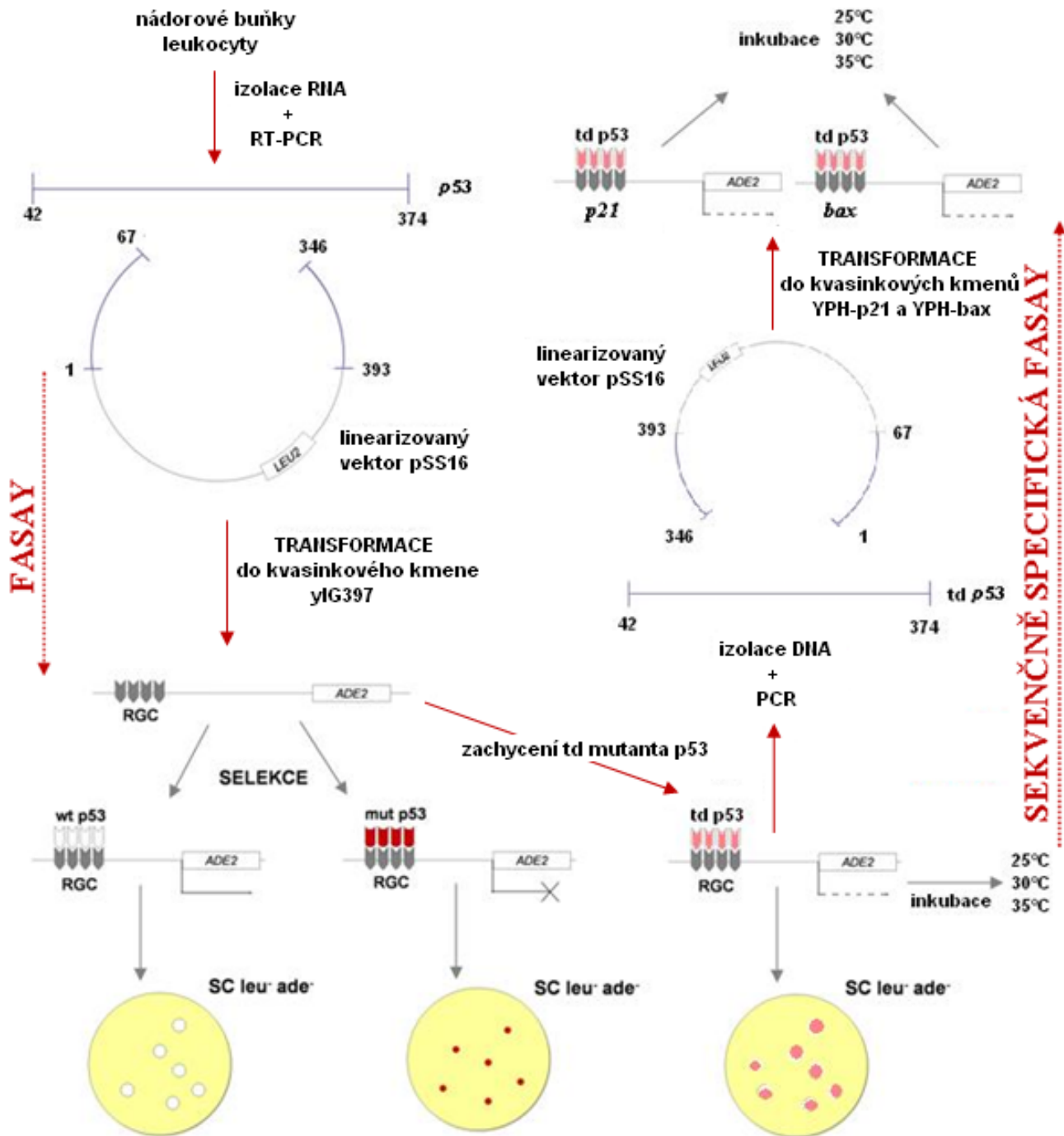
Lze hledat DNA-vazebné proteiny pro danou UAS sekvenci (AD-hybridní knihovny)

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



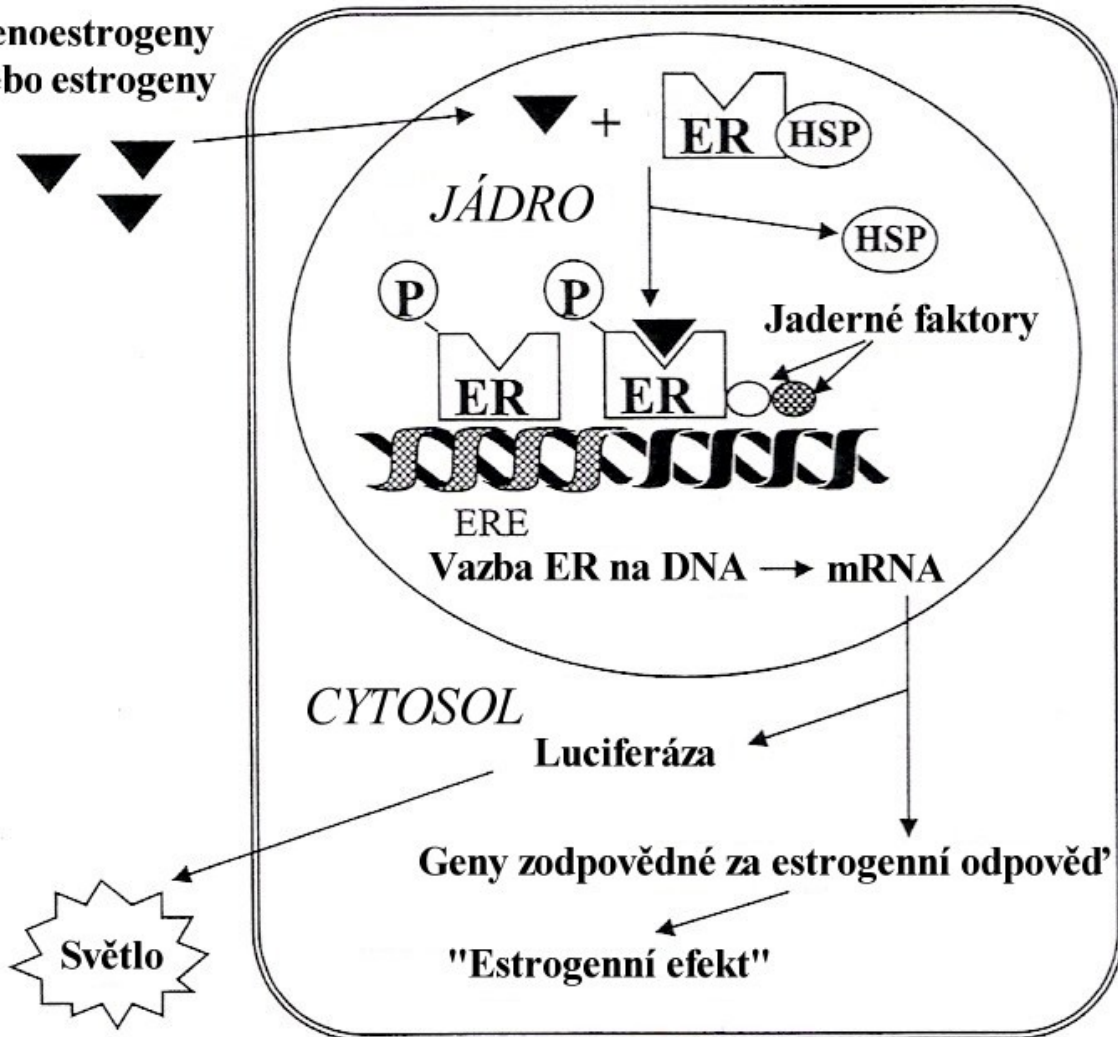
Analýza funkčních vlastností p53

- stanovení aberací p53 v klinickém materiálu - imunoanalýza, FISH, sekvenace *TP53*
- 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

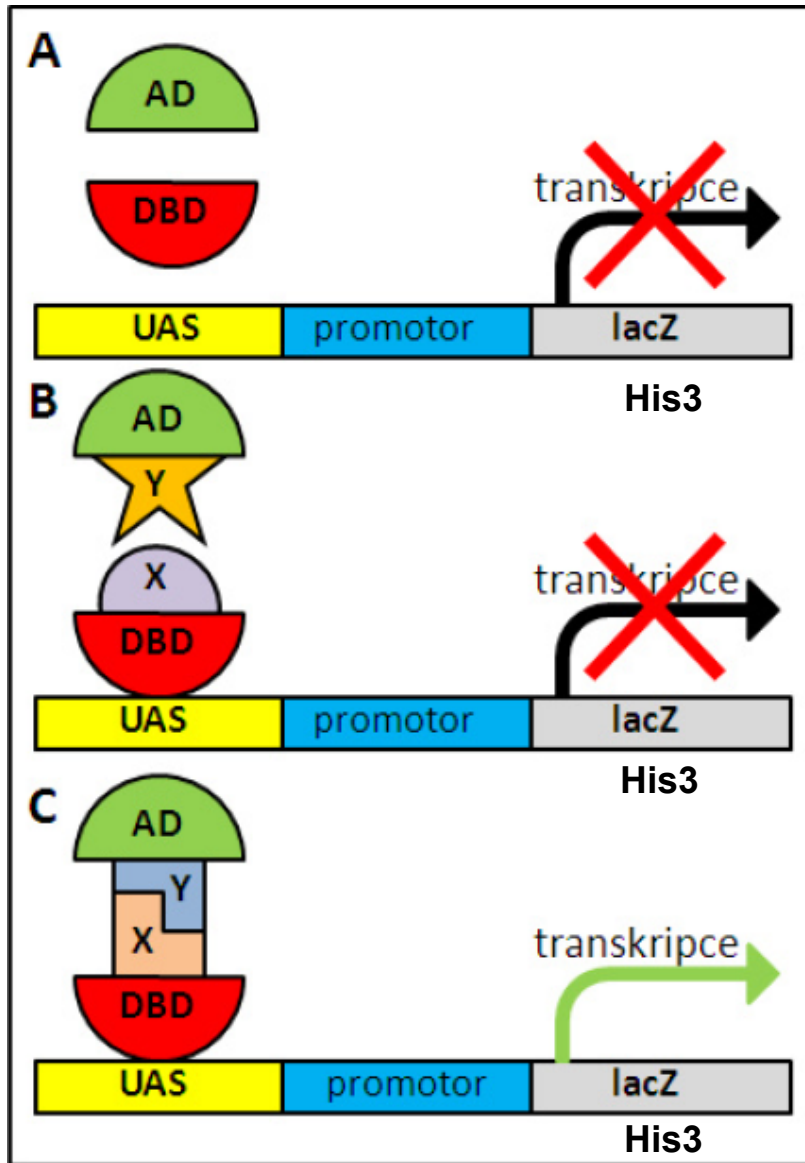


D-luciferin + O₂

luciferáza

oxyluciferin + světlo

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)	

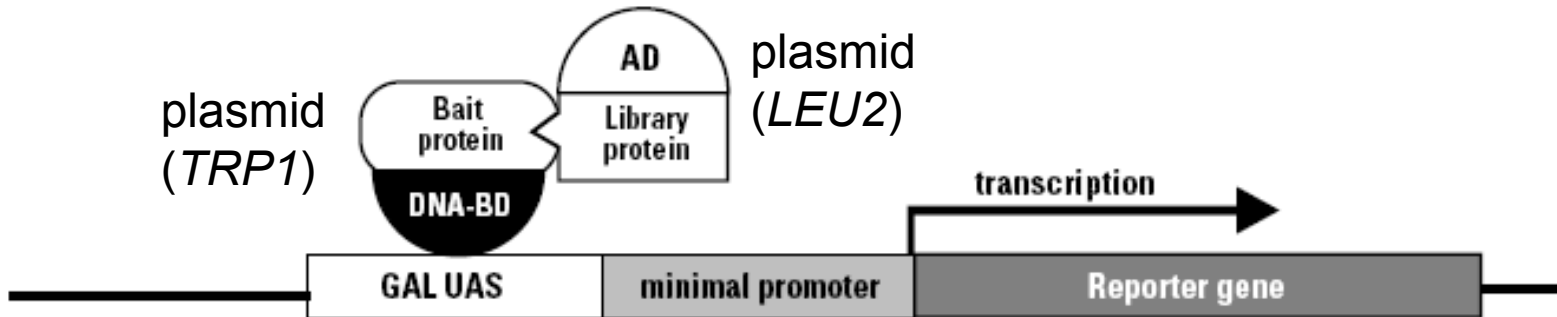
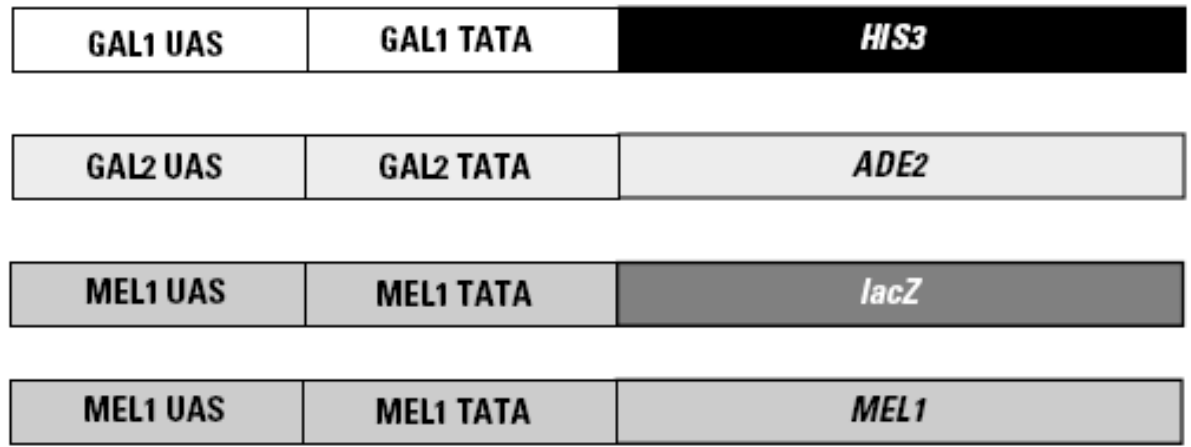


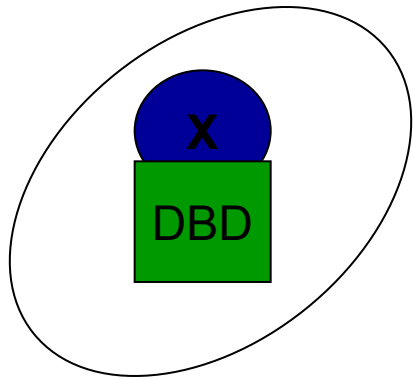
Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

AH109

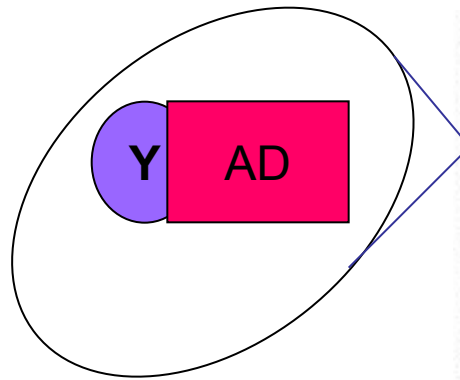
MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ



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

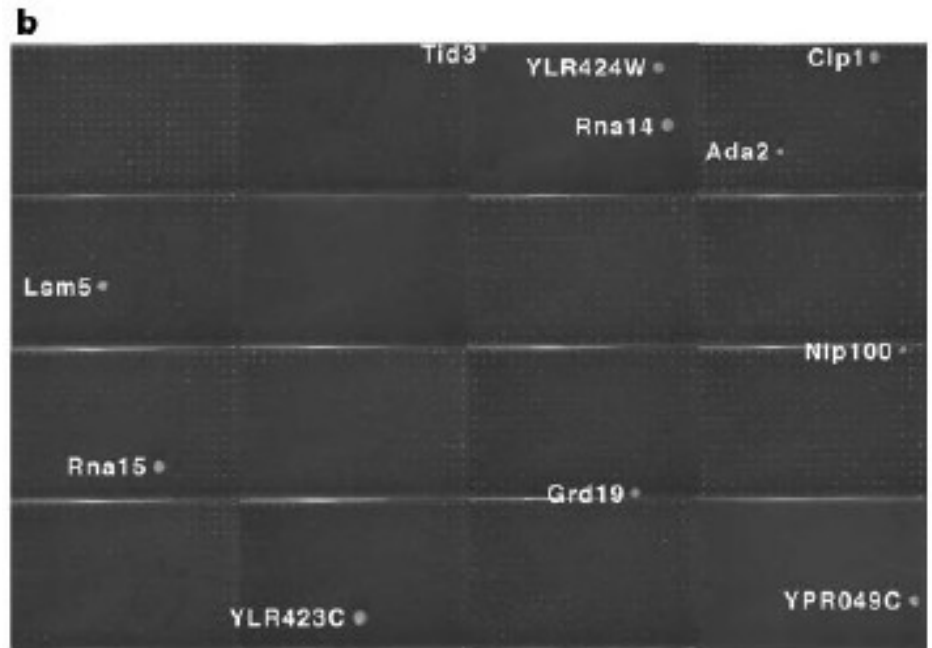
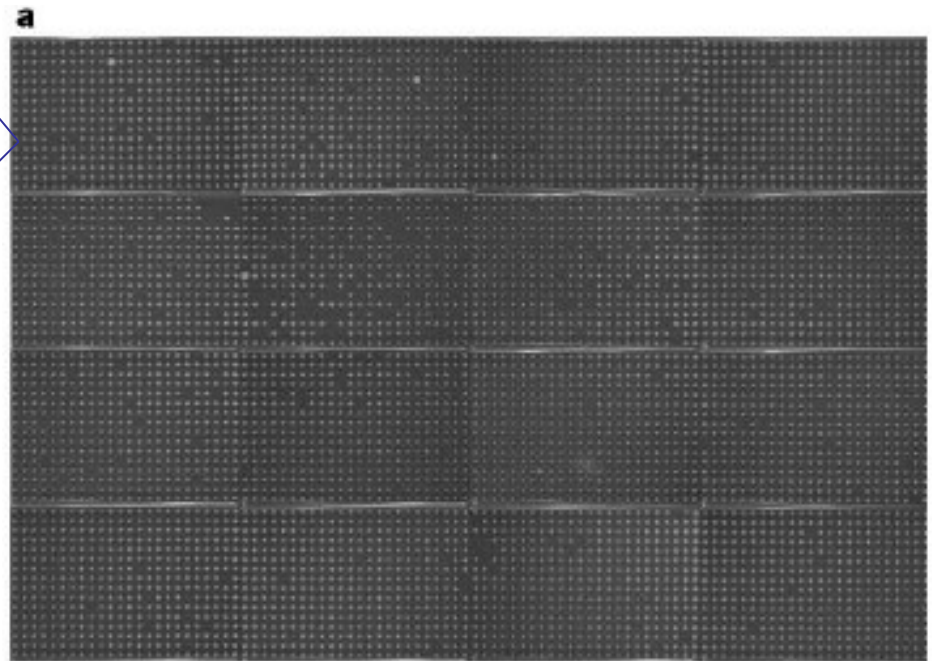


Mat α buňky

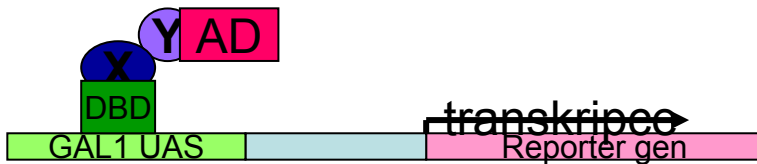


Mat a buňky

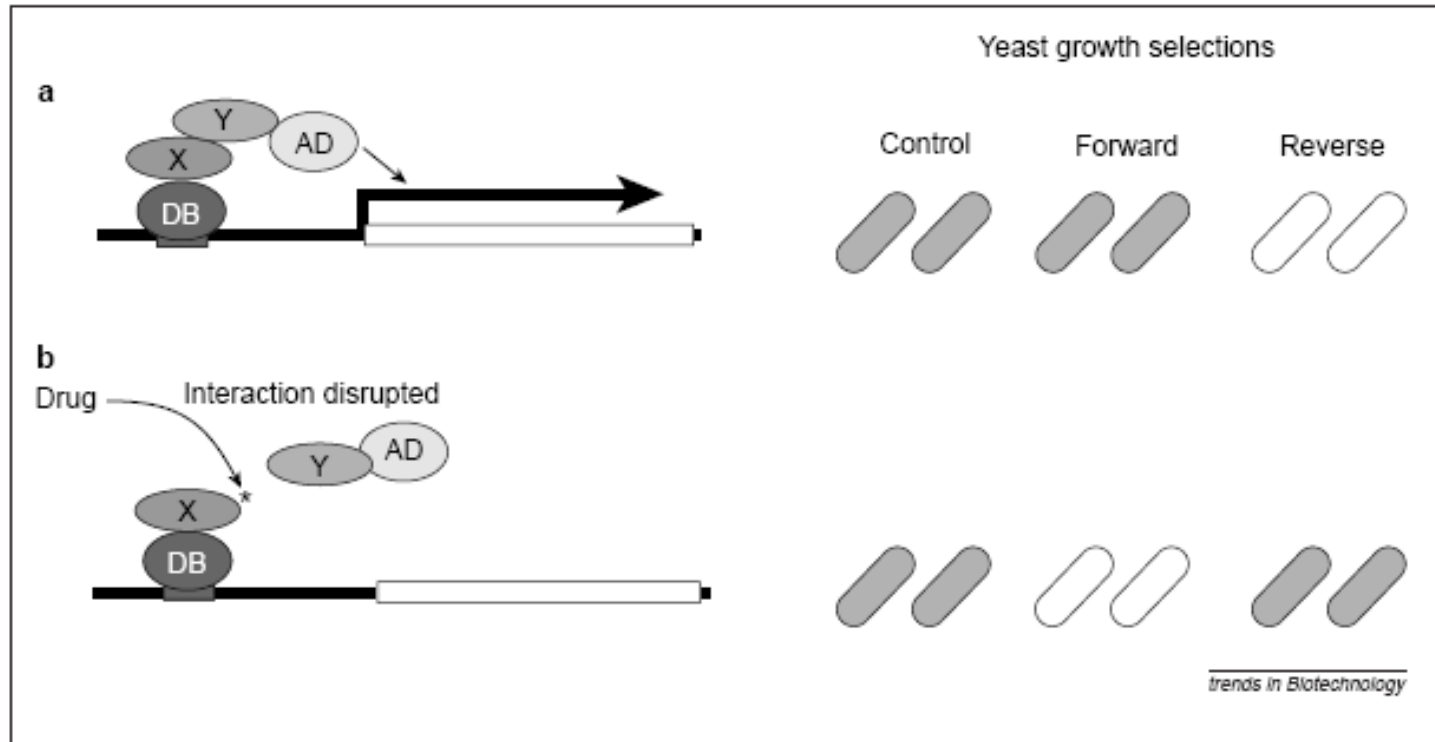
8x12 jamek
(96 na misku)
Všechny ORF



Kvasinkový „INTERACTOME“



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

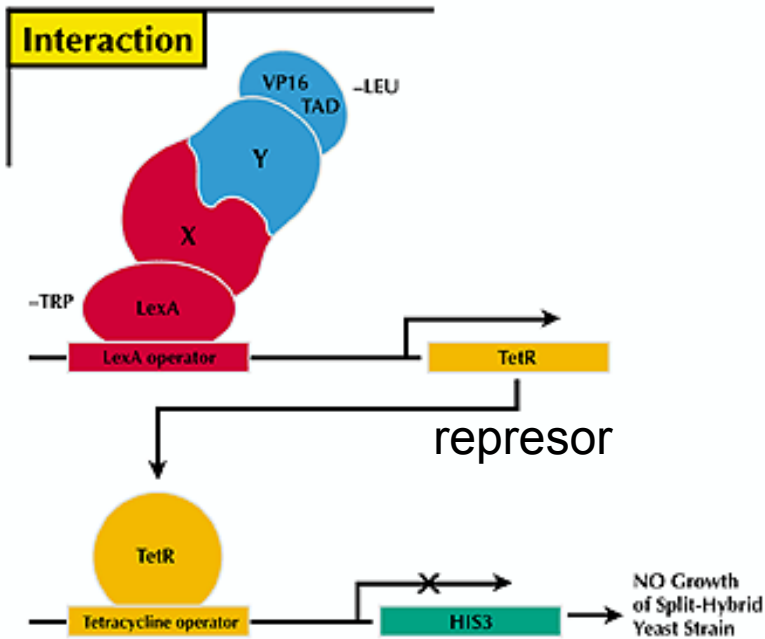


Fig. 1
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells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

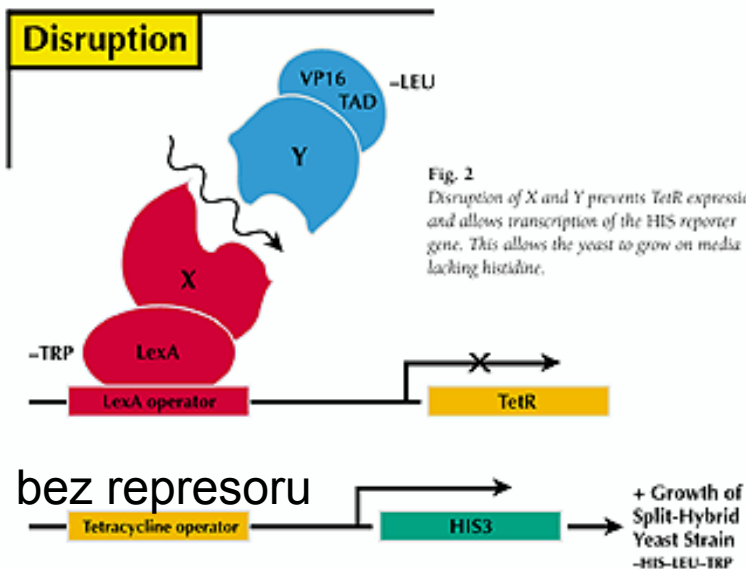


Fig. 2
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.



PCR mutagenesis

Mutated library

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

-5,000 Growth(+)

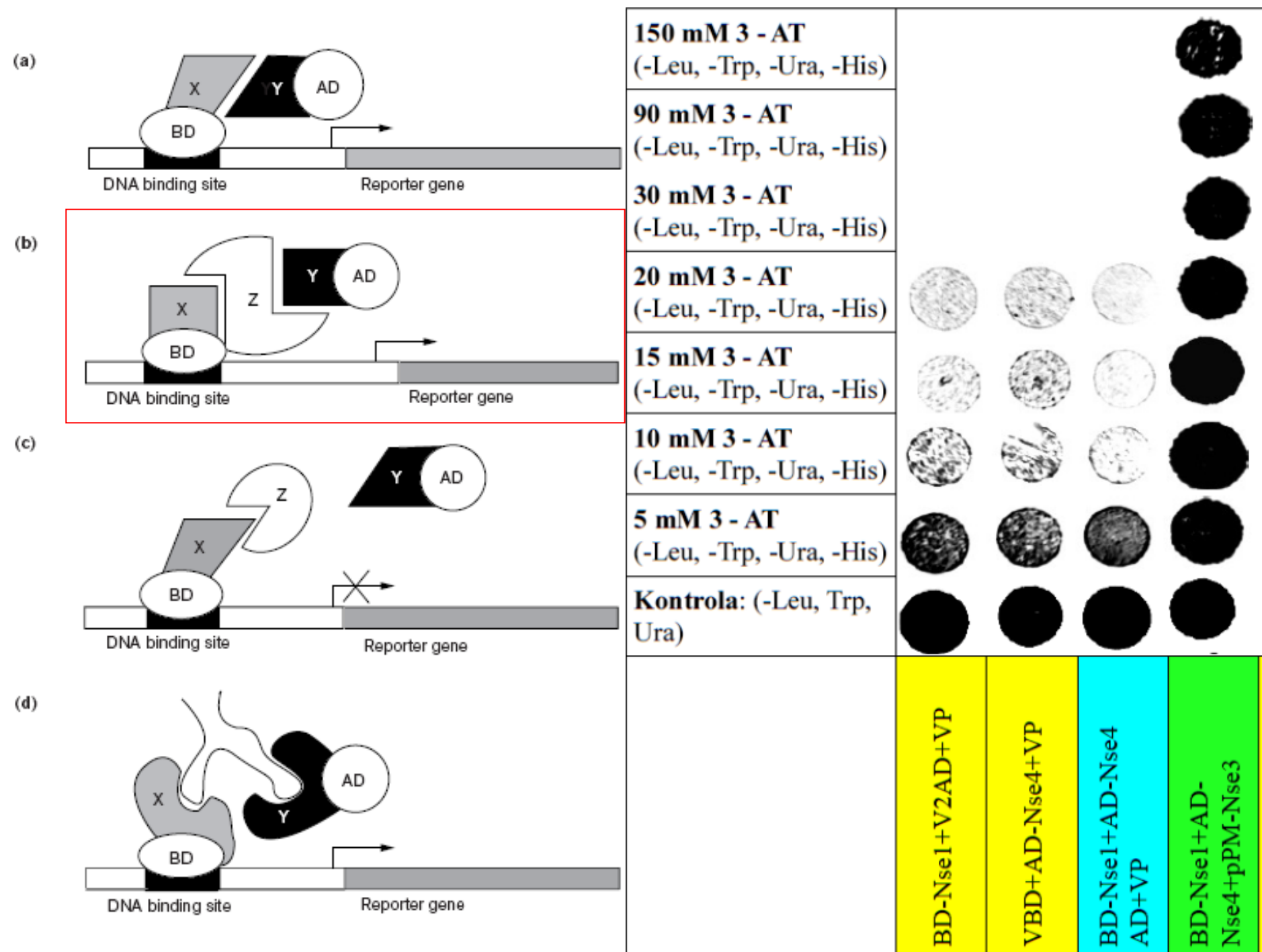
PNAS (1996) p. 13896

536 X-gal(+)

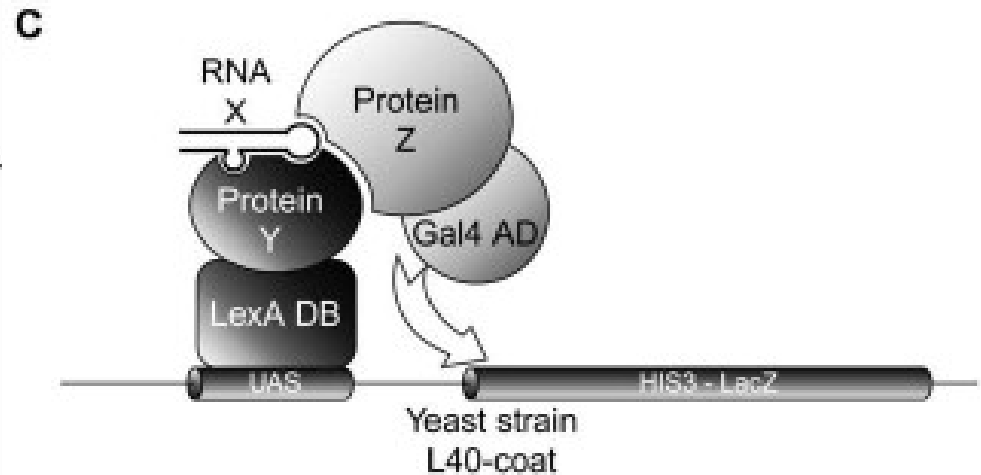
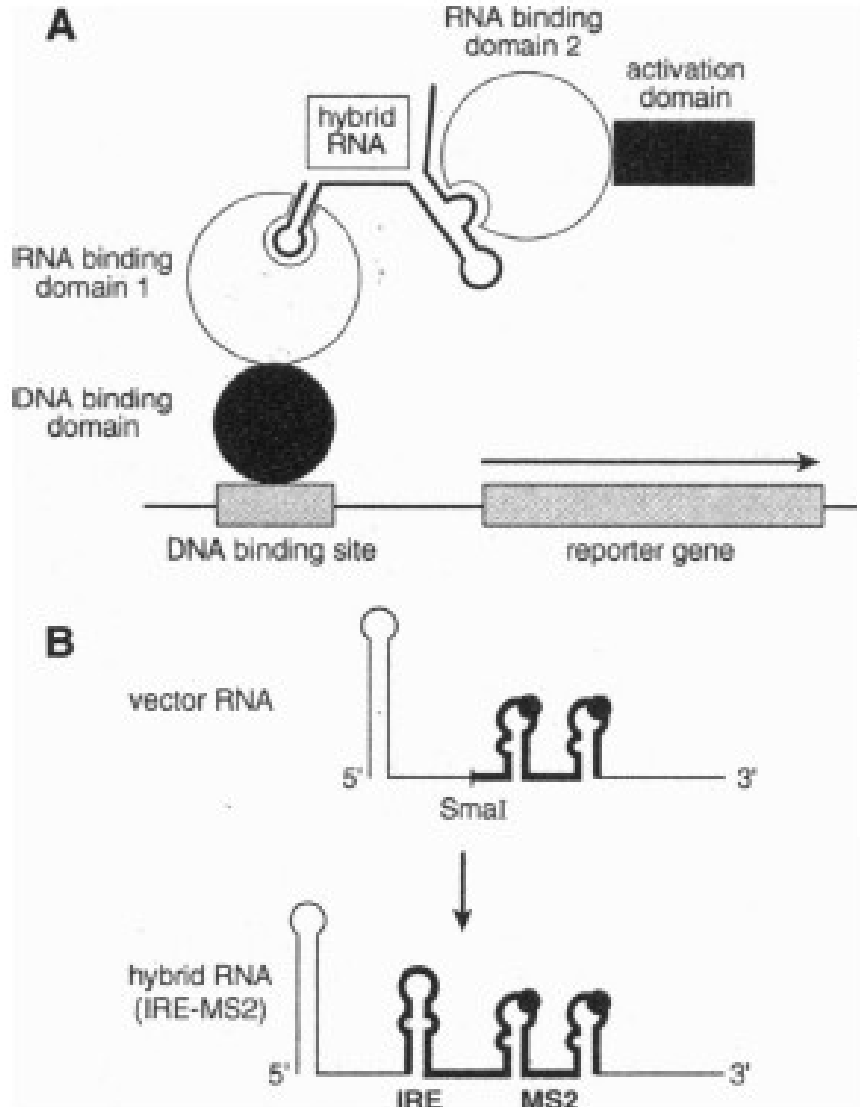
193 mutant DNAs were isolated and re-screened in the split-hybrid and two-hybrid strains

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

70 mutants contained single amino acid mutations



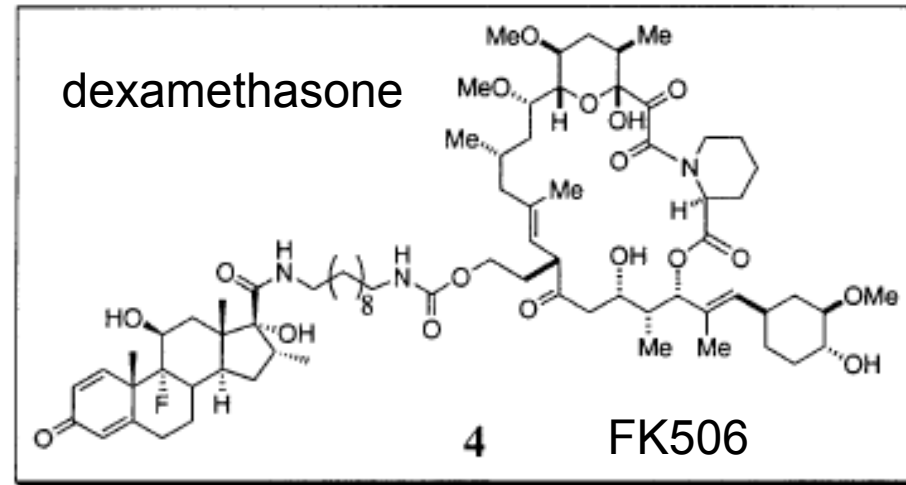
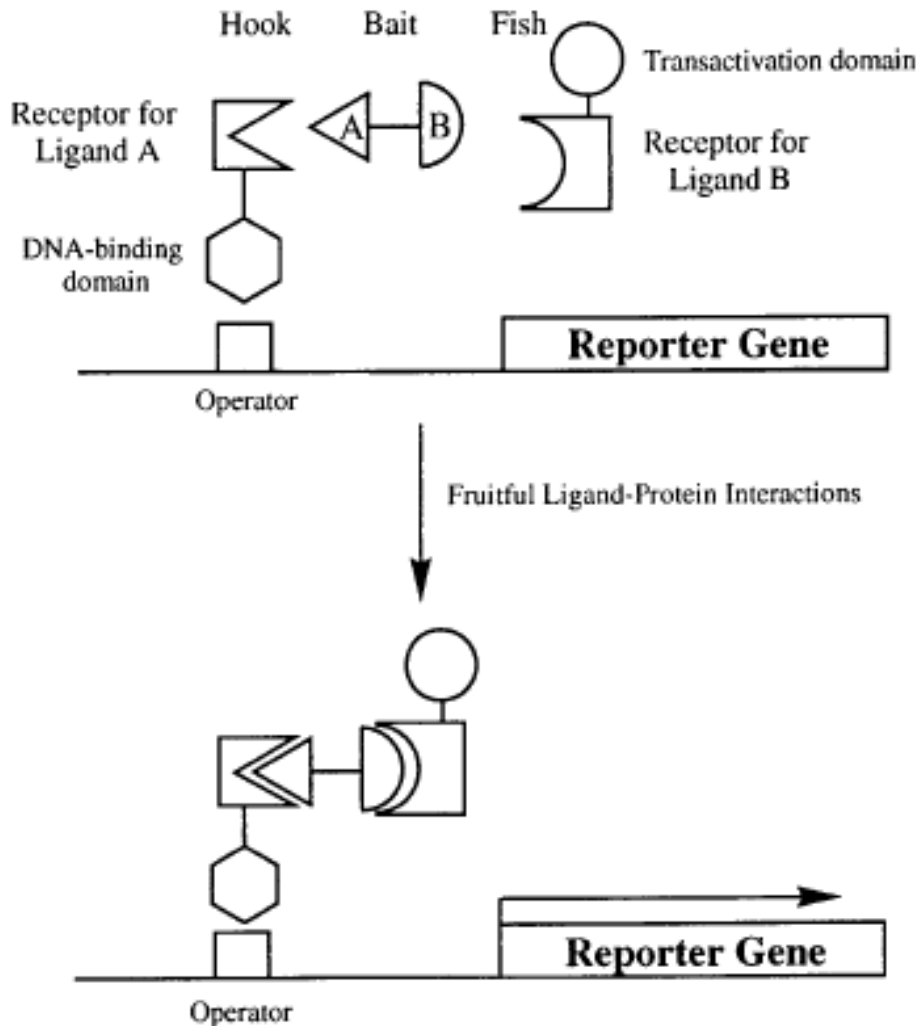
Analýza vazby protein-RNA (Y3H)



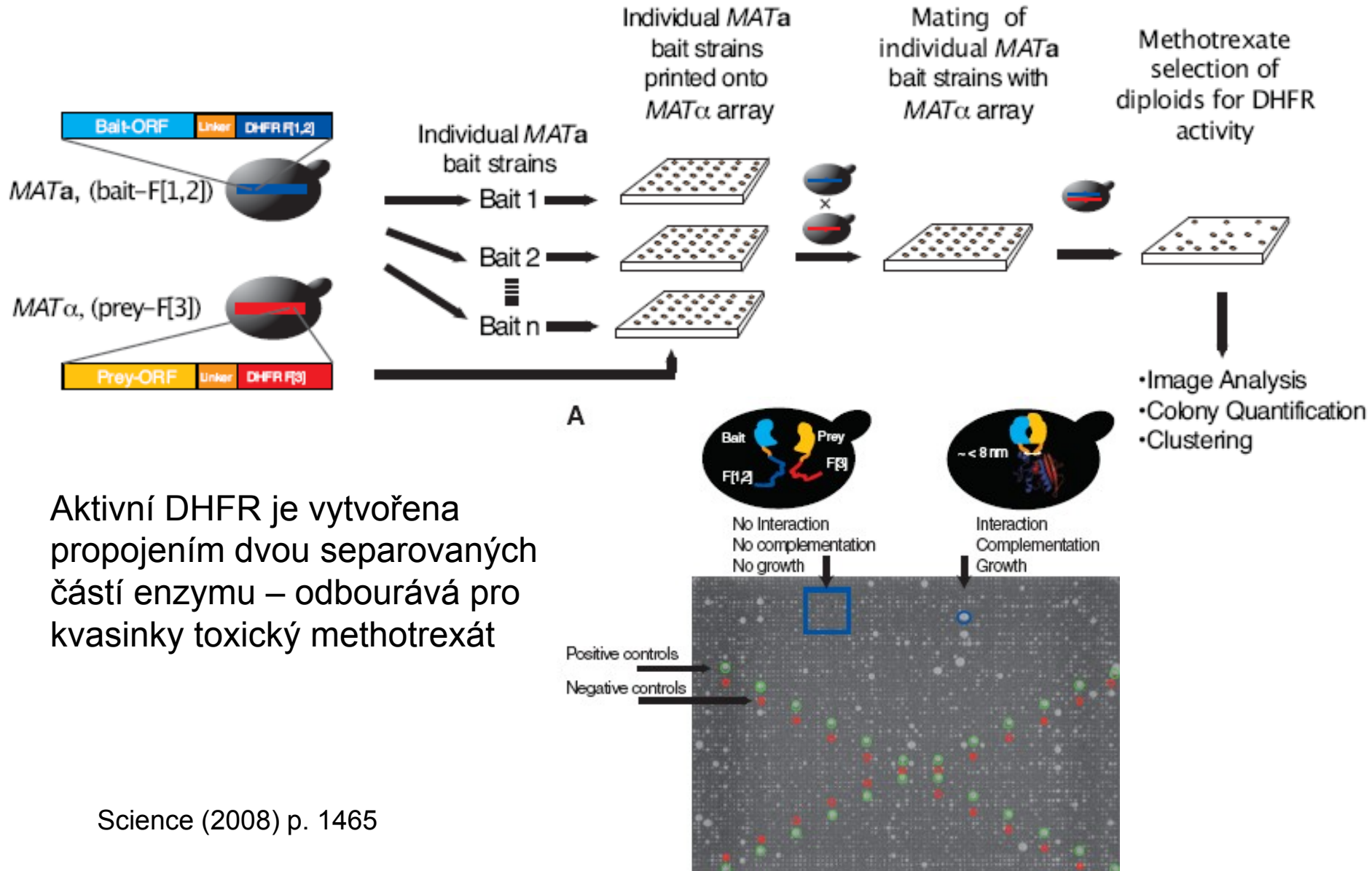
FEBS letters (2004) p. 7

Vazba ligand-receptor (Y3H)

glucocorticoid receptor - FKBP12



Dihydrofolát reduktáza/methotrexát



Aktivní DHFR je vytvořena propojením dvou separovaných částí enzymu – odbourává pro kvasinky toxický methotrexát

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

