

Cvičení: 14. a 18.12., A7 (2.17) - plázeň, psací a kreslicí potřeby

## Souhrn předchozích přednášek

### Genetické metody

- . mutagenese/screen
- . komplementace
- . identifikace

### Buněčný cyklus

- . Průběh a regulace BC
- . Synchronizace buněk
- . Mechanismy regulace párování - **transkripce**
- . Homothalické kmeny

# Osnova p ednázky

- “ Regulace transkripce
  - . Gal4 transkrip ní faktor
    - “ transkrip ní hybridní systémy
  - . alternativní kvasinkové systémy
    - “ hybridní . G-proteiny
    - “ komplementa ní . DHFR, ubikvitin










# Regulace transkripce v haploidních buňkách (konstitutivní)

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

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

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

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

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
-----		
a1, $\alpha$ 2 a1, a2	diploid	 aSG OFF  $\alpha$ SG OFF  haploid SG OFF
-----		

# Struktura promotor

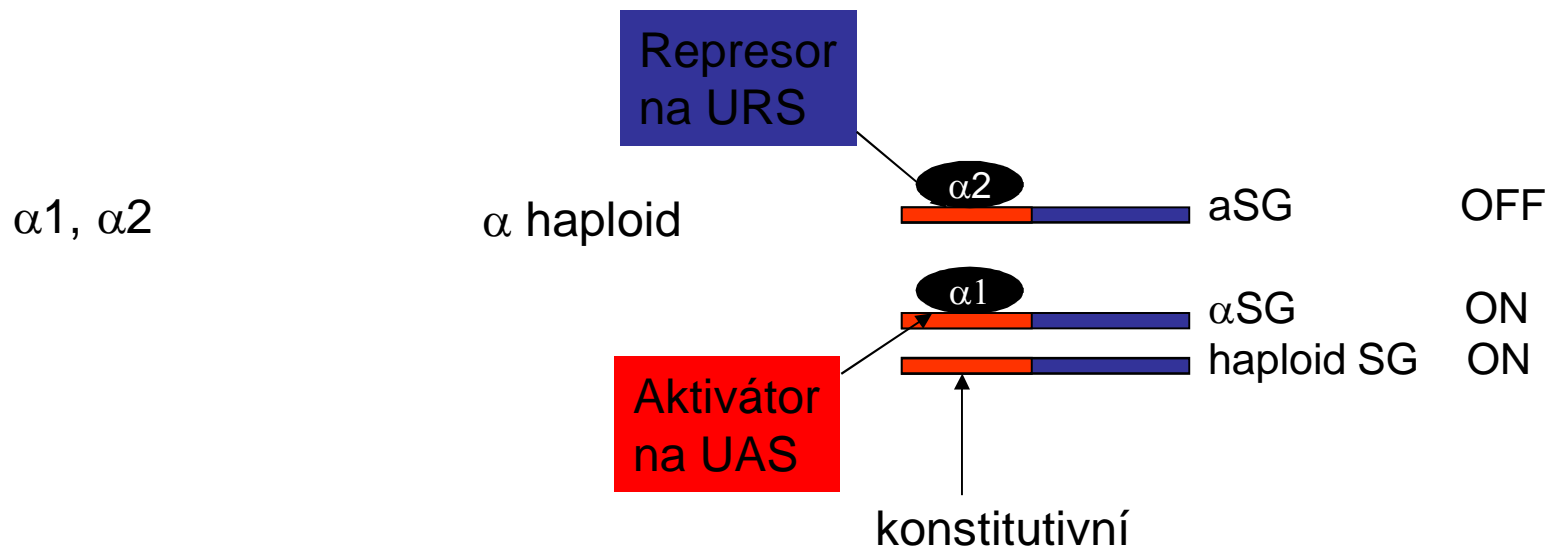
Kvasinkové promotory se liší od bakteriálních a vyzdích eukaryot (kvasinky netranskribují z takových promotorů. kvasinkové plasmidy o )

- 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)

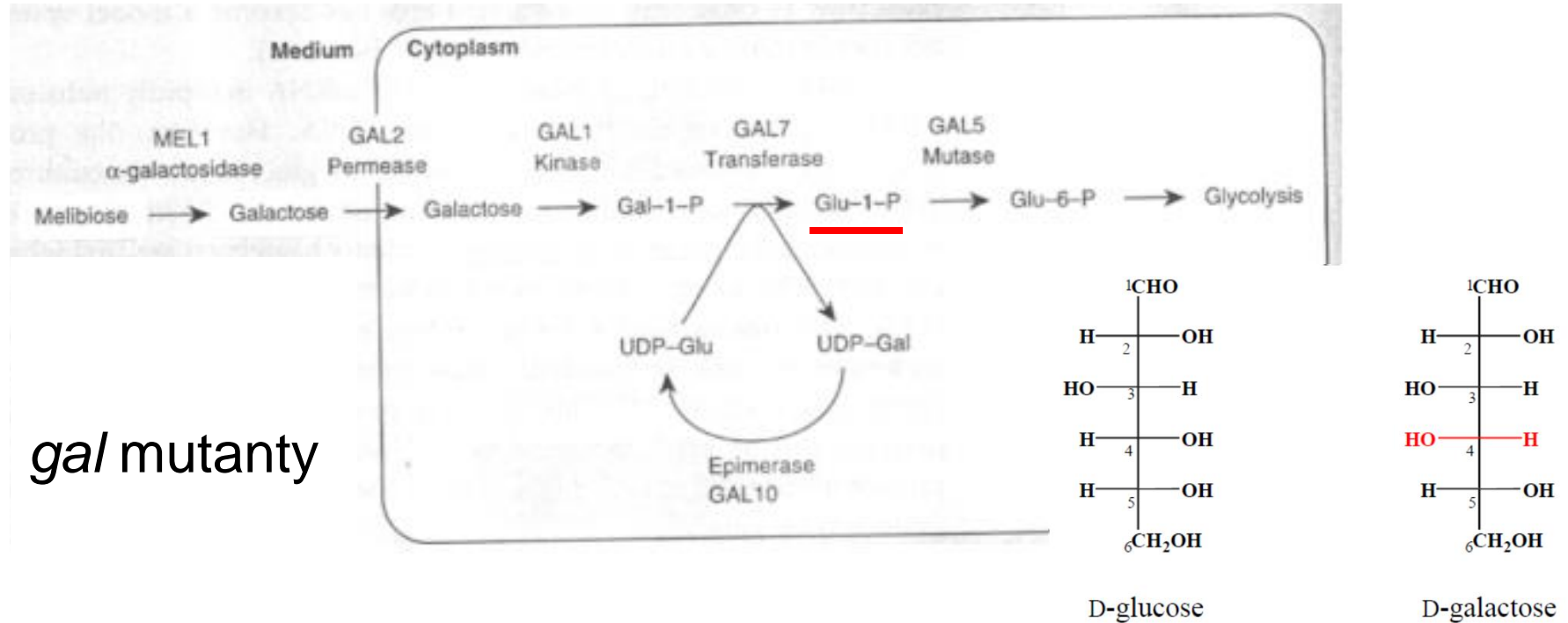
- UAS (upstream activating sequences) a URS (upstream repressing sequences)

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



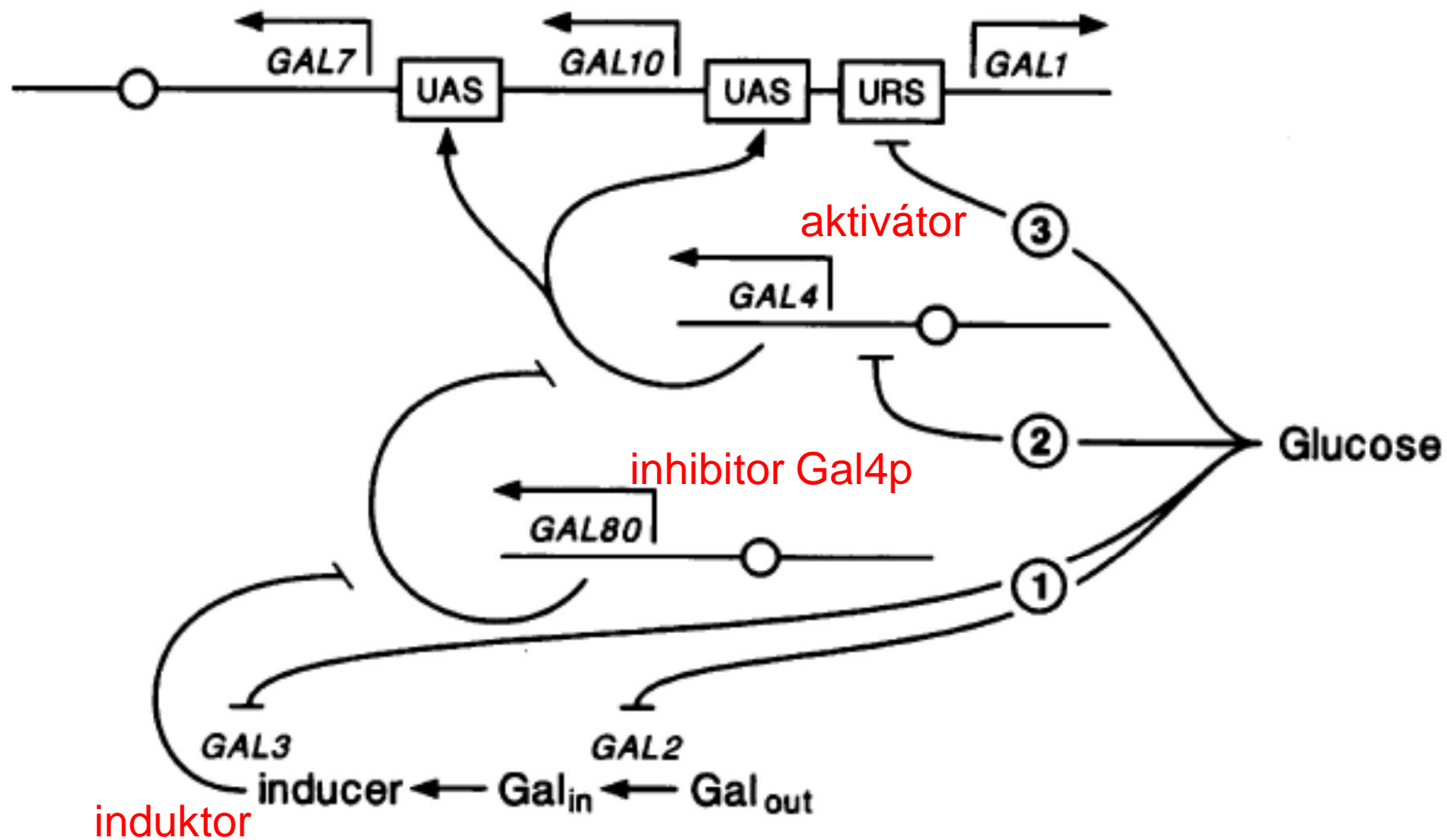
# Regulace metabolické dráhy galaktózy

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

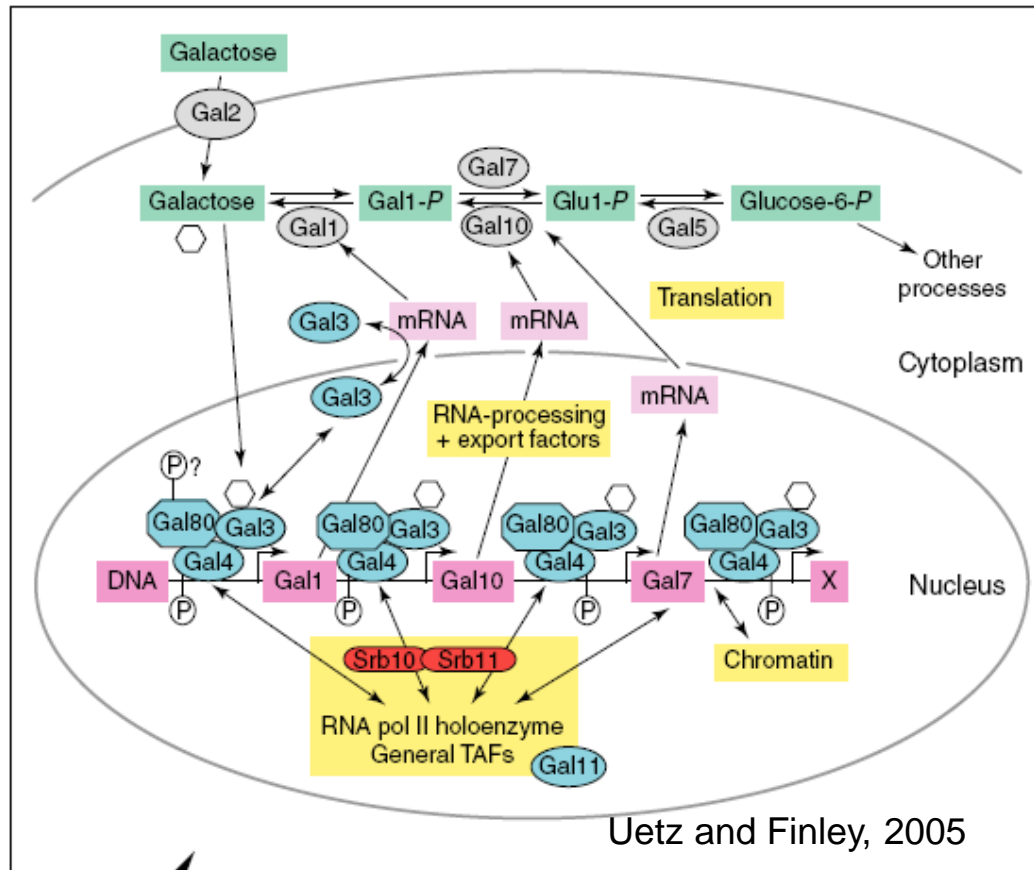


- Pouze *GAL5* gen je konstitutivně exprimován (potřebný pro metabolismus glukózy)
- všechny ostatní jsou indukovány růstem na galaktóze a reprimovány glukózou
- *GAL1*, *GAL7* a *GAL10* geny jsou v klastru na chromosomu 2
- ***GAL4*** gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS těchto genů

# Regulace transkripce *GAL* gen



- glukosa reprimuje transkripci *GAL* gen na r zných úrovních
  - URS v promotorech *GAL1* genu
  - reprimuje transkripci *GAL4* transkrip ního aktivátoru
  - reprimuje *GAL3* induktor

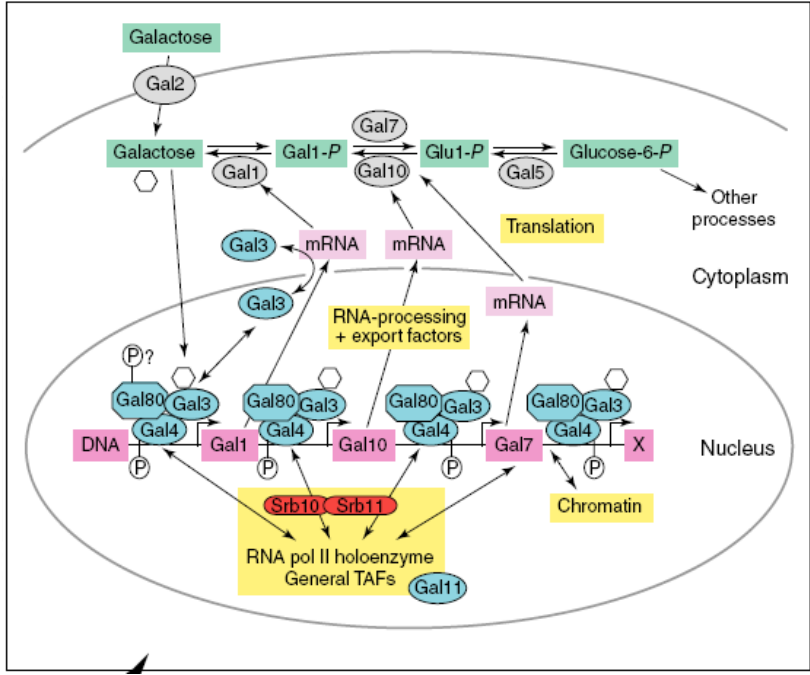
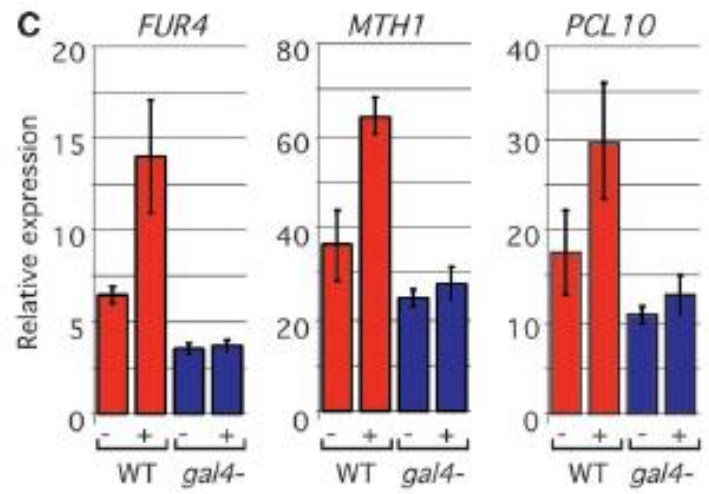
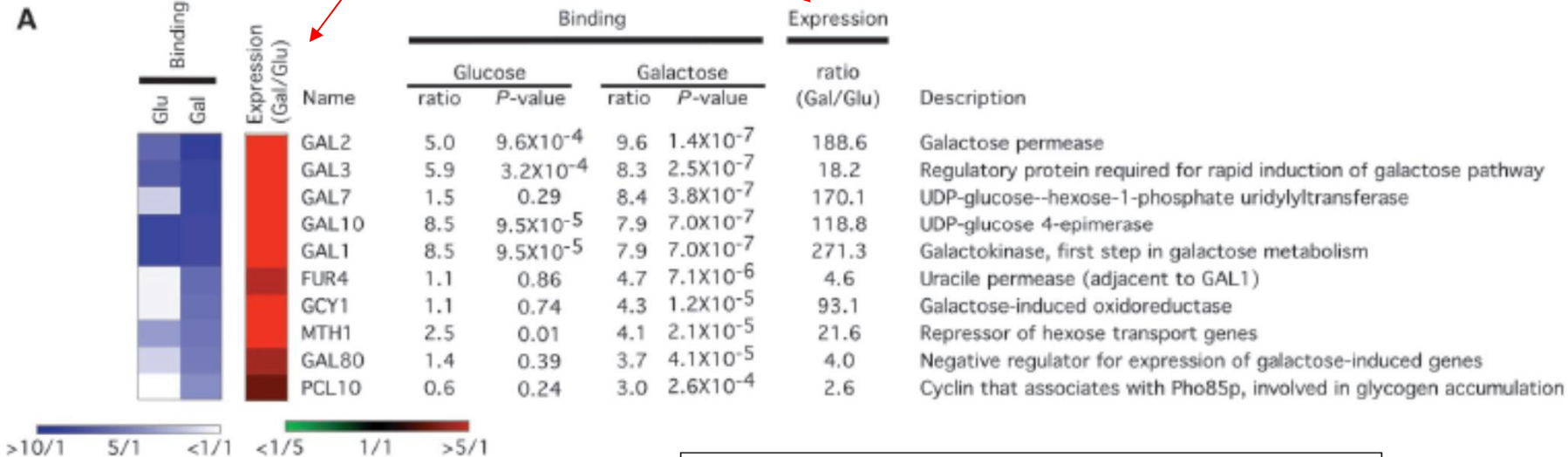


# Regulace transkripce *GAL* gen

- *GAL1*, *GAL7* a *GAL10* geny jsou v klastru na chromosomu 2
- *GAL4* gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS tohoto gen
- Gal80p se váže na Gal4p a reprimuje/inhibuje transkripci
- Gal3p přemění galaktozu na induktor (váže se na Gal80p a blokuje vazbu na Gal4p)
- *GAL1* promotor je rychle indukovaný a velmi silný . 1000x se zvýší mRNA (až 1%)
- používá se pro overexpresi/nadprodukce protein
- nesmí být přítomna glukosa !

ChIP Gal4p

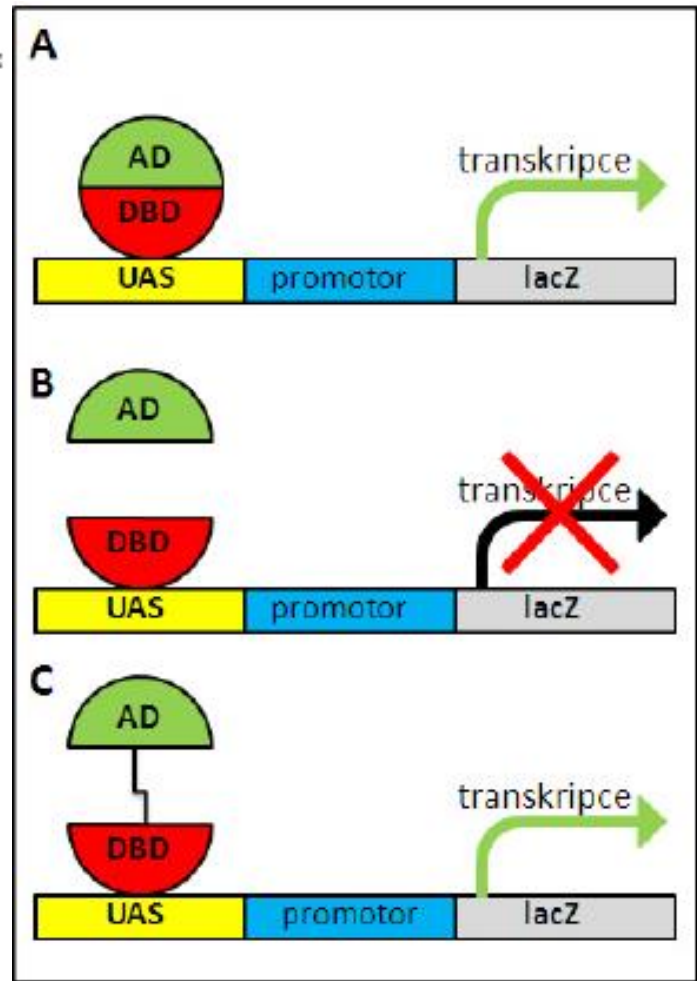
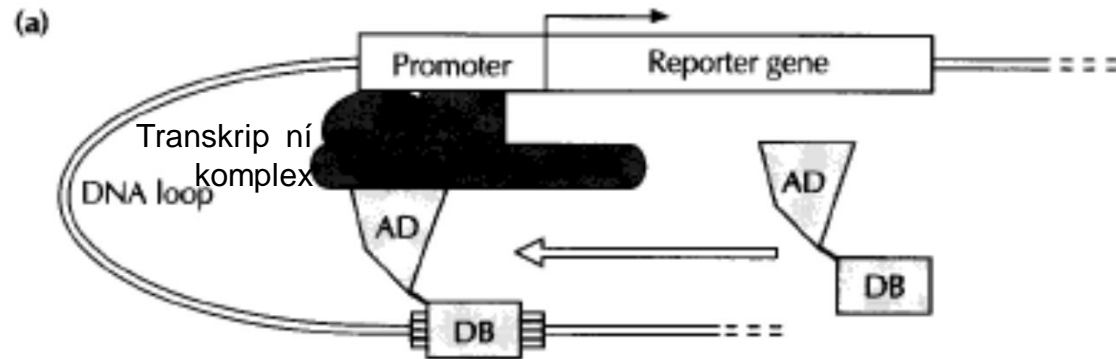
microarray po galaktose



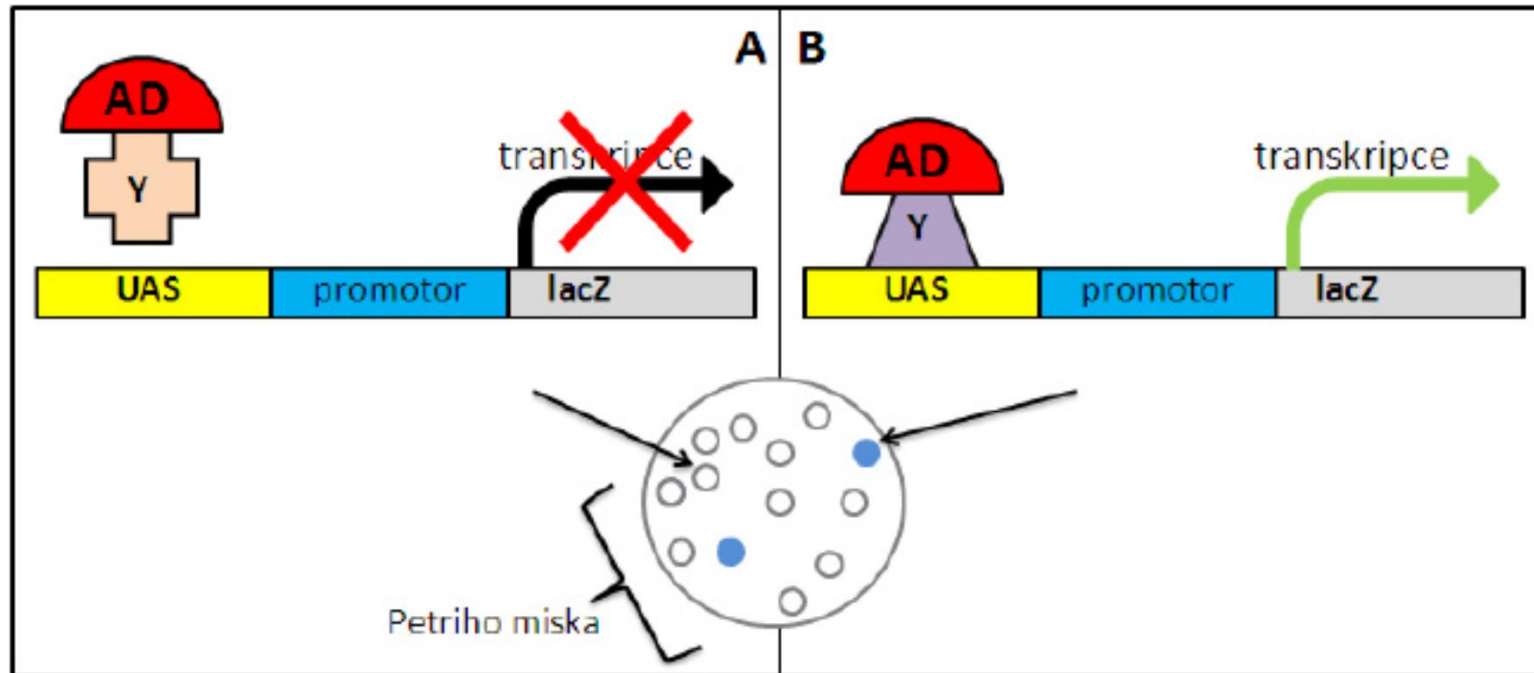
Ren et al., Science, 2000



# Transkrip ní aktivátor Gal4p



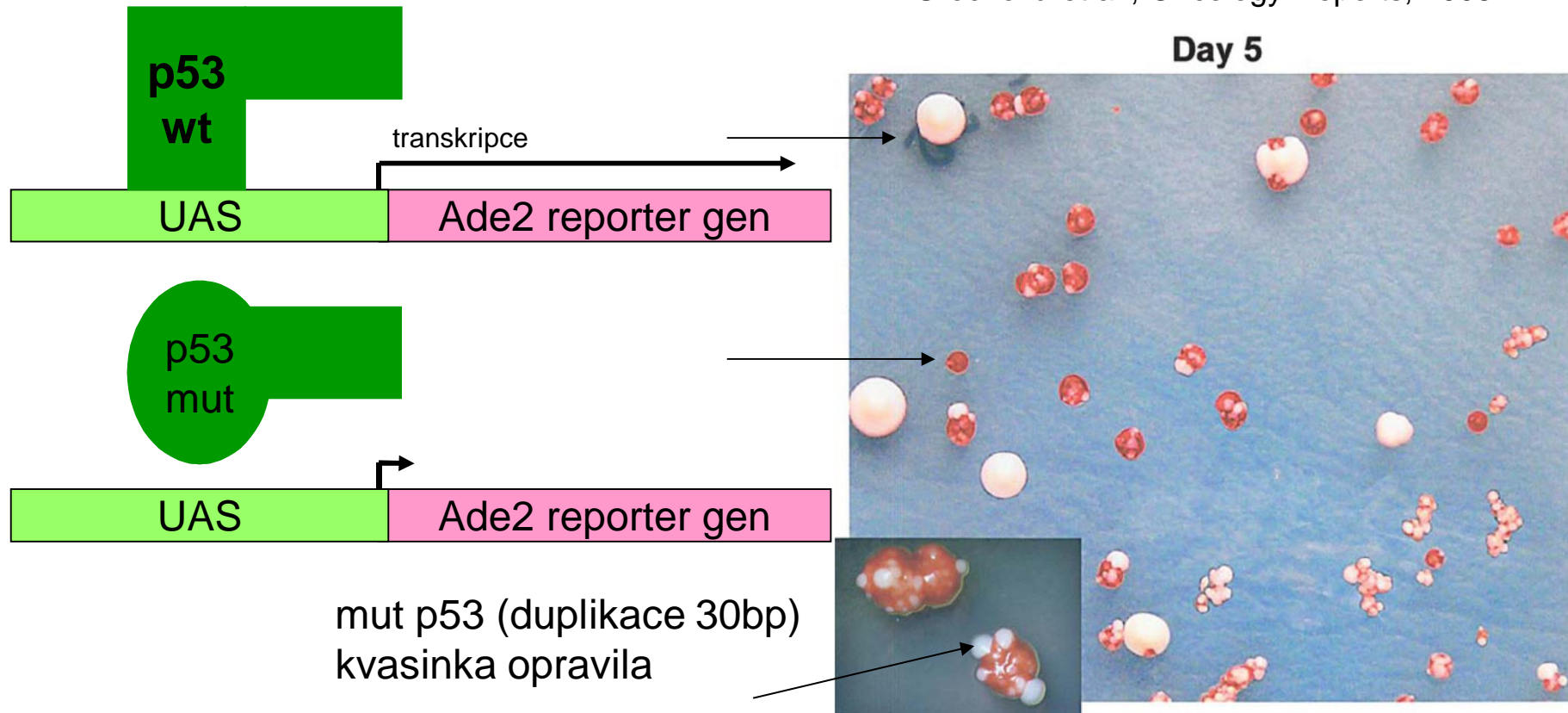
# Vznik 1-hybridních systémů



Různé transkripční faktory mají podobné domény a lze je kombinovat

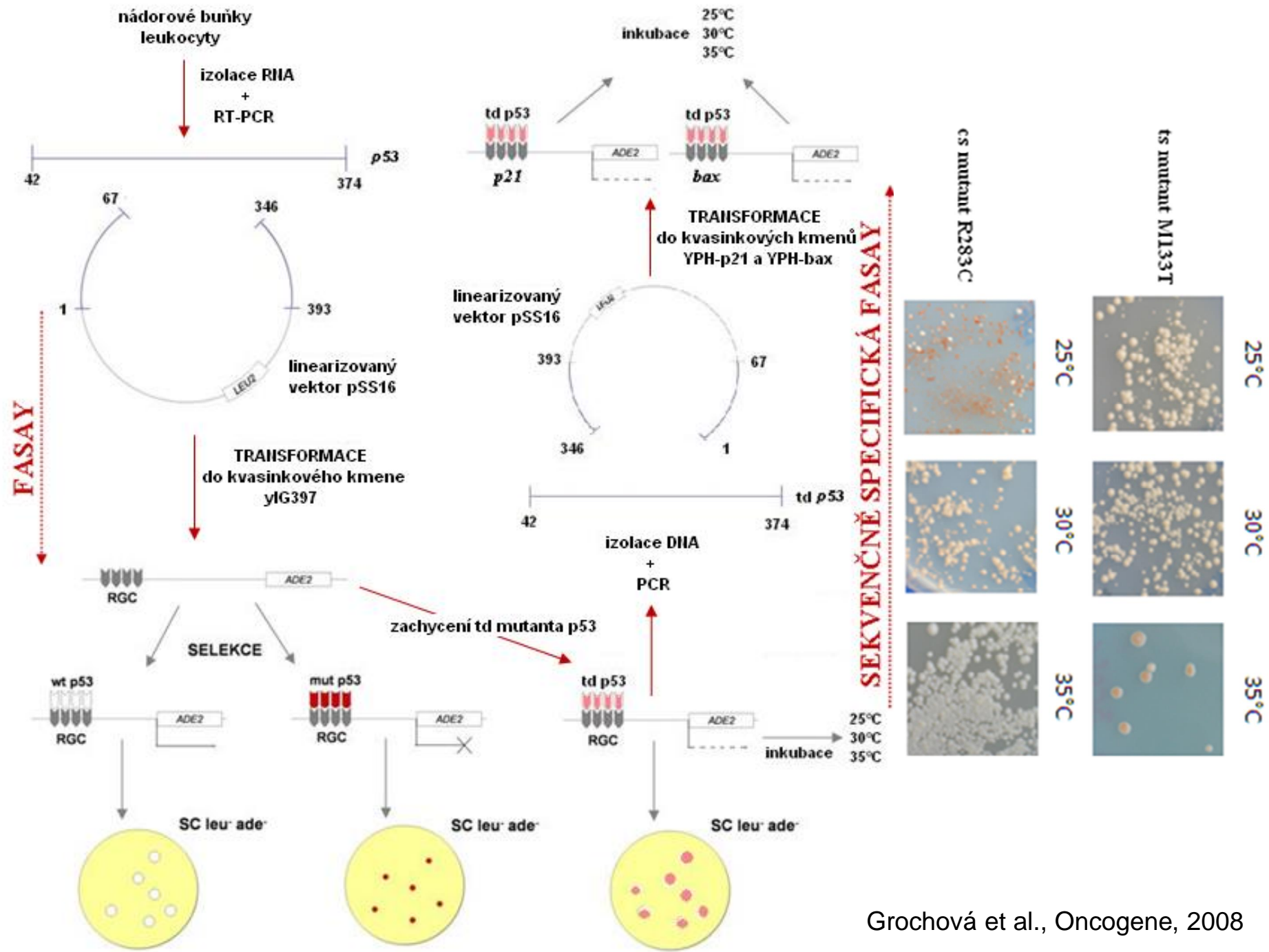
Lze hledat DNA-vazebné proteiny pro danou UAS sekvenci (AD-hybridní knihovny)

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



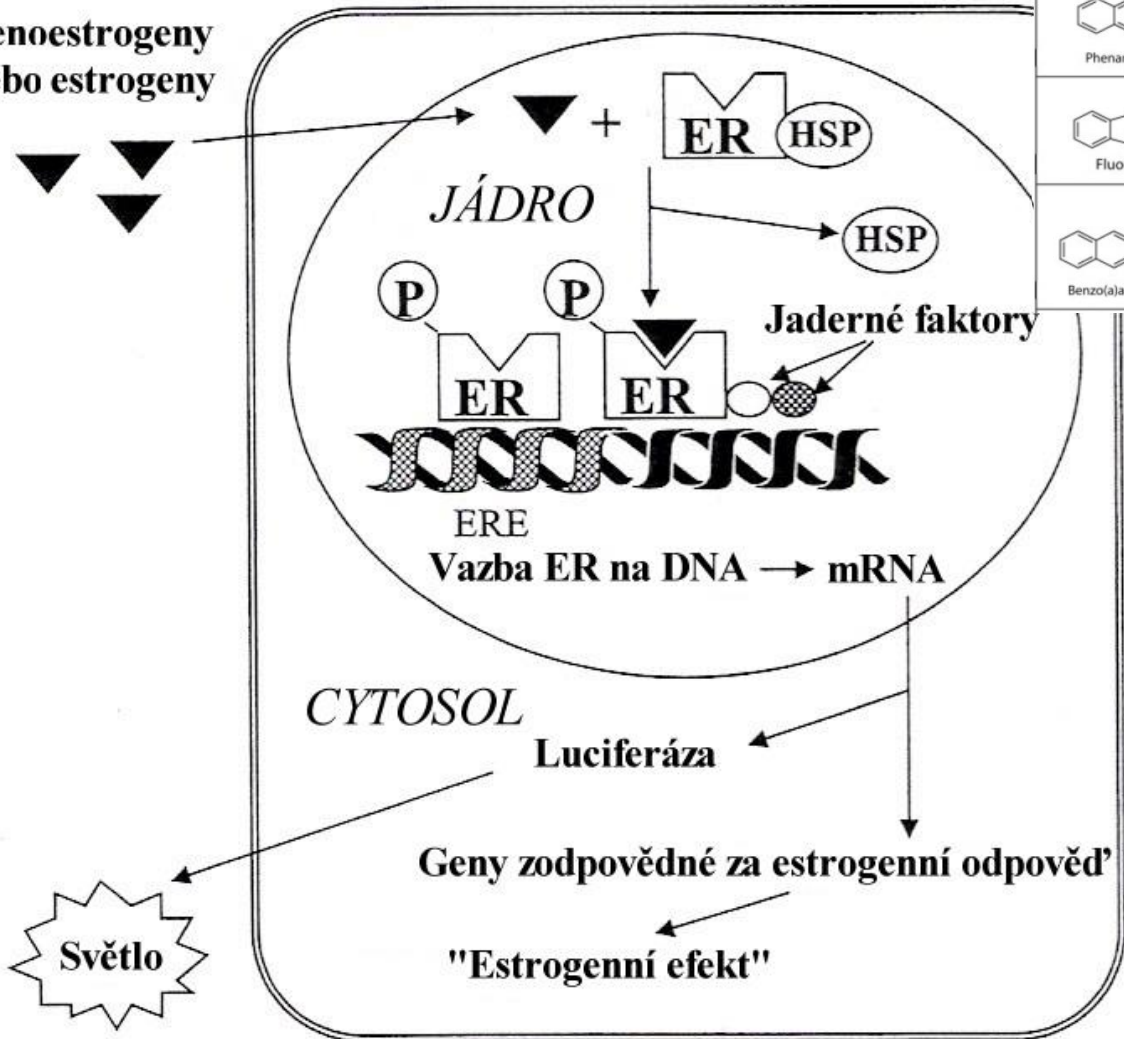
### Analýza funkčních vlastností p53

- stanovení aberací p53 v klinickém materiálu - imunoanalýza, FISH, sekvenace *TP53*
- ur ení funk ního statutu - stanovení transaktiva ích schopností p53 metodou **FASAY (functional analysis of separated alleles in yeast)** - stanovení transaktiva ních vlastností p53 prost ednictvím speciáln upraveného kvasinkového kmene *Saccharomyces cerevisiae* yIG397



# Toxikologické aplikace

Xenoestrogeny  
nebo estrogeny



<chem>c1ccc2ccccc2c1</chem> Naphthalene	<chem>c1ccc2ncnc2c1</chem> Quinoline	<chem>Cc1ccc2ncnc2c1</chem> 6-methylquinoline	<chem>c1ccc2ncncc2c1</chem> Isoquinoline	<chem>c1ccc2ncncc2n1</chem> Quinazoline	<chem>c1ccc2ncncc2n1</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>c1ccc2c(c1)ccc3ccccc23</chem> Fluorene	<chem>c1ccc2c(c1)ccc3c2c[nH]3</chem> Carbazole				
<chem>c1ccc2cc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Benzo(a)anthracene	<chem>c1ccc2c(c1)ccc3c2c[nH]3</chem> Benzo(a)acridine	<chem>c1ccc2c(c1)ccc3c2c[nH]3</chem> Benzo(c)acridine			

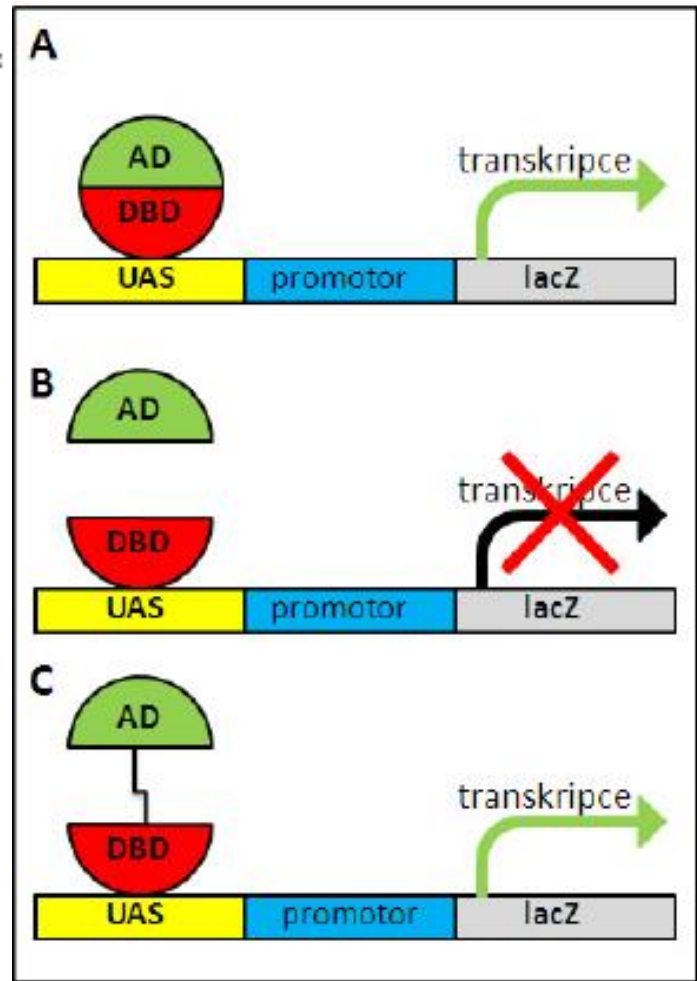
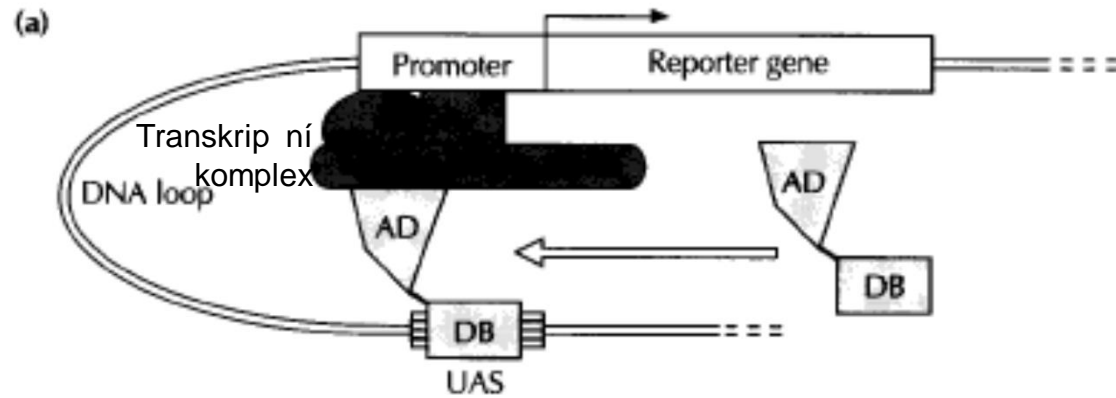
V tomto systému byly  
testovány různé polutanty .  
efekt na estrogenní dráhu

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

Bartos et al, Env Tox, 2006



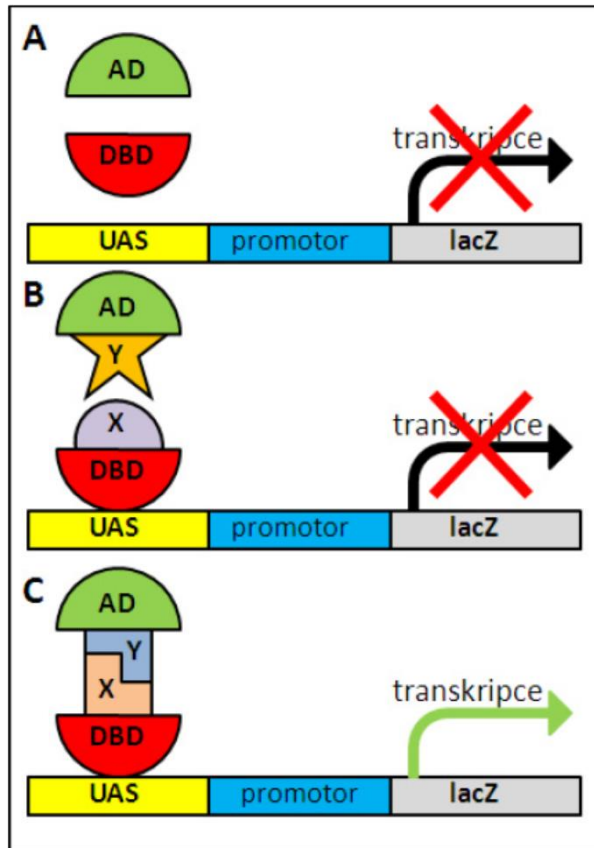
# Transkrip ní aktivátor Gal4p



**GAL4**



# BD a AD domény lze zamínit



## 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

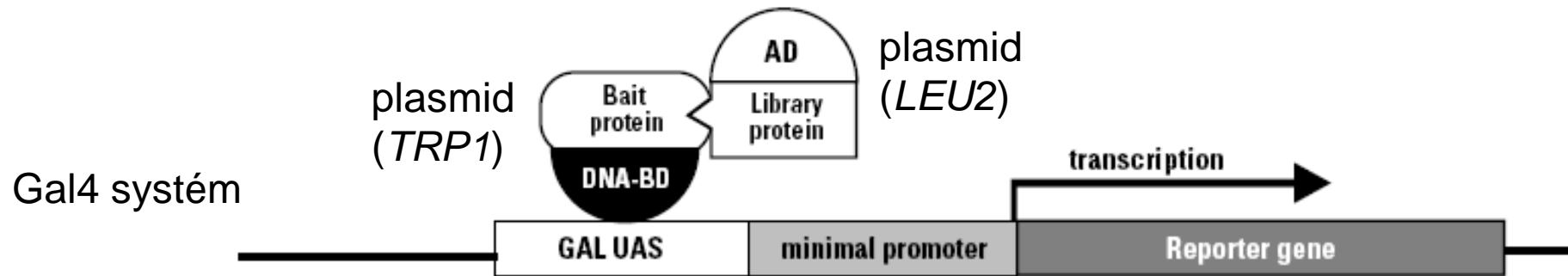


Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

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*

Nejast ji používáný kmen PJ69-4a

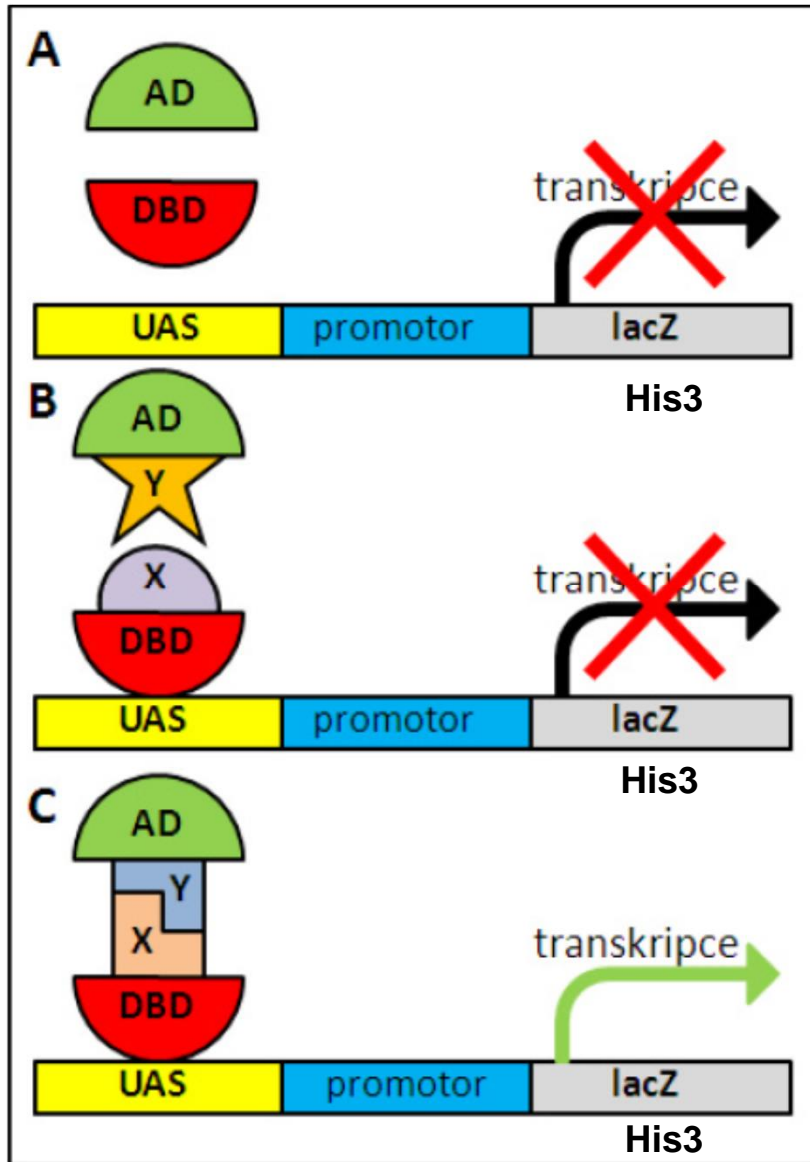
## AH109 Constructs

r zné promotory

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



# 2-hybridní systém



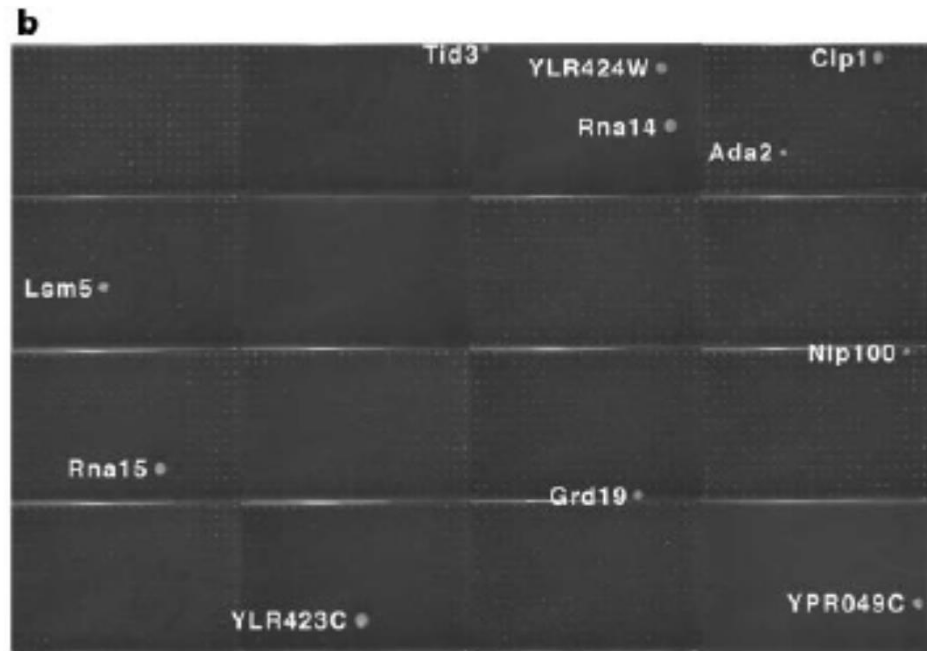
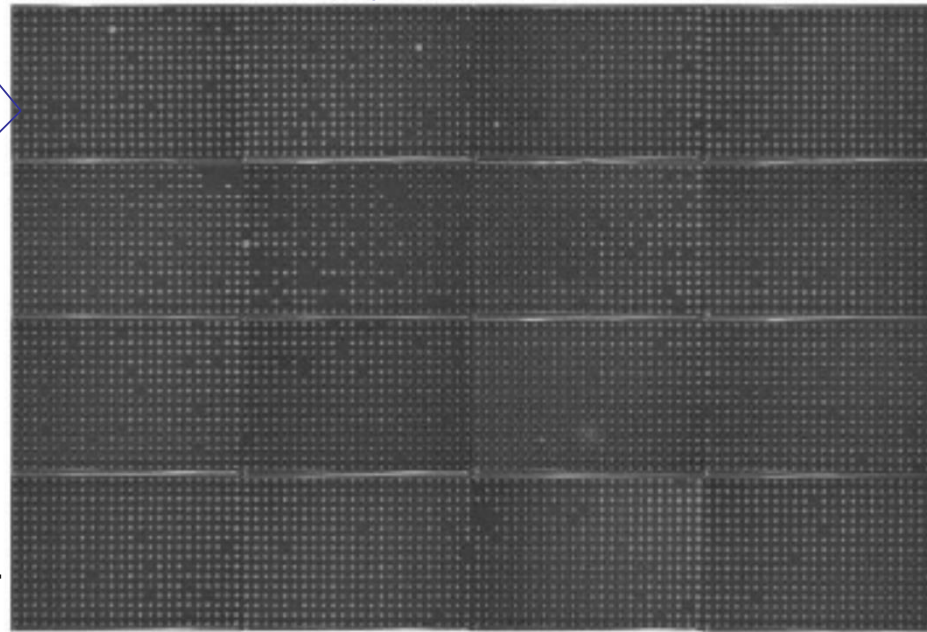
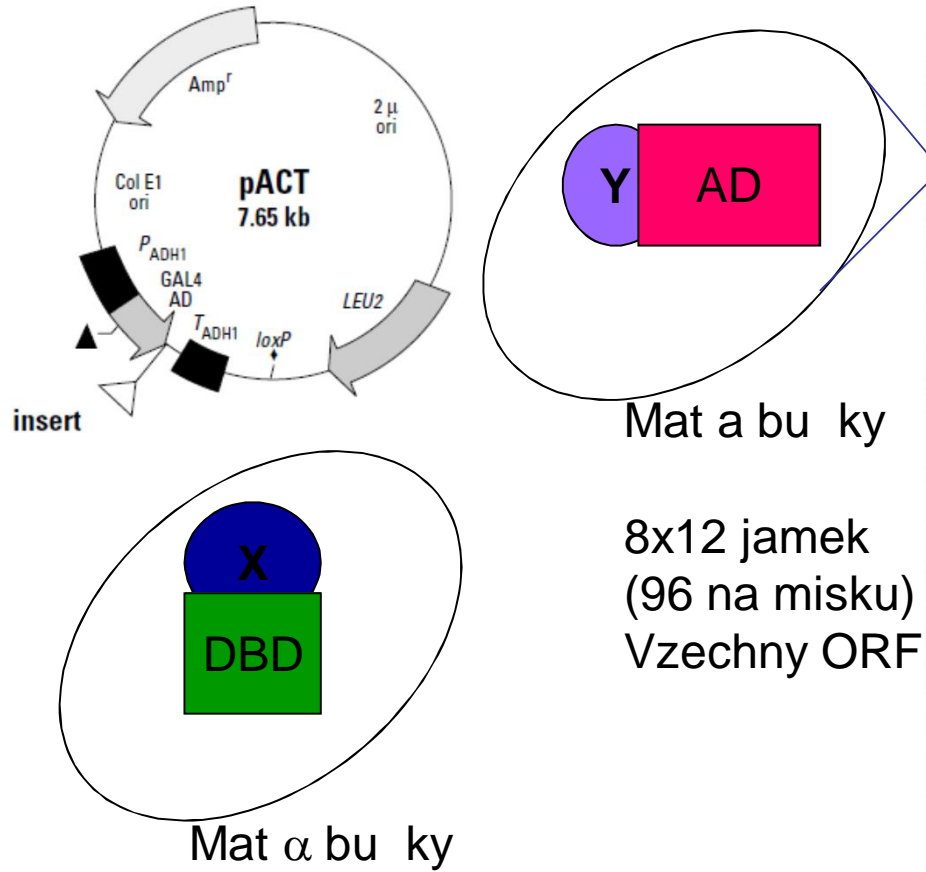
60 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
30 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
20 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
15 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
10 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
5 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
Kontrola (- Leu, Trp)			
	BD-Nse3 + V1AD	BD-Nse3 + AD-Nse1 (1-116)	VBD + AD-Nse1 (1- 116)

# Reportérové geny

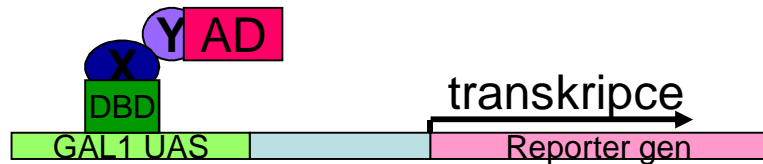
## Reporter genes

<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 $\tilde{o}$ )
<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 sINTERACTOME<sup>®</sup>

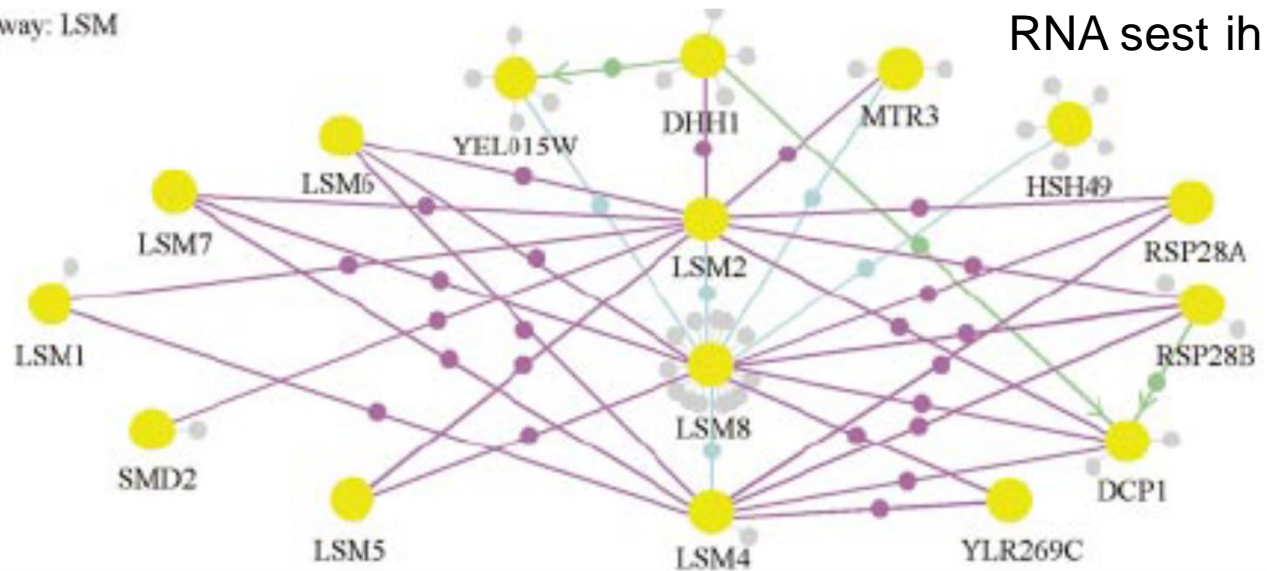


Místo transformací dvou plasmid do jedné bu ky byly BD plasmidy v α bu kách a AD v a bu kách . párováním byly vytvo eny jejich kombinace

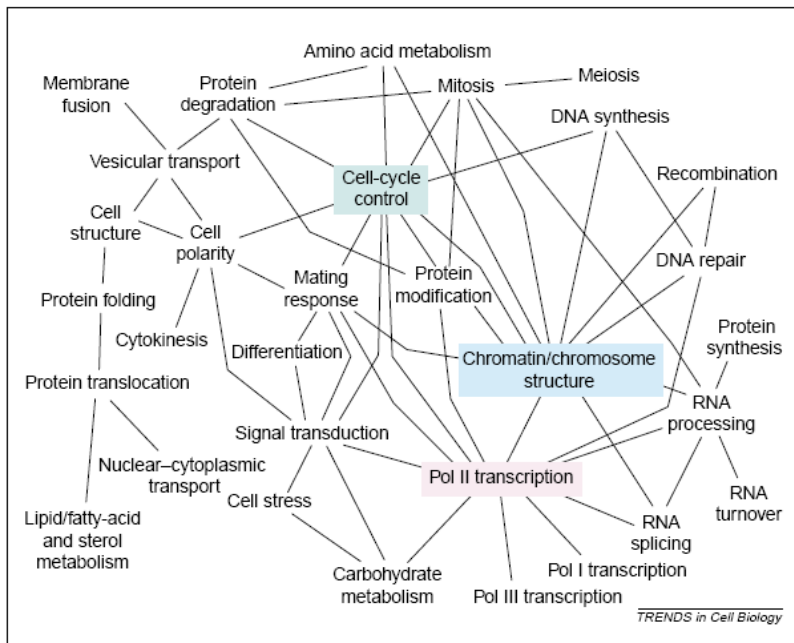


# Protein networks%

Pathway: LSM



RNA sestih



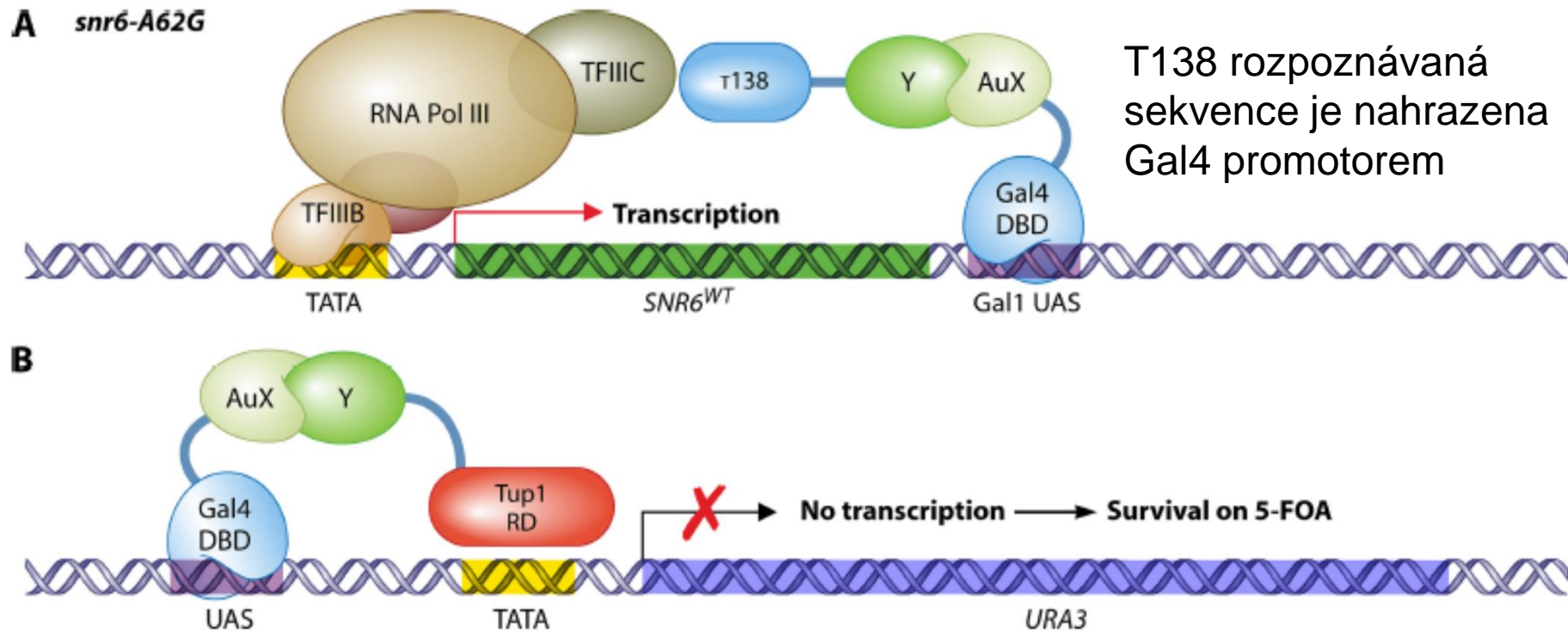
- “ shigh-throughput%screen - interaktom *S. cerevisiae* >30 000 interakcí (~6000 protein )
- “ pomocí Y2H podobný shigh-throughput%screen pro lidské a jiné proteiny ò

Network/sí nazna uje funk ní vztahy  
Tucker et al, TiCB, 2001

# Alternativní jaderné systémy

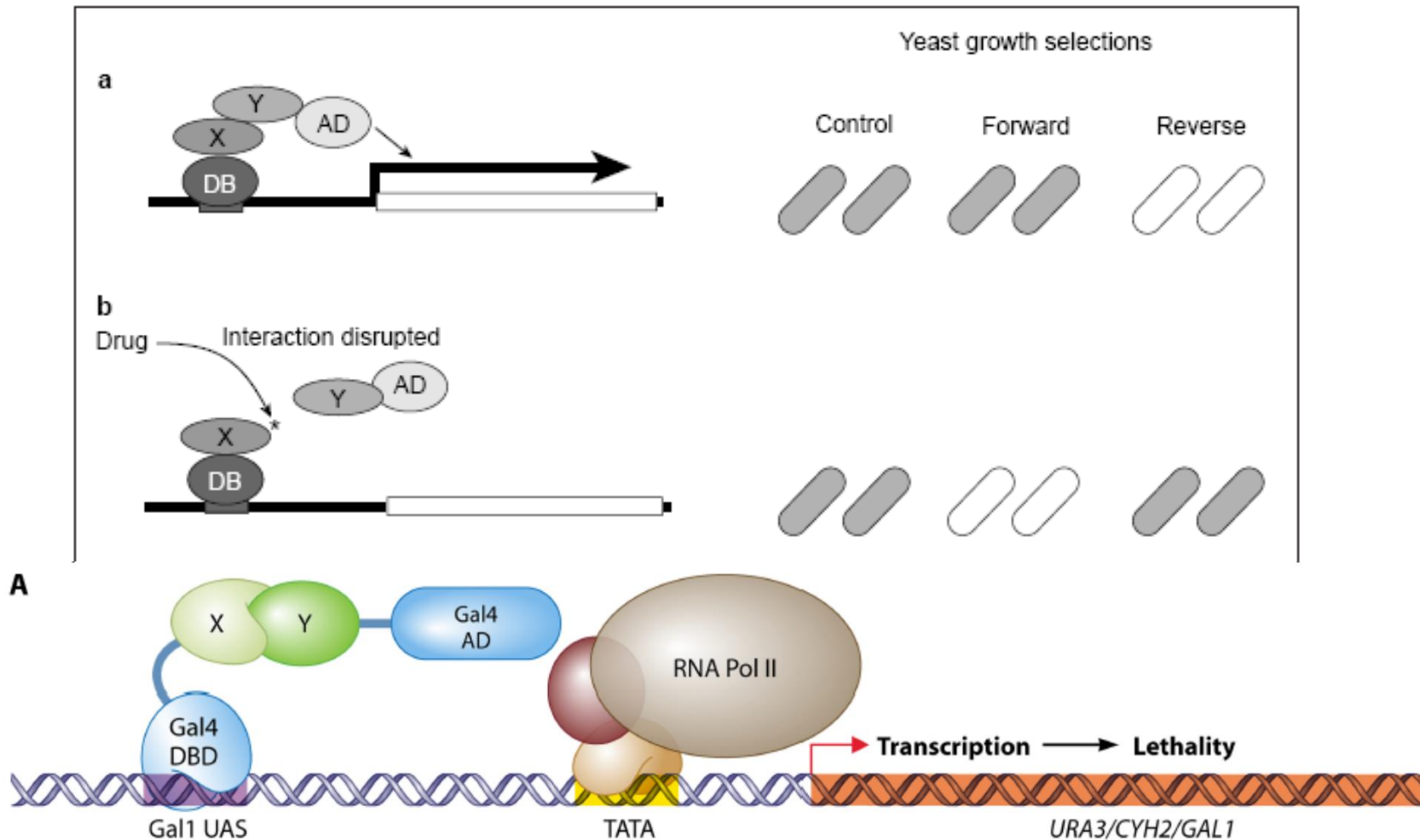
Pokud BD konstrukt sauto-aktivuje%RNA pol II:

RNA pol III má odlišný mechanismus aktivace  
snr6-A62G mutace je teplotně sensitivní



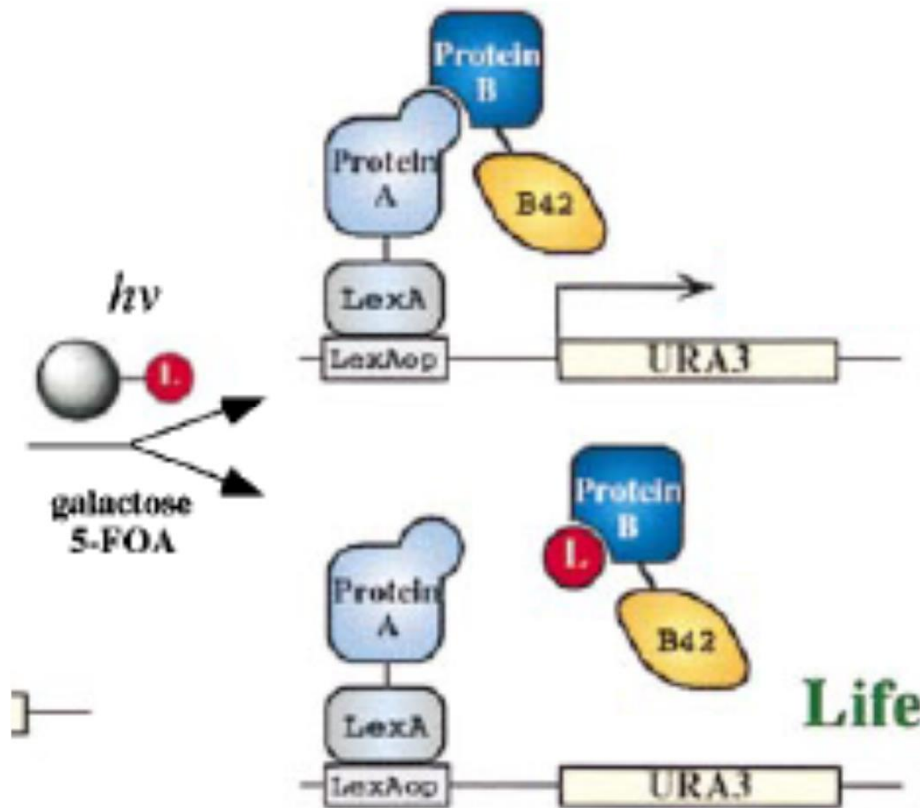
Tup1 je represor, sauto-aktivace je blokována Tup1 represorem (využití 5-FOA pro pozitivní% detekci interakce . viz reverzní systémy)

# Reversní systém (Y2H)



- při použití *URA3* reportéru lze použít toxickou 5-fluoro-orotátovou kyselinu (5-FOA) k negativní selekci tj. interakce povede k záhub 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		

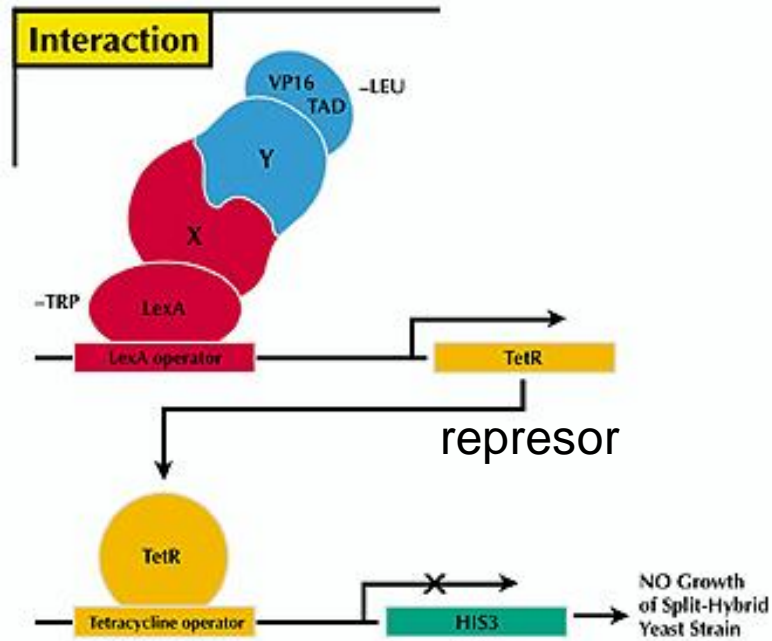
Sc\*-H-W-L, gal/raf      Sc\*-H-W-U, gal/raf

	FK506		
	0	100 nM	2 $\mu$ M
A			
B			
A-B			

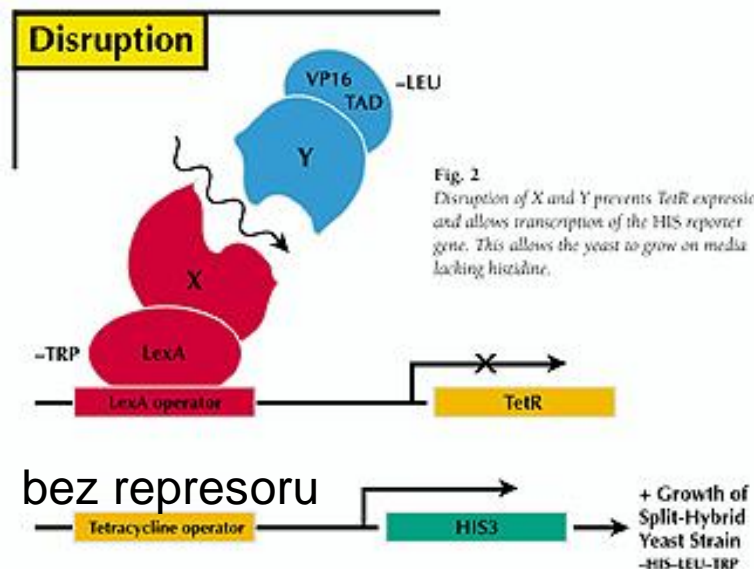
Sc\*-H-W, gal/raf, 0.1 % 5-FOA

FK506 inhibuje vazbu proteinu FKBP12 na TGF $\beta$ -receptor  
( $\phi$ ivotaschopnost na FOA plotnách)

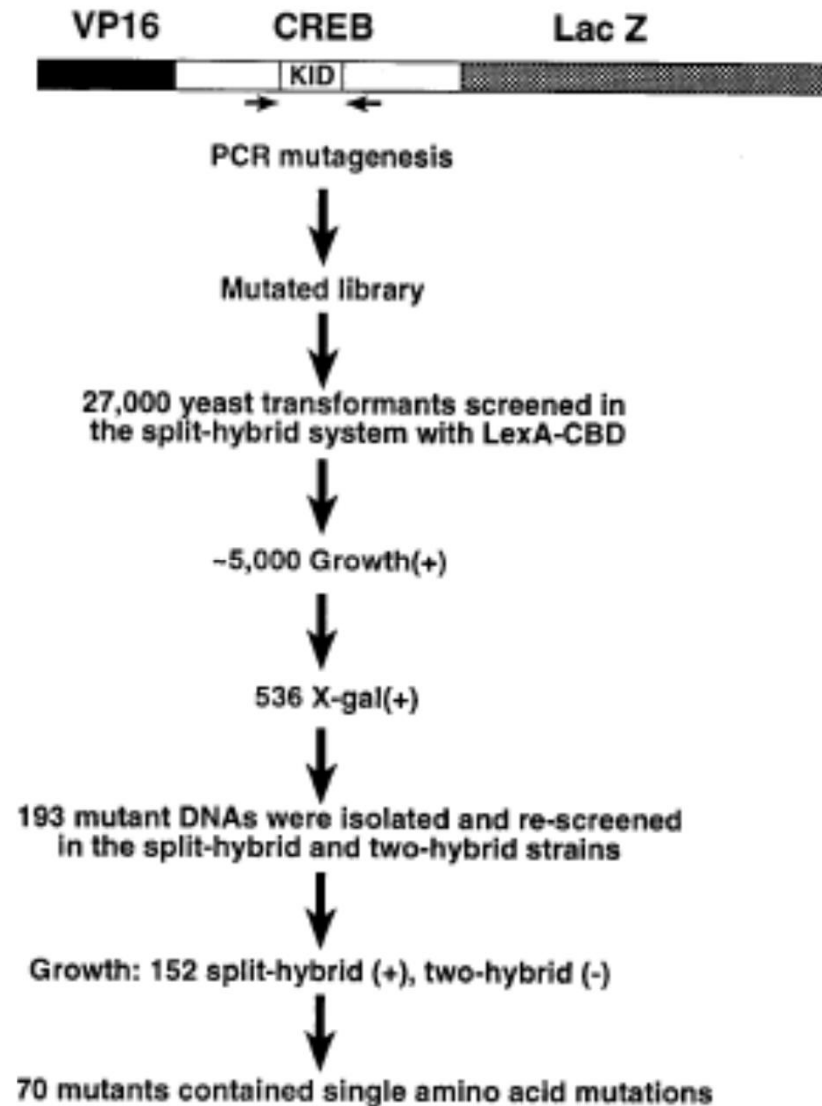
# Split-hybrid systém



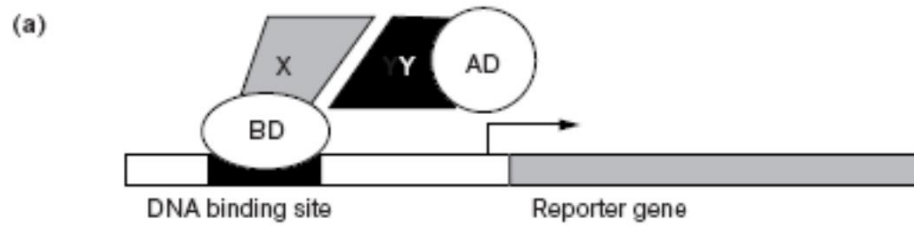
**Fig. 1**  
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS3 reporter gene making cells unable to grow on media lacking histidine.



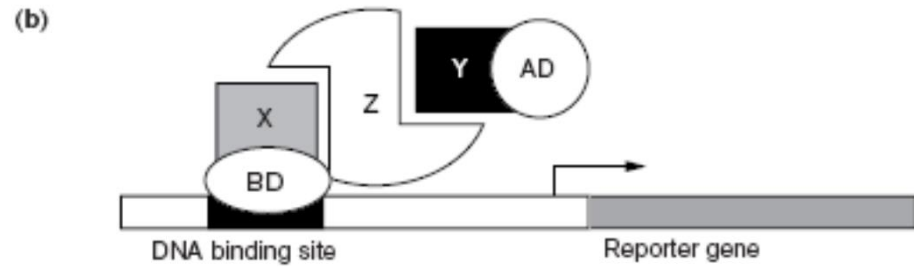
**Fig. 2**  
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS3 reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.



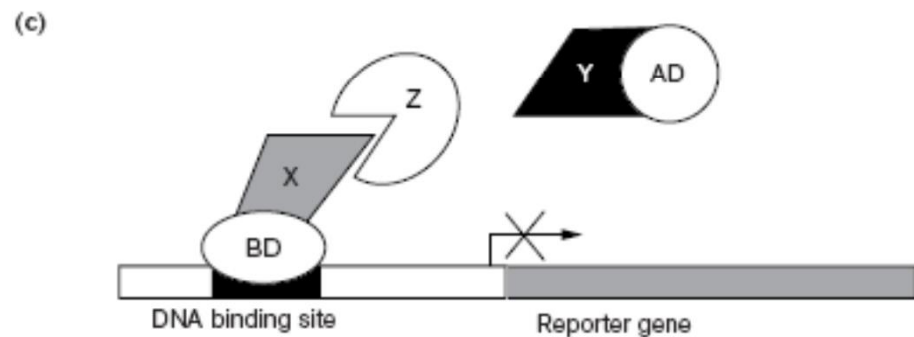




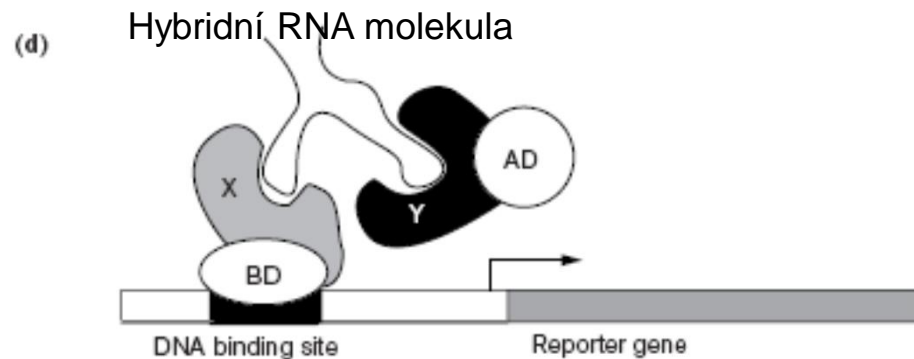
Klasický dvoj-hybridní systém



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

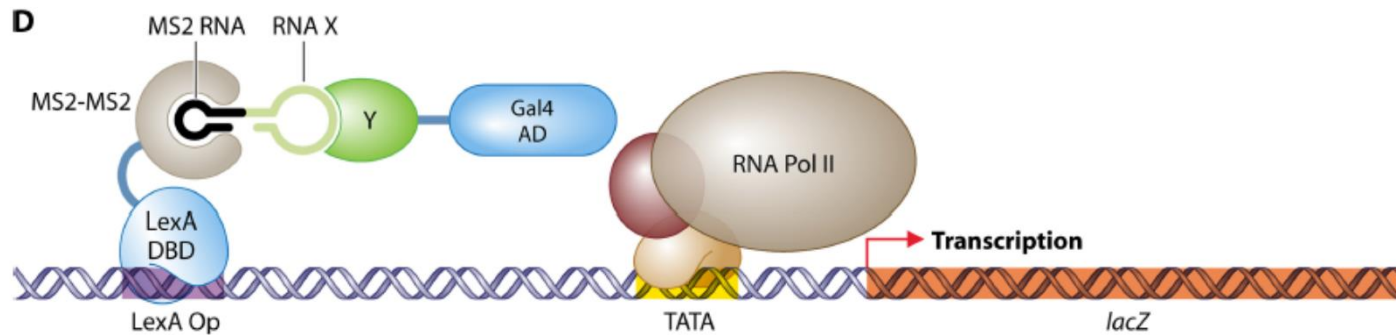


Dvoj-hybridní systém  
 - proteinový inhibitor interakce



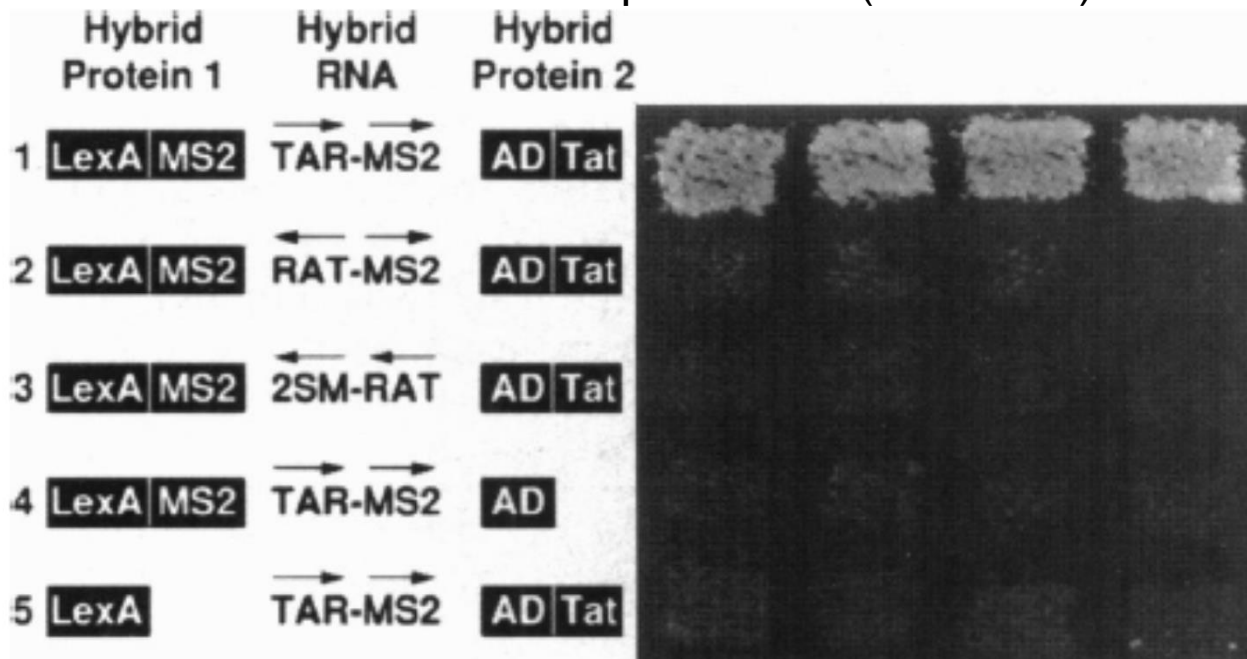
Troj-hybridní systém  
 . RNA interakce  
 - ligand/receptor

# Analýza vazby protein-RNA (Y3H)

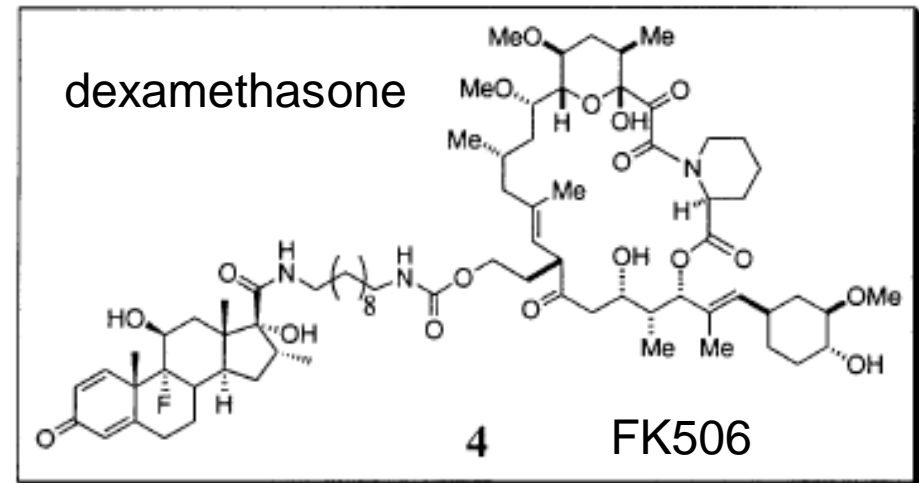
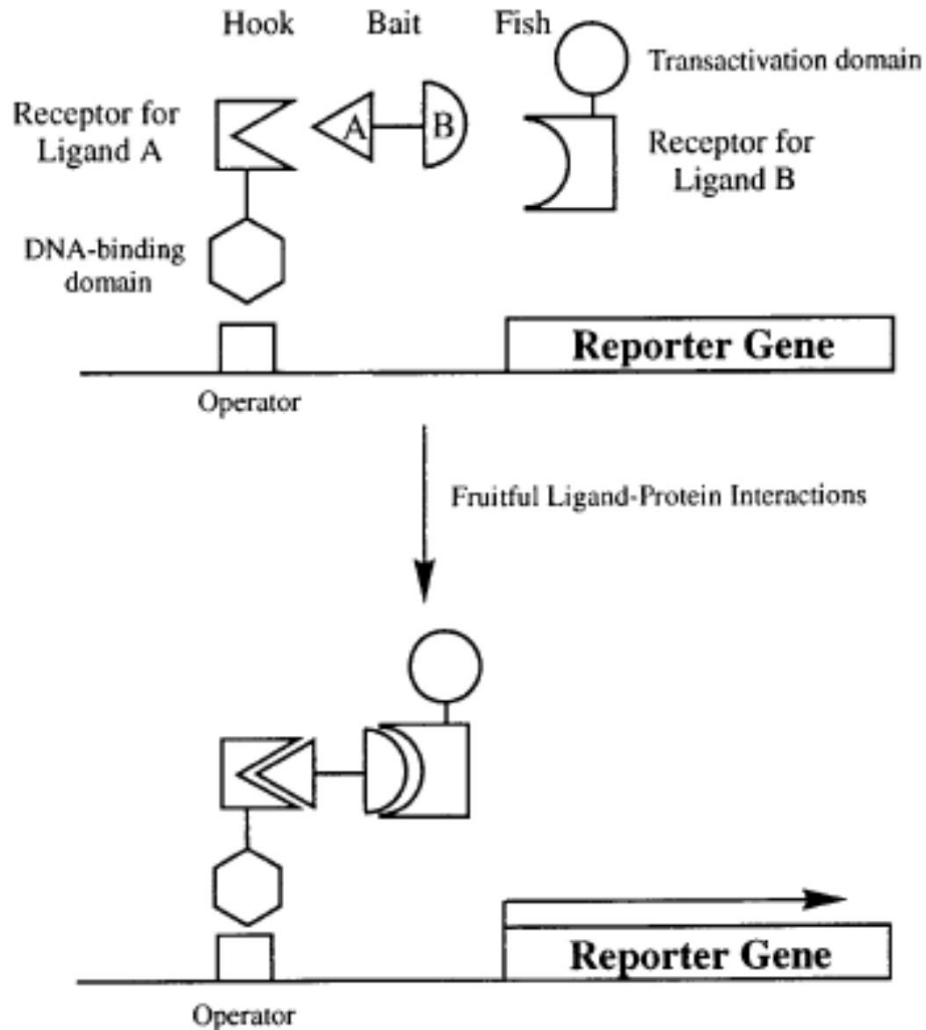


T i hybridní/f zní konstrukty:

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



# Vazba ligand-receptor (Y3H)



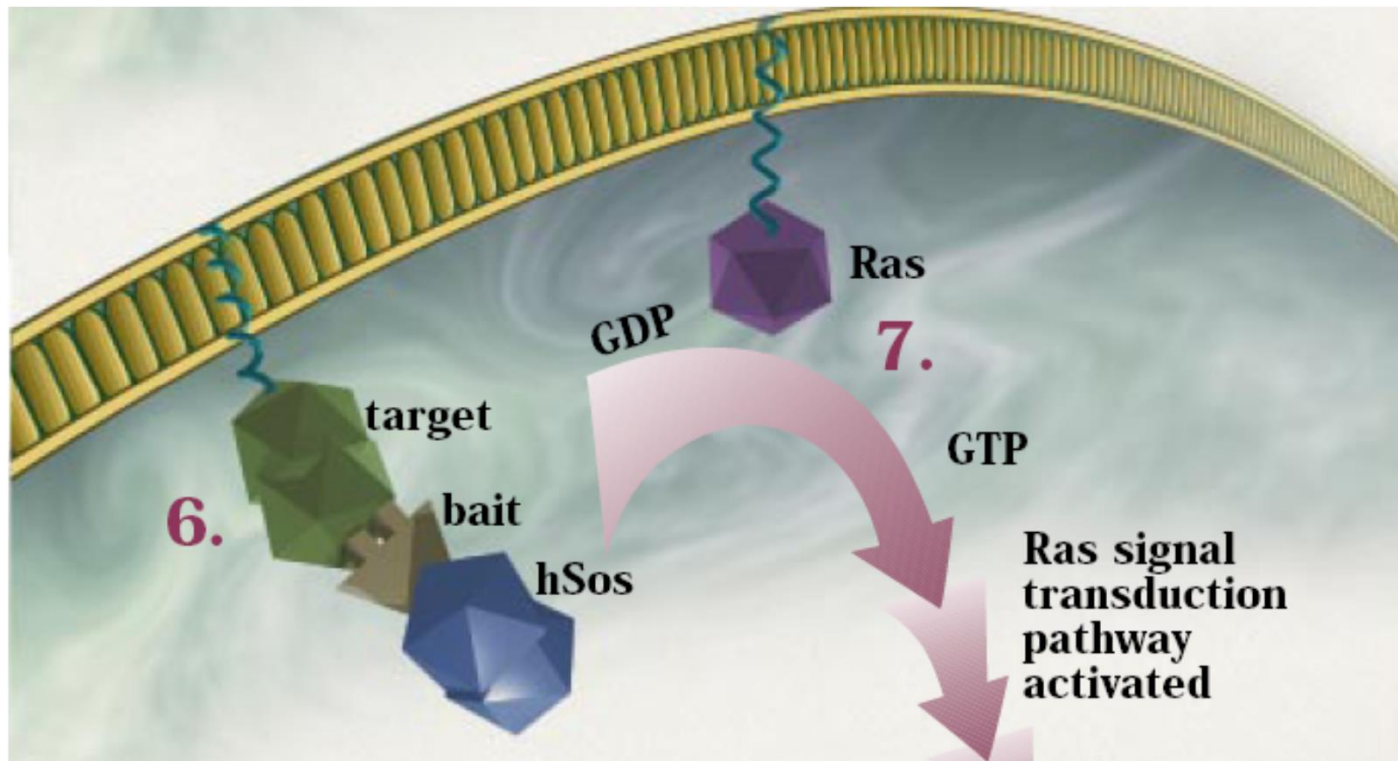
T i hybridní/f zní konstrukty:

1. DB-Gal4 a glukokortikoid receptor (vá0e dexamethason)
2. Organická slou eniná obsahující dexamethason a FK506 (v médiu)
3. AD-Gal4 a FKBP12 (vá0e 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 vyzdí teplot )

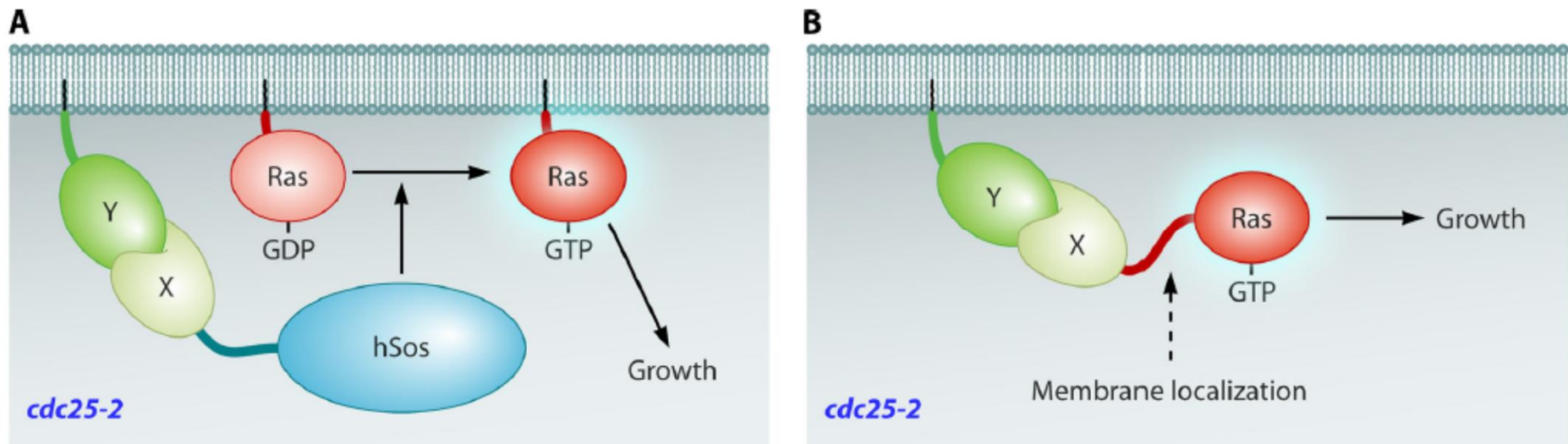


# alternativní Ras hybridní systémy

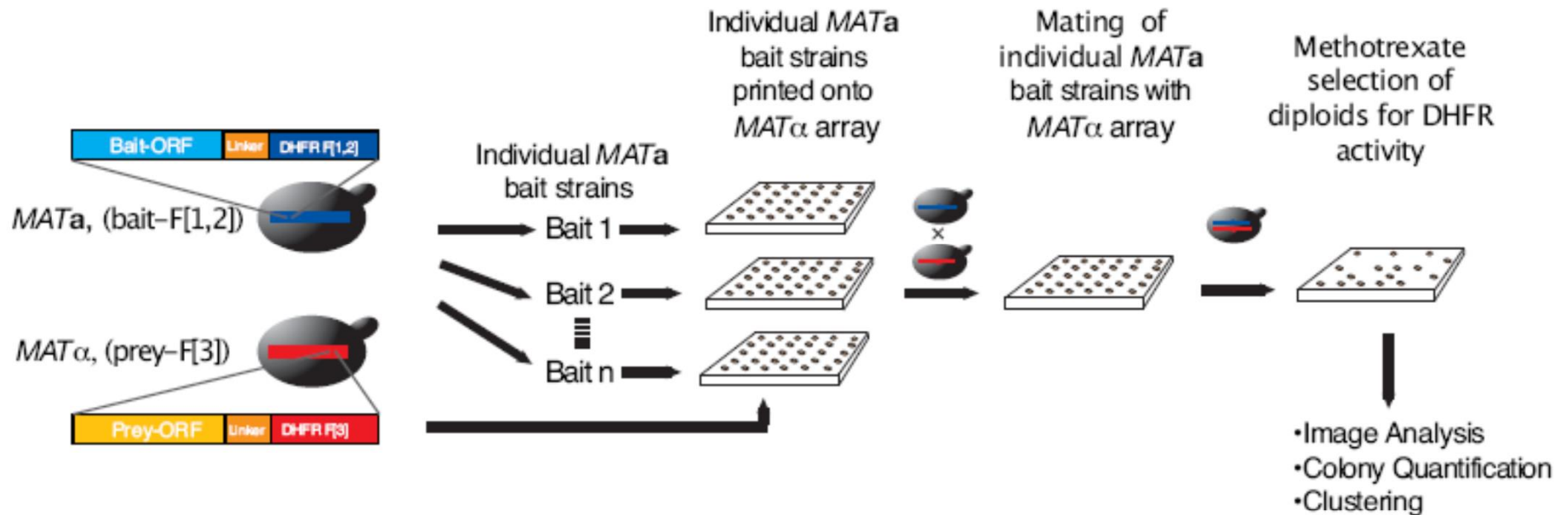
Kvasinkový *cdc25-2* ts mutant . lidský hSOS (guanine exchange factor) aktivuje RAS pokud je ukotven na membránu v jeho blízkosti **(A)**

- jeden partner je myristylován (signální sekvence) a ukotven na membránu a druhý (interakční) partner je fuzován k hSOS . spustí Ras dráhu (roste i na vyzdí teplot )

**(B)** . saví konstitutivně aktivní Ras protein (bez signální sekvence) je fuzován s proteinem, který interaguje s partnerem ukotveným v membráně (spustí se Ras dráha a *cdc25-2* kvasinky rostou i na vyzdí teplot )

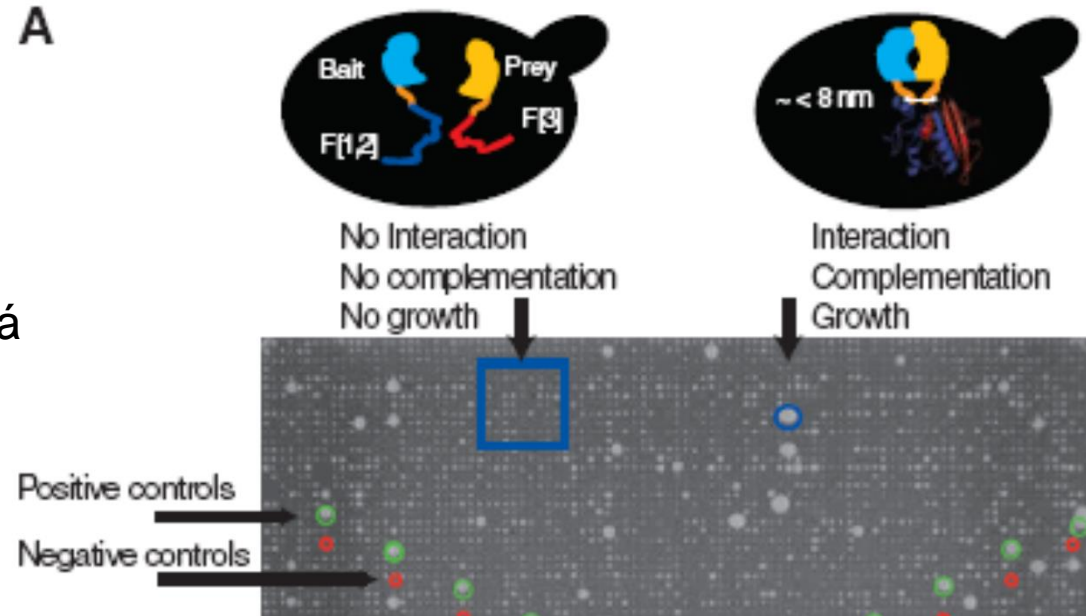


# Komplementace protein



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

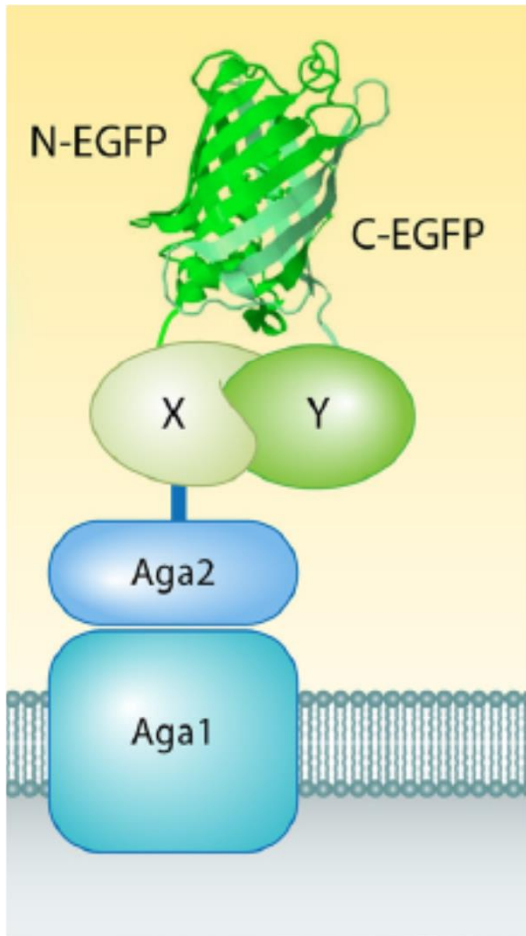
A



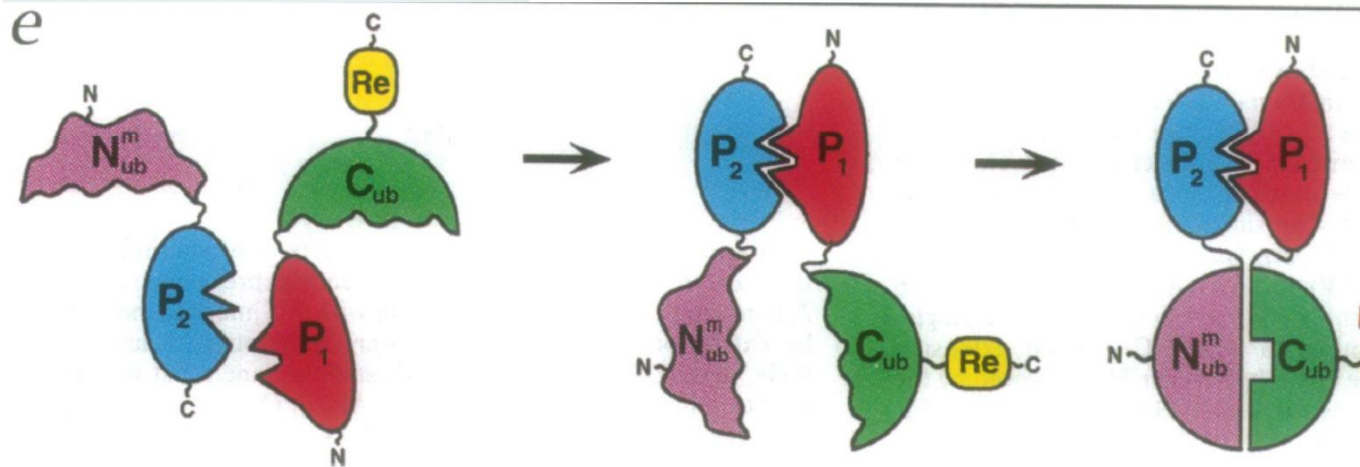
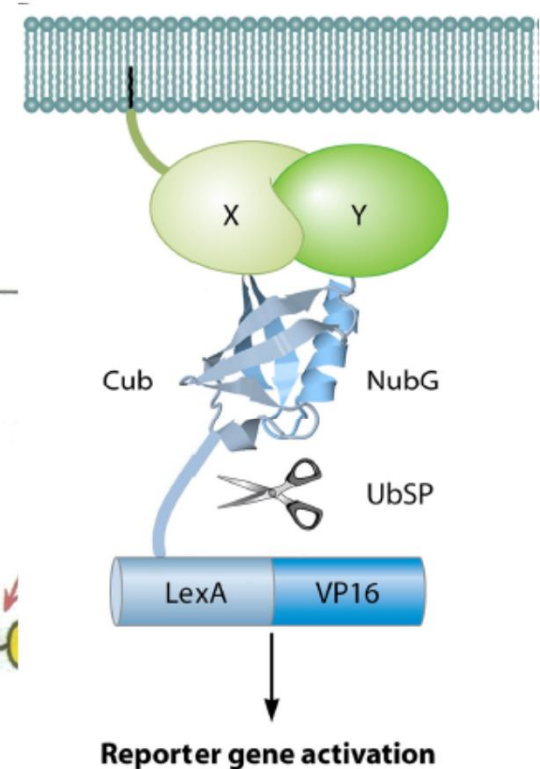
# Komplementace proteinů

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

Interakcí dvou partnerů dochází ke komplementaci ubikvitinu .  
 p vodní 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



# P ehled kvasinkových PPI biotechnologií

