

Test: 21.12., C02-2.11 - psací potřeby (A,B,C,D)

Zkouška/prezentace:

21.12., C02-2.11 – max 7 studentů

další termín zkoušky v lednu ...

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

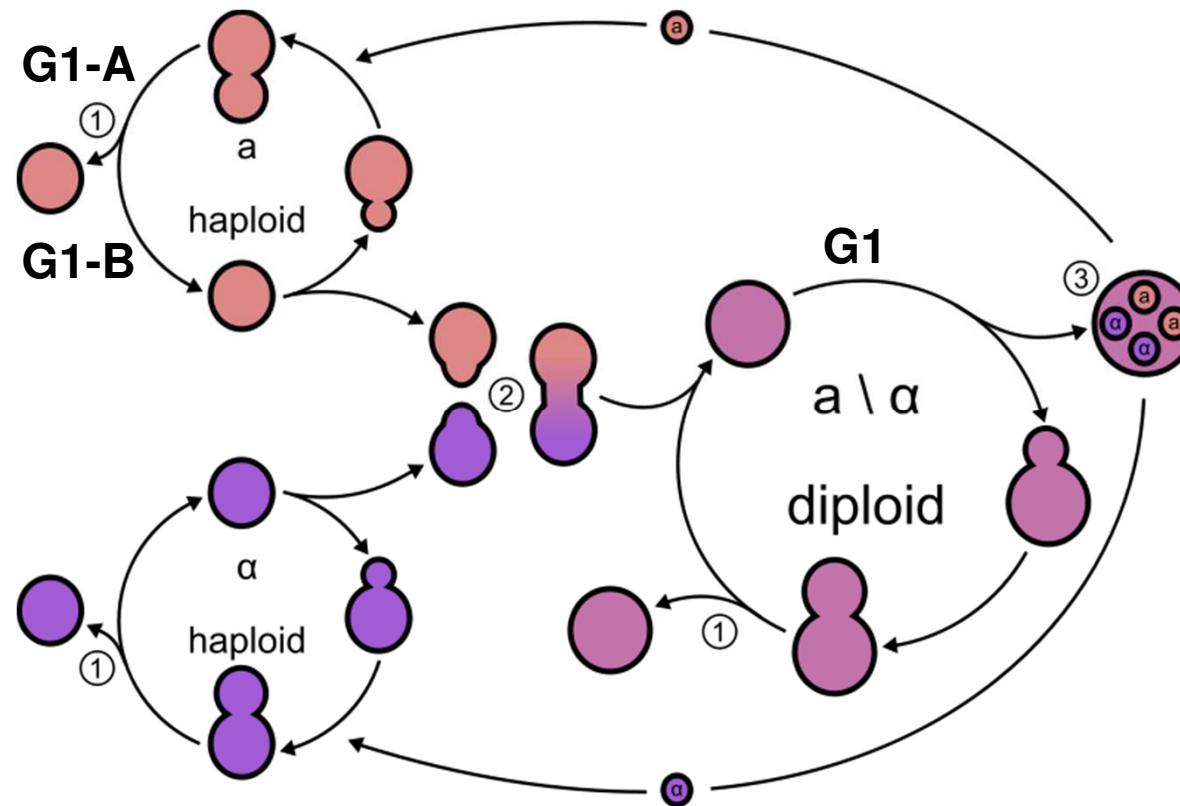
- úvod do problematiky
- výsledky z článku (ne starší než 5 let)
- závěry, reference

přednáška 15 + 5 minut

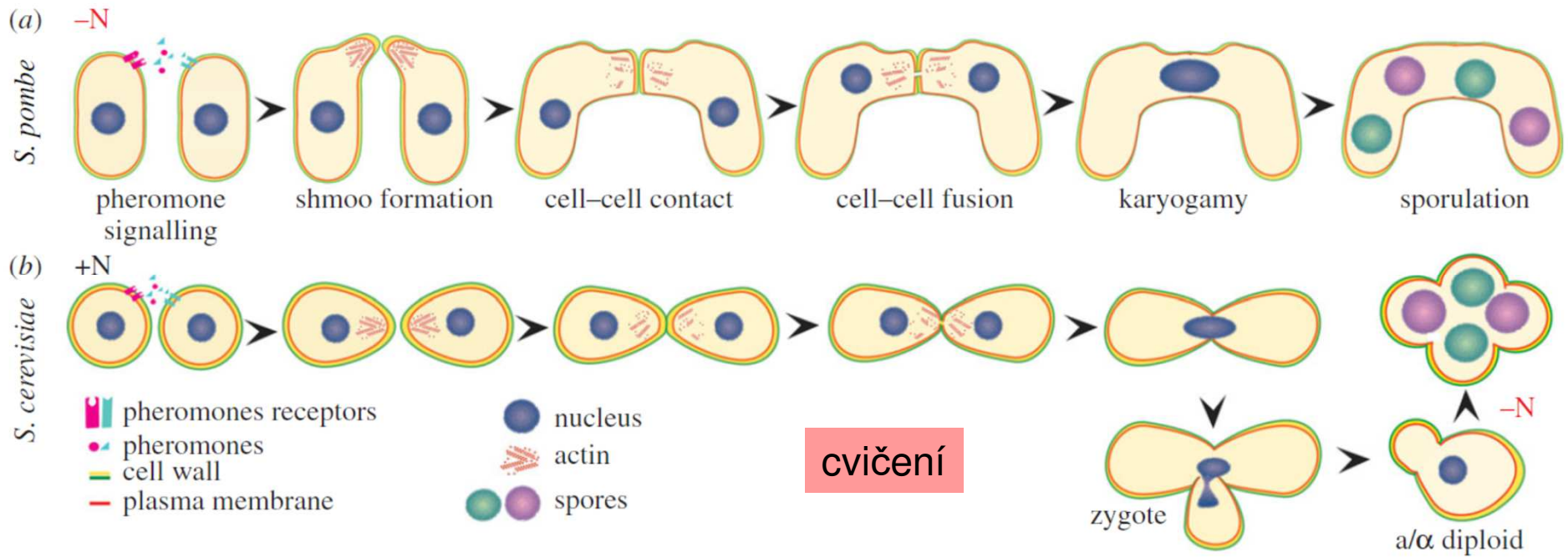
Cvičení: 14. 12. 8.00, B07-2.17 - pláště, psací a kreslicí potřeby

- 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 (vycházející z poznatků o kvasinkách)

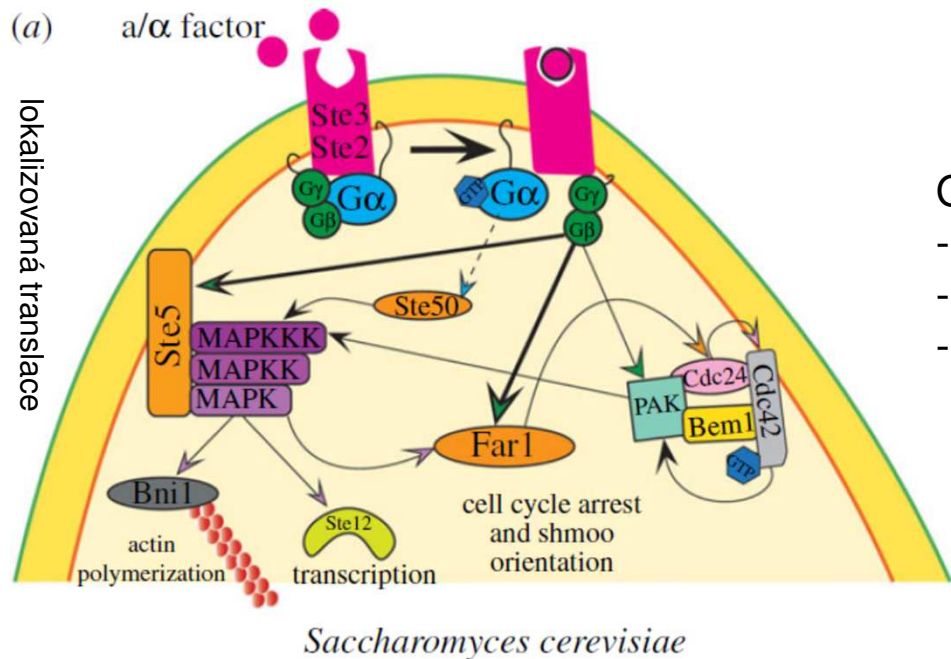
Párování/mating kvasinkových buněk



- 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



STE = sterile



Geny/proteiny ...

- specifické pro a/α (receptor ...)
- haploidní (specificky iniciovaná dráha...)
- obecné (haploidní, diploidní ...)

Chromosom III

Chromosom III obsahuje:

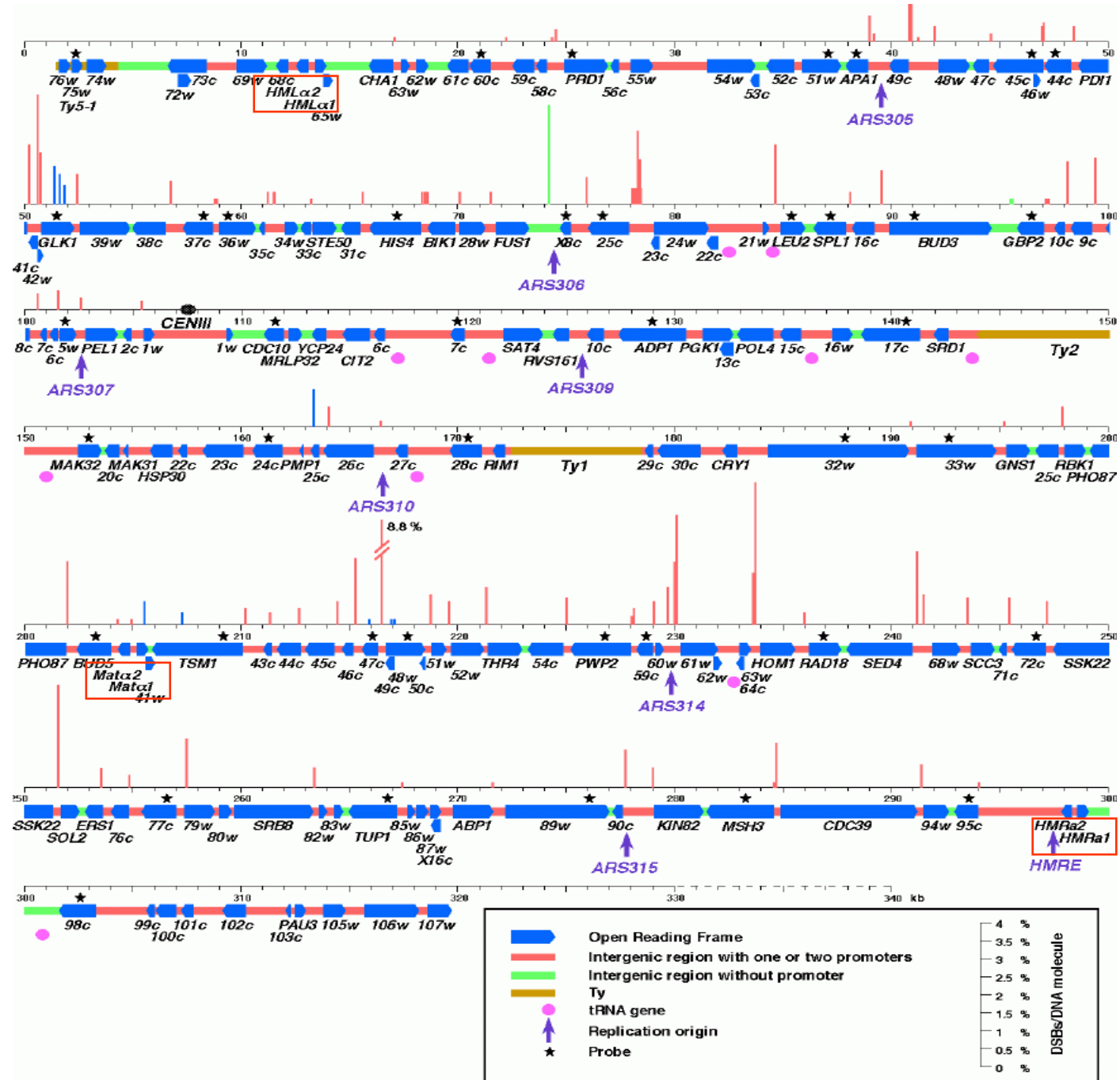
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

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

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

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

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

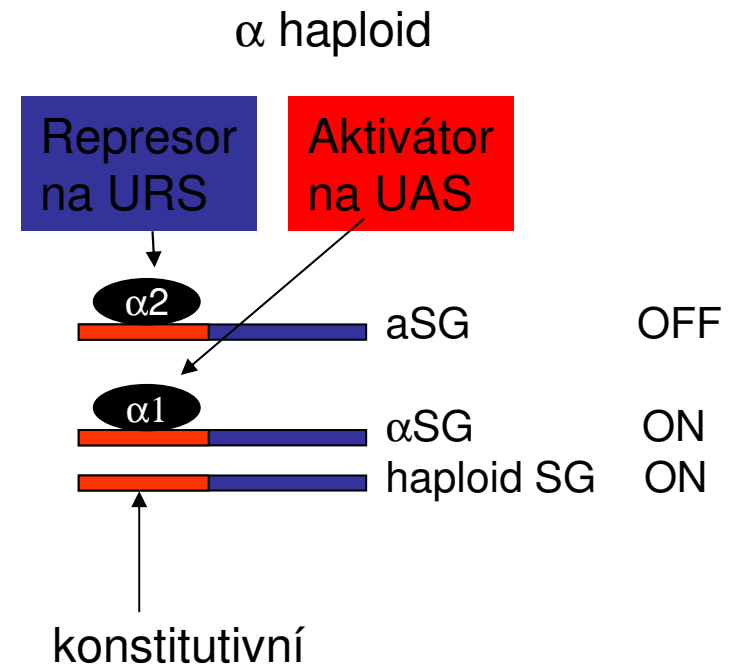
α 1, α 2 a1, a2	diploid	 aSG OFF
		 α SG OFF
		 haploid SG OFF

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)

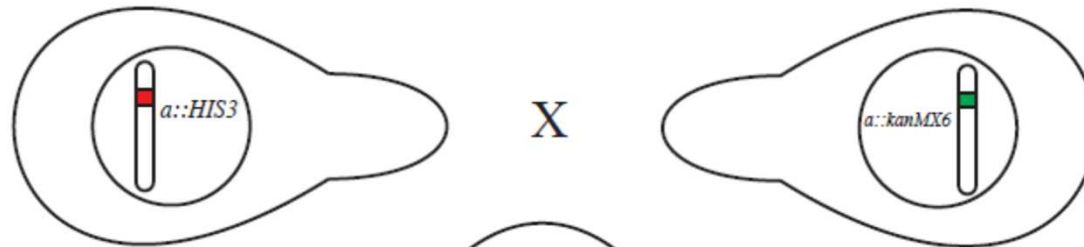
Promoter	Regulation/ Relative Protein Expression Level	Signal Strength on Western blot ^b
<i>ADH1</i> (full-length)	Ethanol-repressed/High	+++
<i>ADH1</i> (410 bp+) ^c	Constitutive/medium	++
<i>ADH1</i> (410 bp)	Constitutive/low	+/- (weak)
	Constitutive/ very low	(not detectable)
<i>ADH1</i> (700 bp)	Constitutive/high	+++
<i>GAL1</i> (full-length)	Repressed by glucose; induced (high-level) by galactose	(not detectable) ^d +++ ^d
<i>MET1</i>	Methionin repressed	
<i>CUP1</i>	Cu induced	
<i>MFA1</i>	MATa specific (haploid specific)	



Příprava aneuploidních buněk

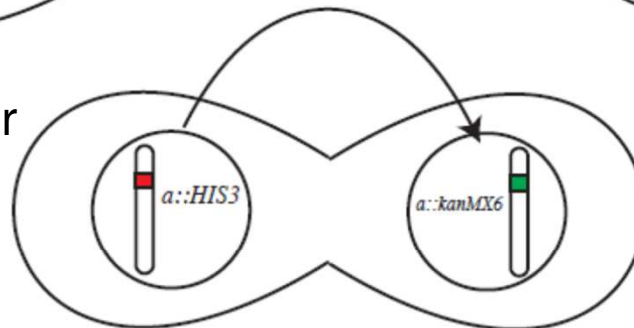
MAT α , kar1 Δ 15, lys2-801, cyh2-Q37E, a::HIS3

MAT α , a::kanMX6, LYS2, CYH2, can1-100



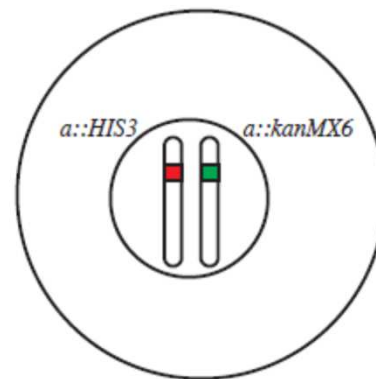
KAR1 gen potřebný pro karyogamii tj. pro fuzi jader

a::HIS3 + a::kanMX6 =>
a::specifické promotory -
rezistence pouze v (a)
haploidních buňkách



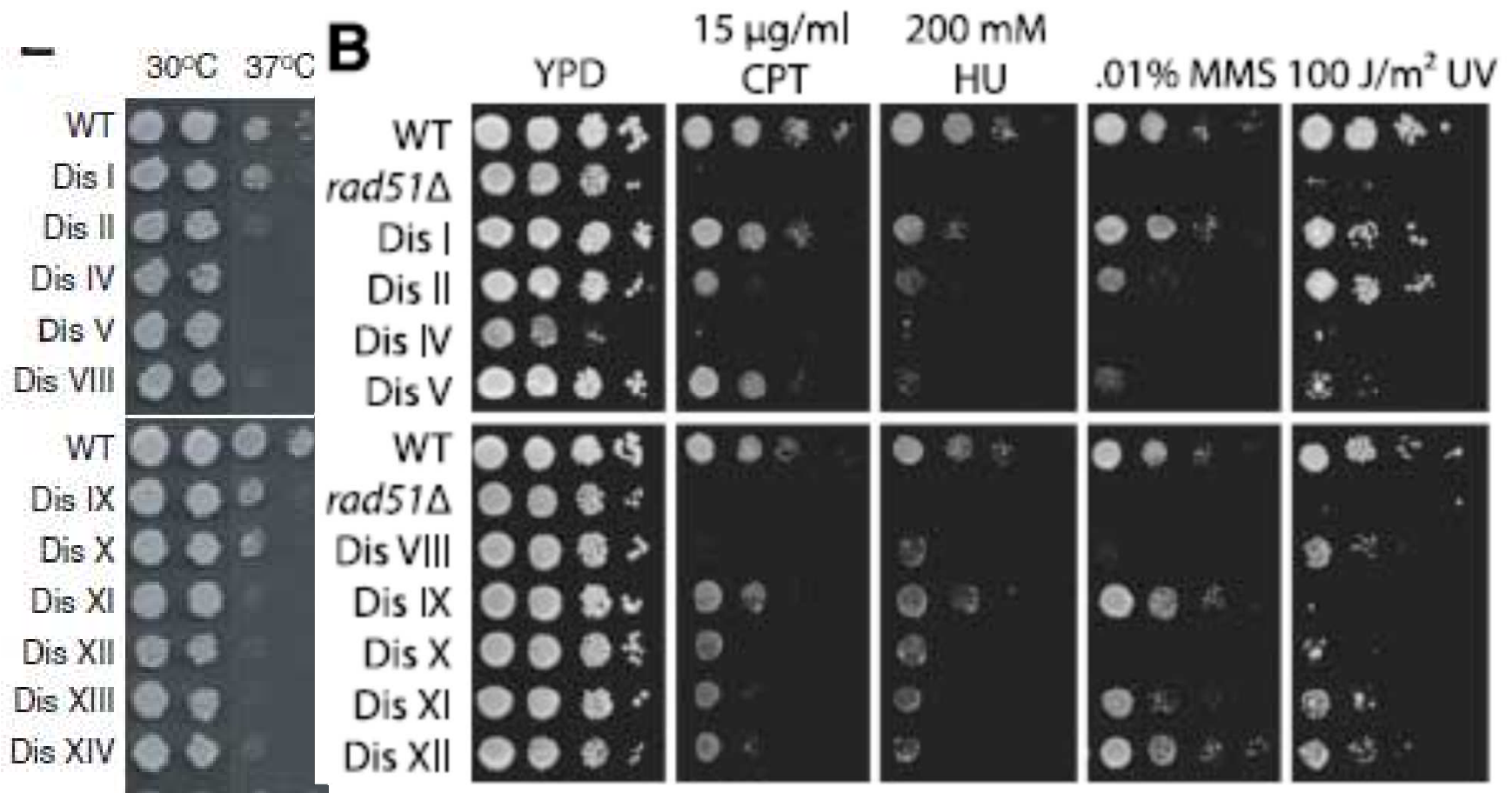
Select for: Can^R, -His and Kan^R

Studium vlivu aneuploidie na buňku (u člověka se podílí na kancerogenezi, aneuploidie v 90% lidských nádorů)

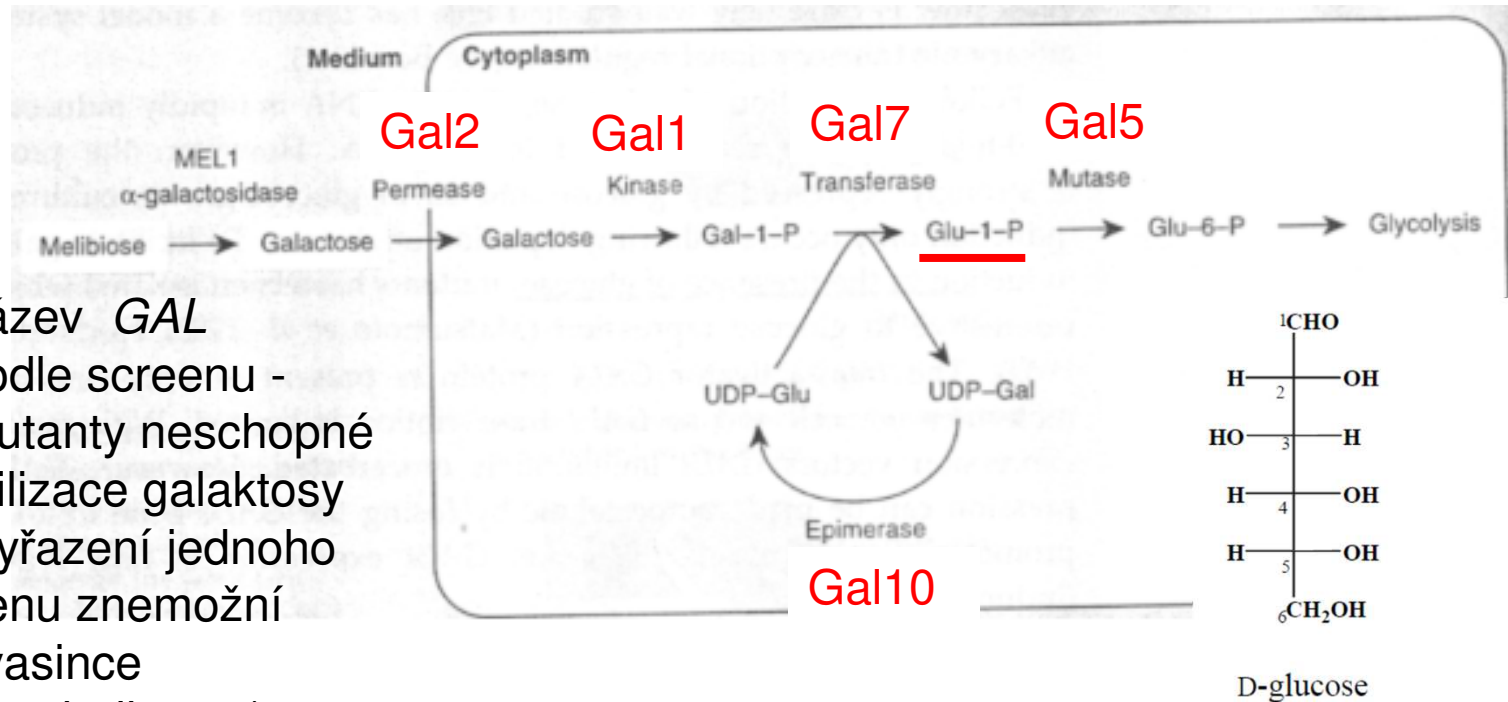


Aneuploidie způsobuje genomovou nestabilitu - rakovina

- aneuploidie ve >90% rakovinných buněk
- je genomová nestabilita důsledkem aneuploidie nebo je aneuploidie důsledkem genomové nestability?

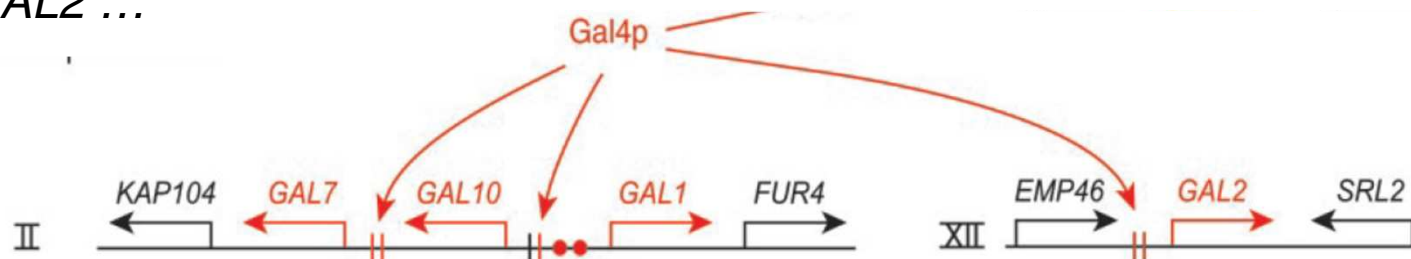


Regulace metabolické dráhy galaktózy

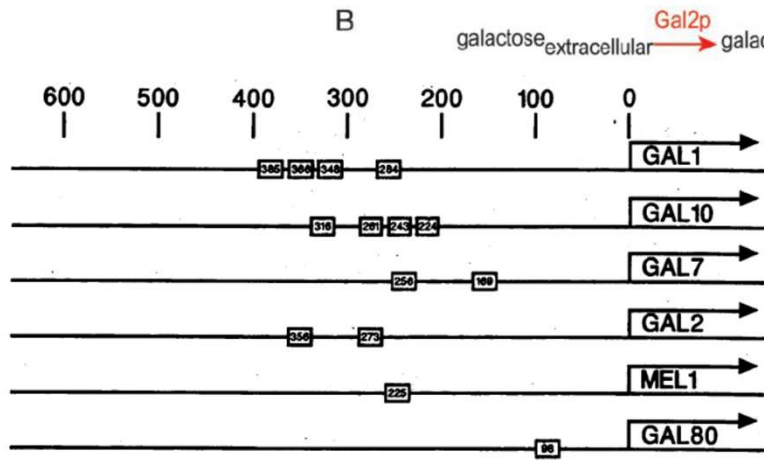
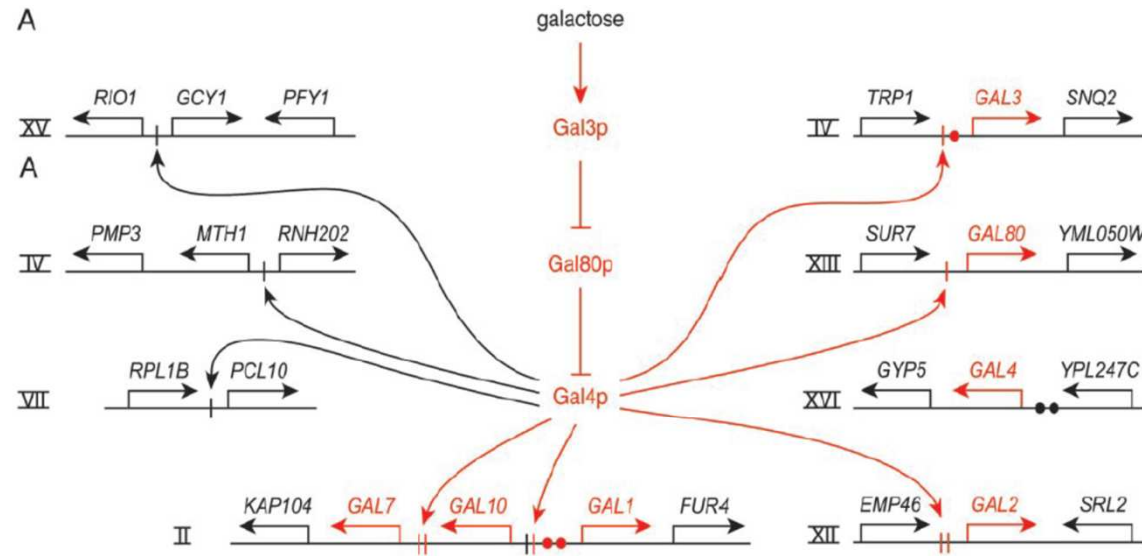


název *GAL*
 podle screenu -
 mutanty neschopné
 utilizace galaktosy
 (vyřazení jednoho
 genu znemožní
 kvasince
 metabolismus)

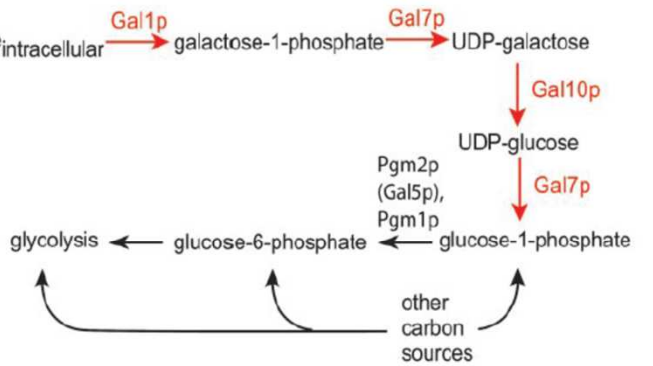
- pouze *GAL5* gen je konstitutivně exprimován (potřebný pro metabolismus glukózy)
- ***GAL4*** gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS ***GAL1***, ***GAL7***, ***GAL10***, ***GAL2*** ...



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 T C A G G A G G C

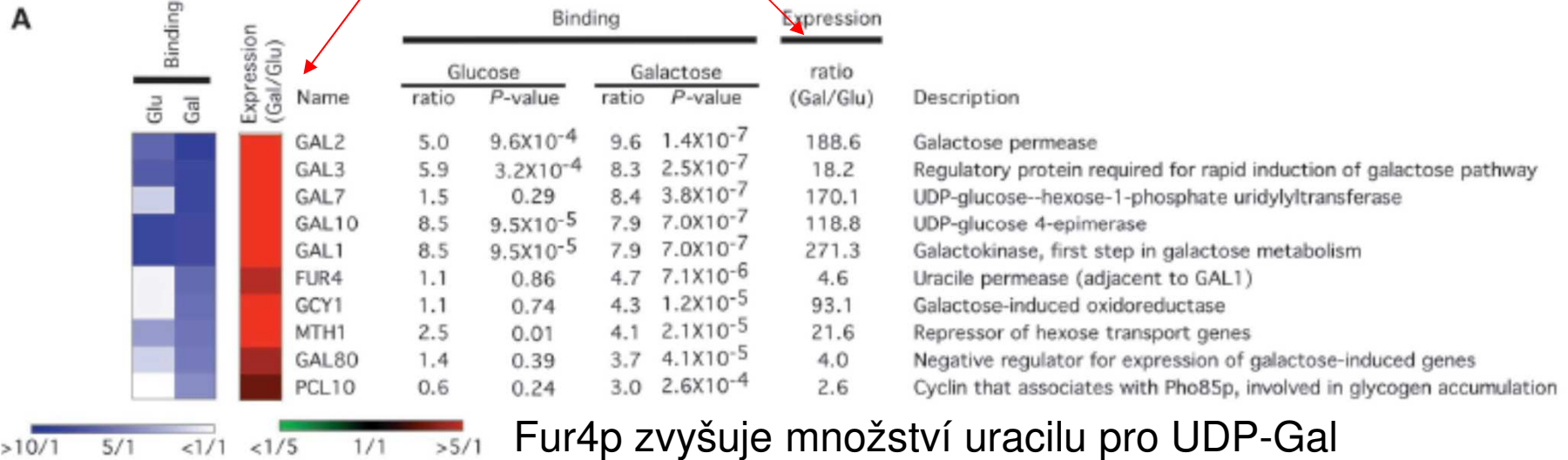


GAL4 gen kóduje transkripční faktor (aktivátor), který se váže na UAS **GAL1**, **GAL7**, **GAL10** ...

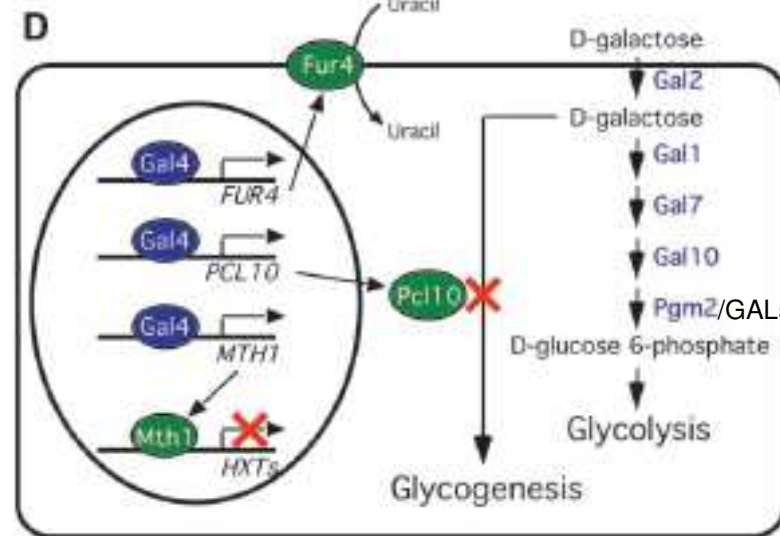
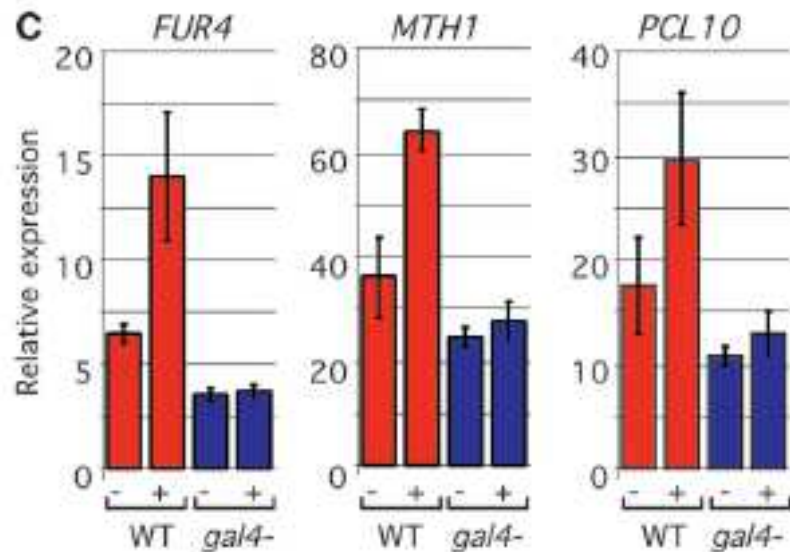
Hittinger et al., PNAS, 2004
 Johnston, MMBR, 1987

ChIP Gal4p

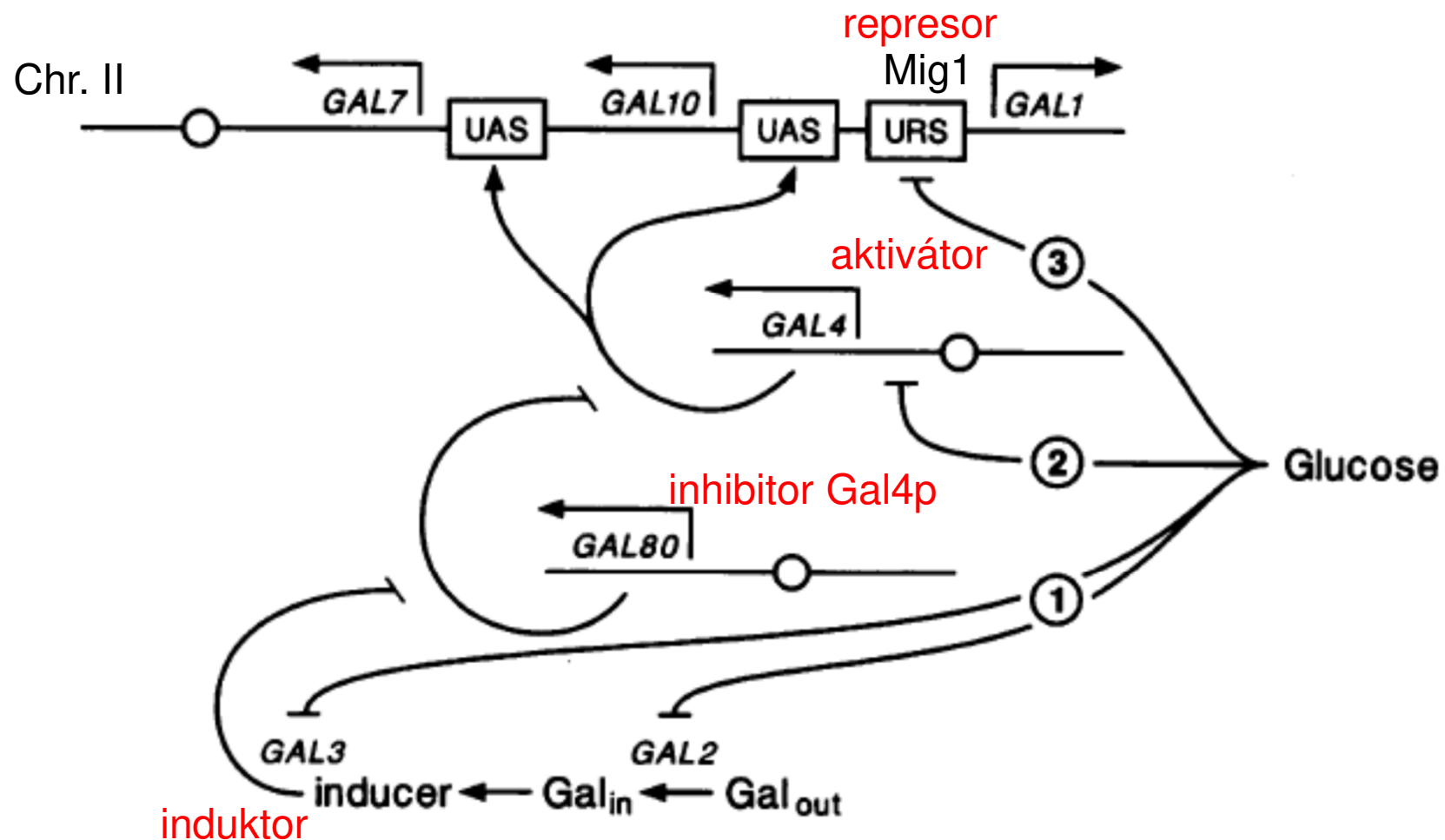
microarray po galaktose



Fur4p zvyšuje množství uracilu pro UDP-Gal
 Mth1p potlačuje transport glukosy (zlepšuje příjem gal)
 Pcl10p potlačuje glyconeogenezi (maximalizuje zisk z gal)
 Gal80p inhibuje/blokuje Gal4p

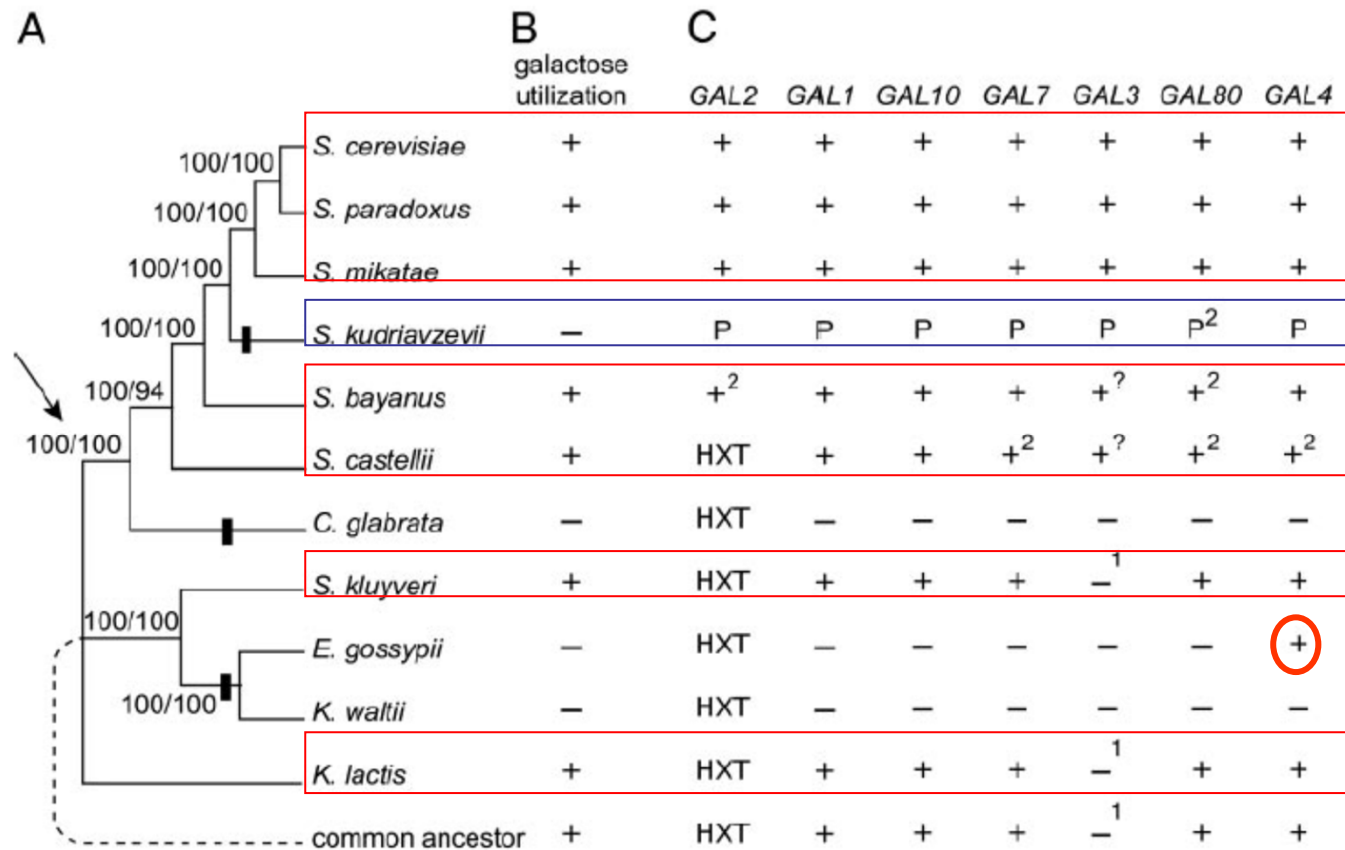


Regulace transkripce *GAL* genů



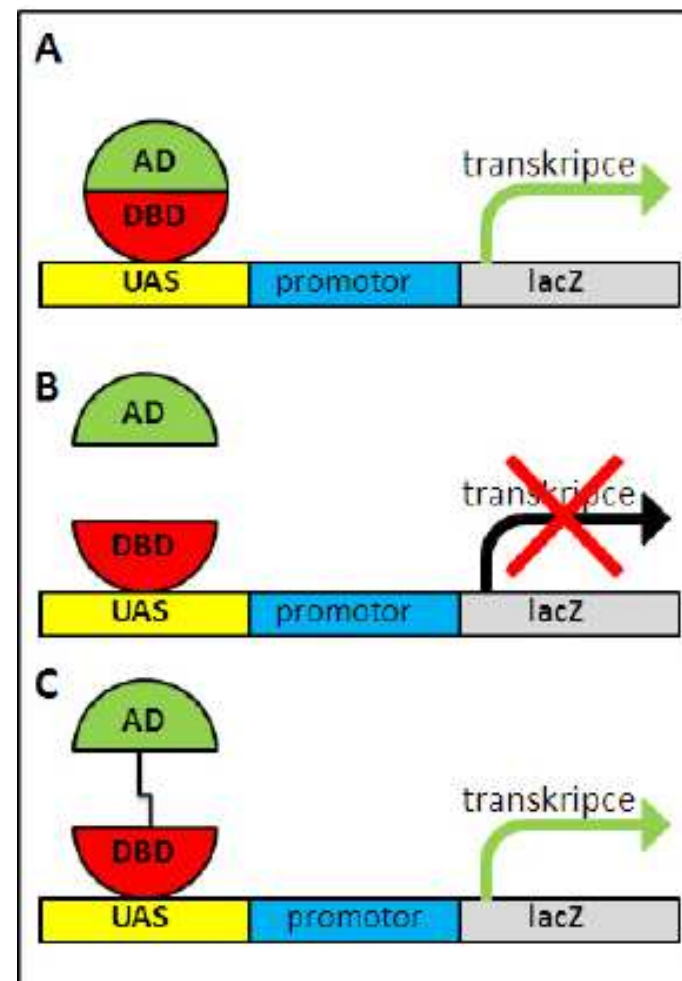
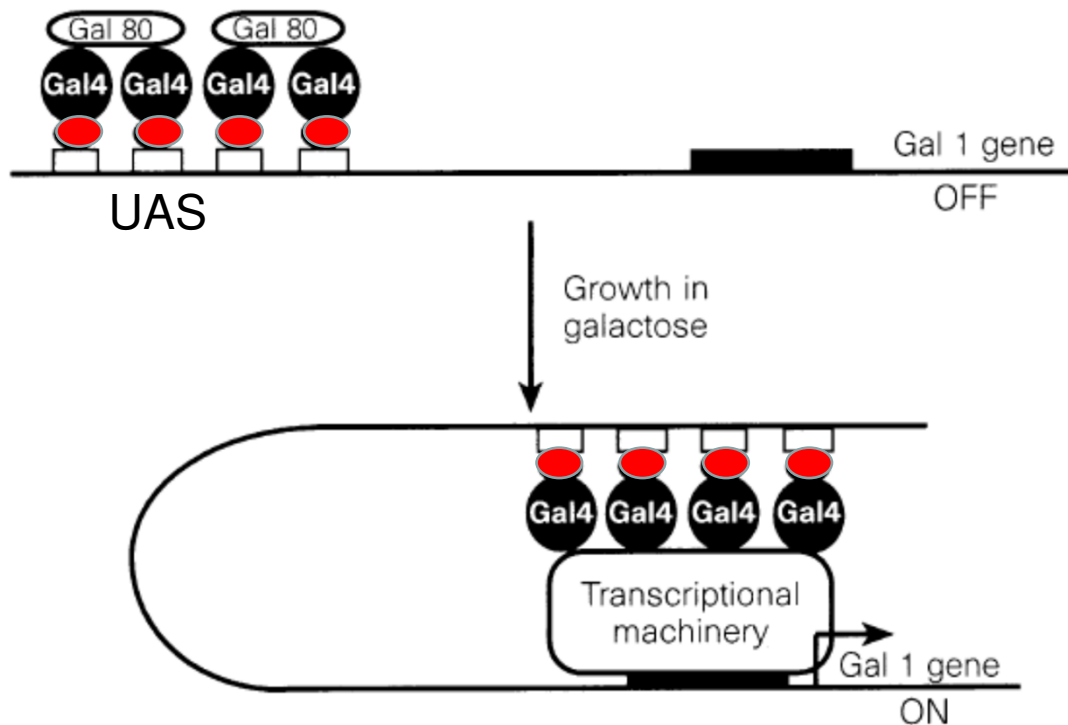
- glukosa reprimuje transkripci *GAL* genů na různých úrovních
 - *URS* v promotorech *GAL1* genu (*Mig1* represor) - reprimuje transaktivaci *GAL4* transkripčním aktivátorem
 - *Gal80* blokuje *Gal4* aktivační doménu
 - reprimuje *GAL3* induktor a *GAL2* permeasu

Rozdíly v utilizaci galaktózy



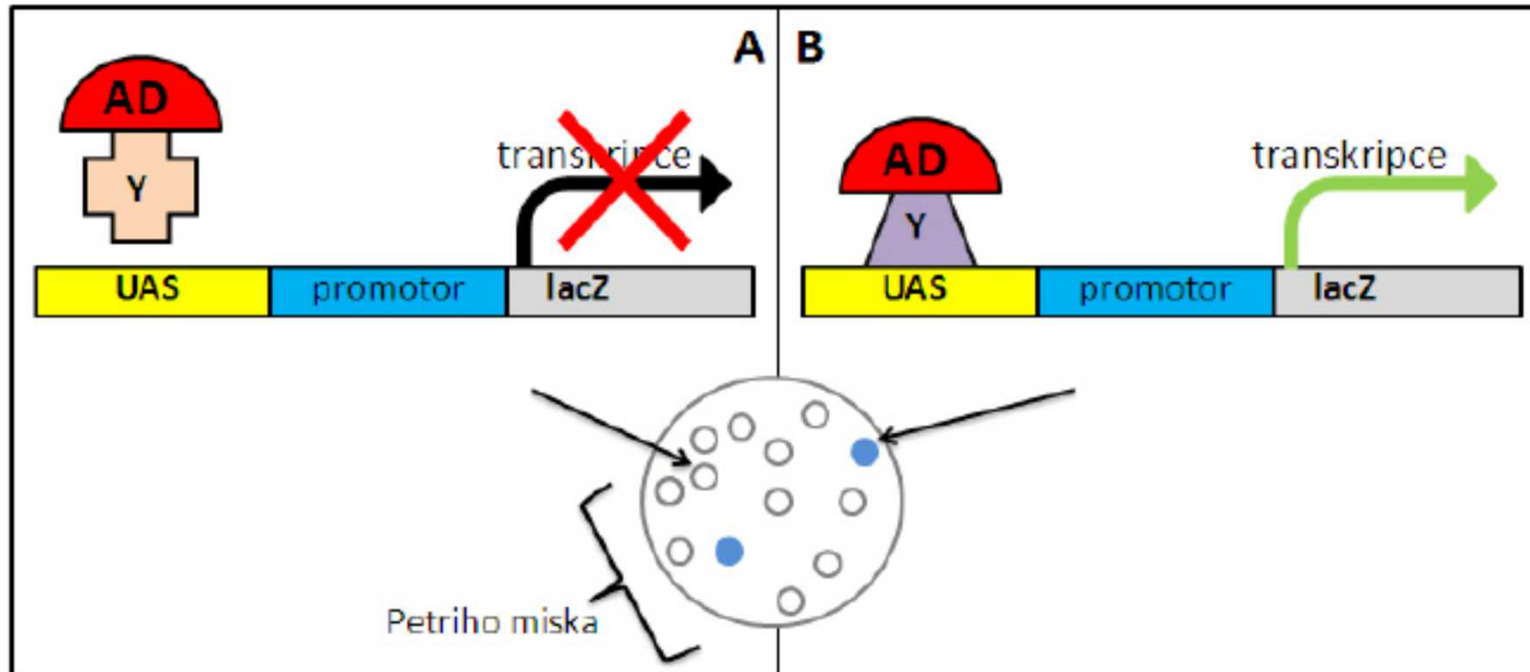
- různé kvasinky využívají různé cukry (viz přednáška o určování kvasinek)
- *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. castellii*, *S. kluyveri*, a *K. lactis* využívají galaktosu – mají všechny *GAL* geny
- *S. kudriavzevii*, *C. glabrata*, *K. waltii*, a *E. gossypii* nemohou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

Transkripční aktivátor Gal4p



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

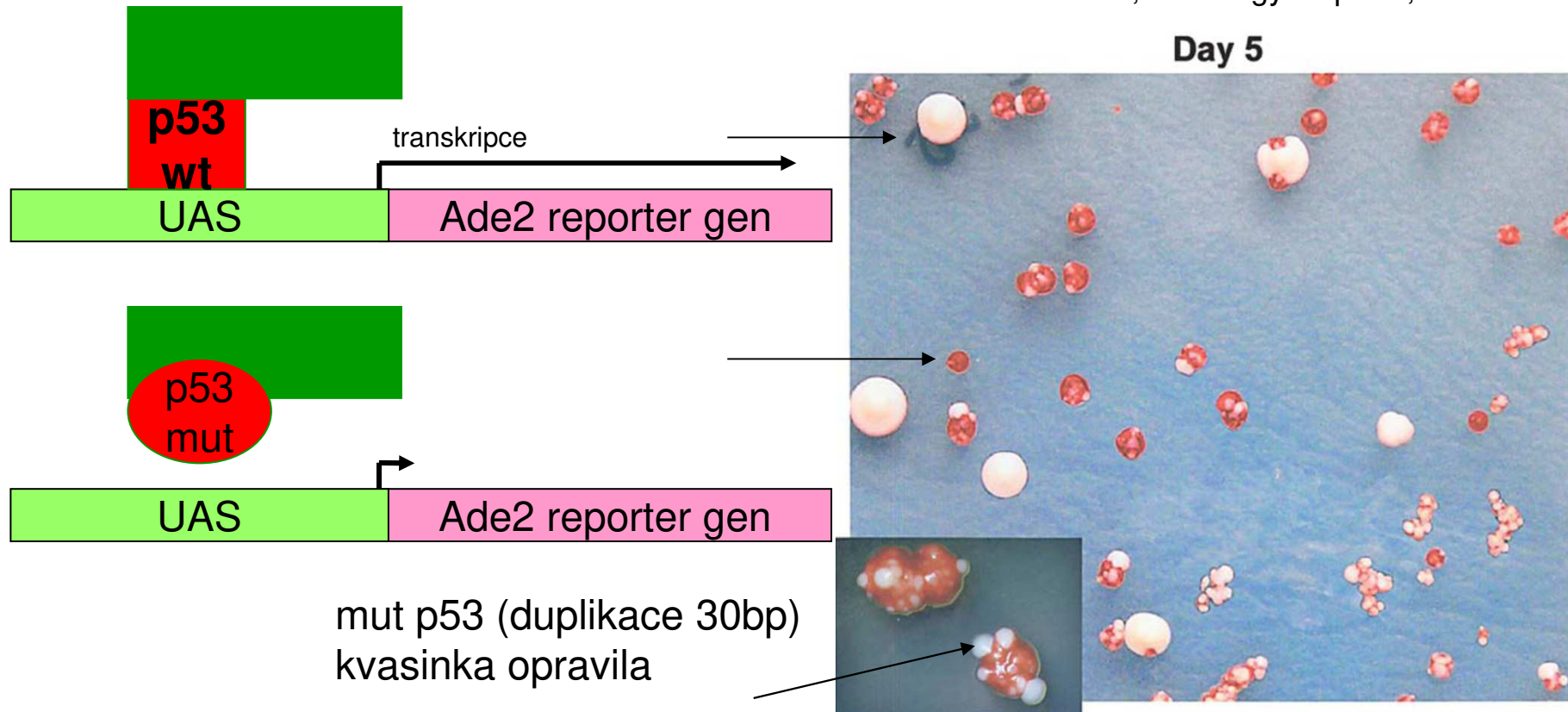
Vznik 1-hybridních systémů



Různé transkripční faktory mají DBD a AD domény a lze je kombinovat ...

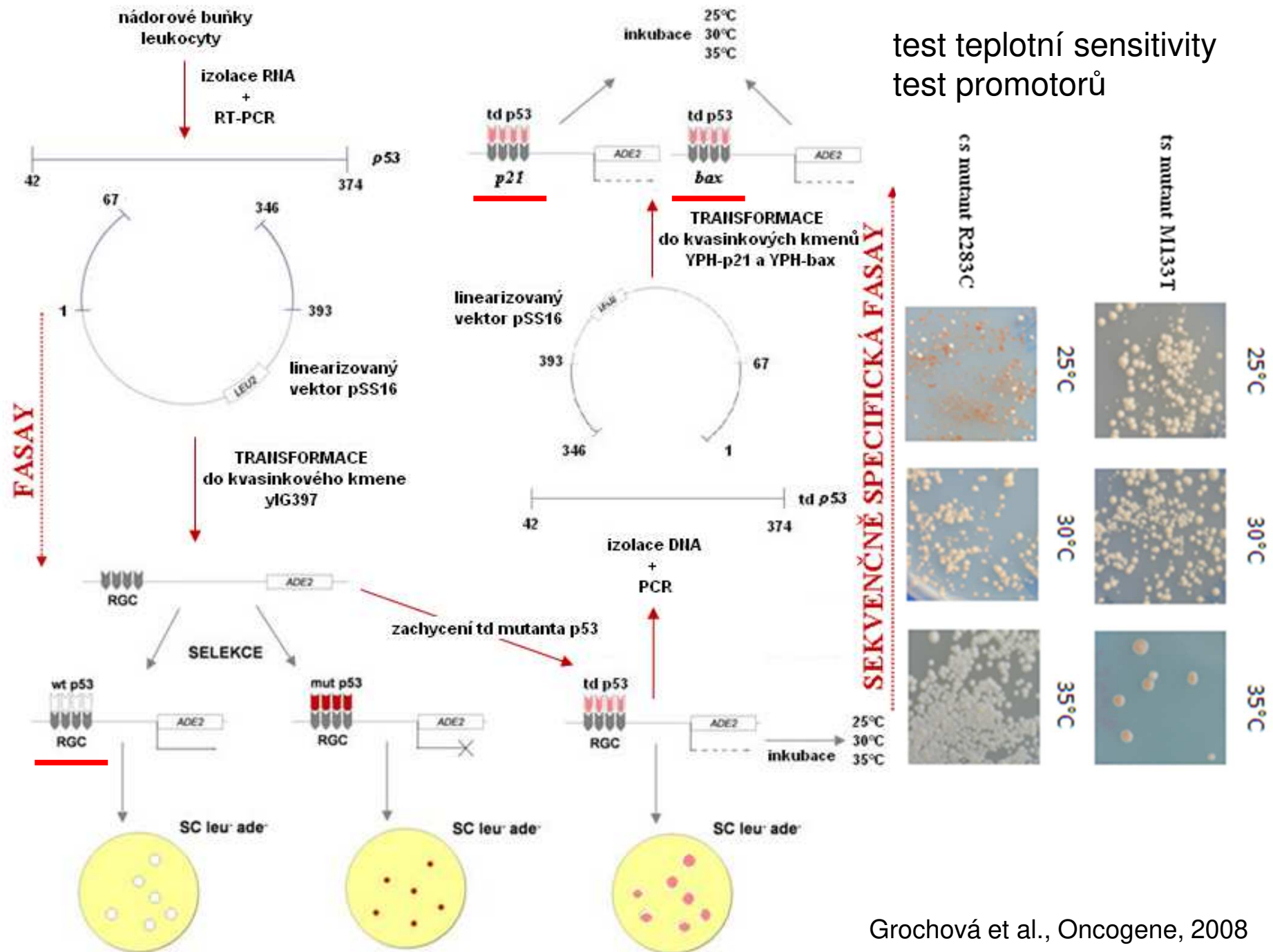
Lze hledat DNA-vazebné proteiny pro danou UAS sekvenci (AD-hybridní knihovny)

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



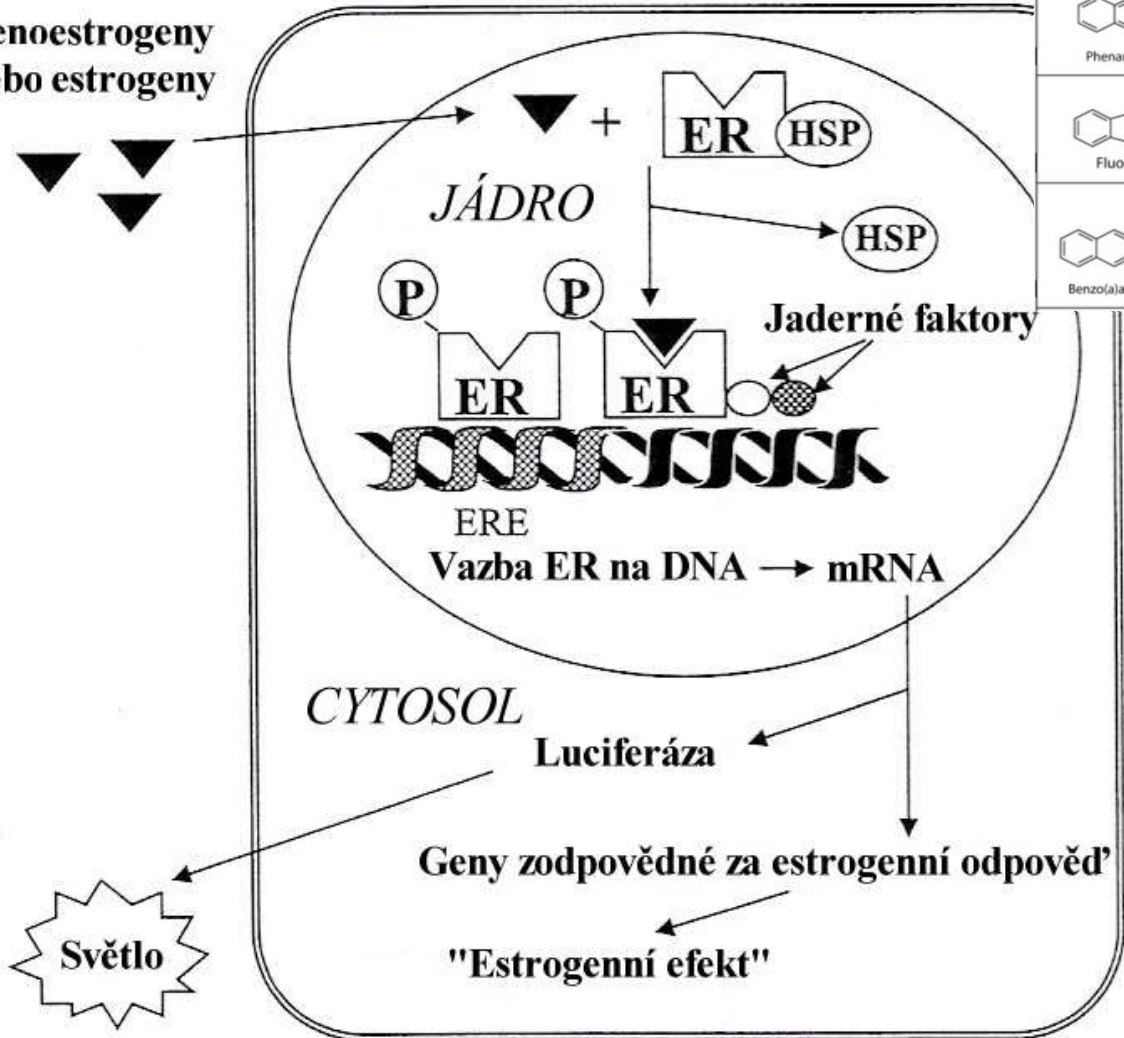
Analýza funkčních vlastností p53

- stanovení aberací p53 v klinickém materiálu - imunoanalýza, FISH, sekvenace
- 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>c1ccc2cc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Fluorene			<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Carbazole		
<chem>c1ccc2cc3cc4ccccc4cc3cc2c1</chem> Benzo(a)anthracene	<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Benzo(a)acridine			<chem>c1ccc2nc3ccccc3cc2n1</chem> Benzo(c)acridine	

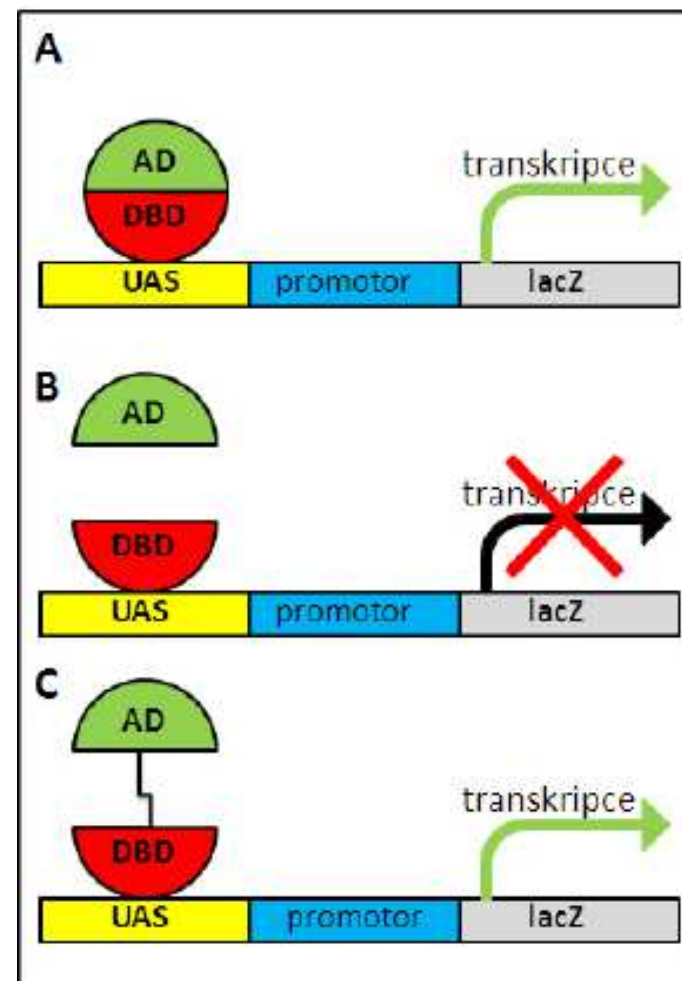
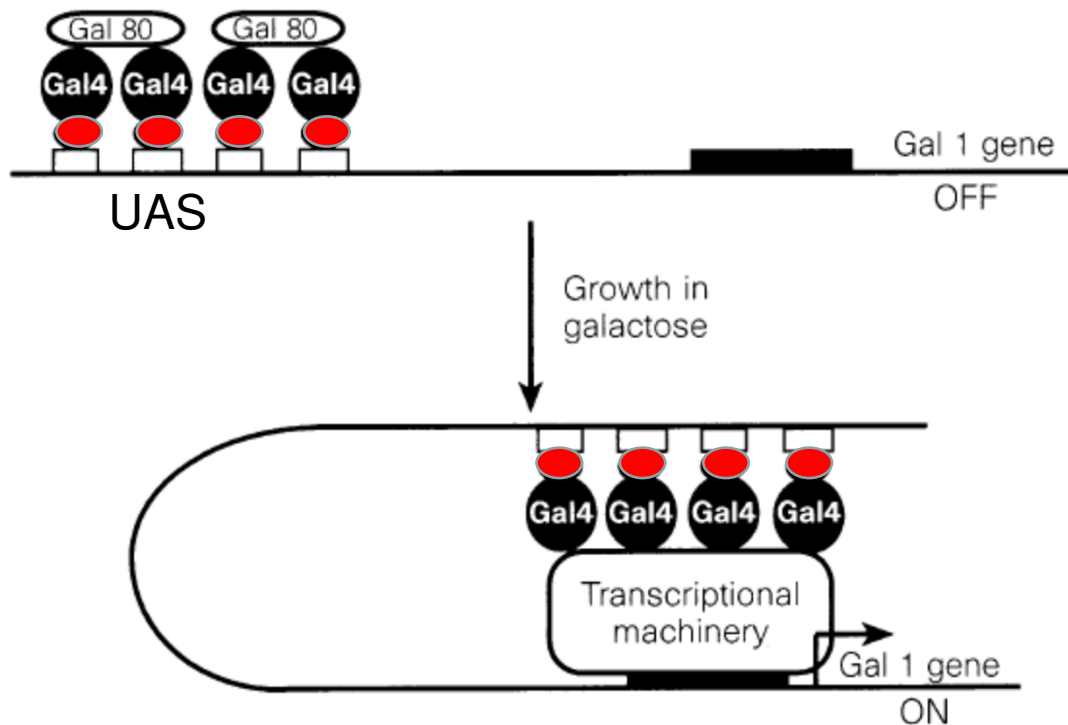
V tomto systému byly testovány různé polutanty – efekt na „estrogenní“ dráhu

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

Bartos et al, Env Tox, 2006

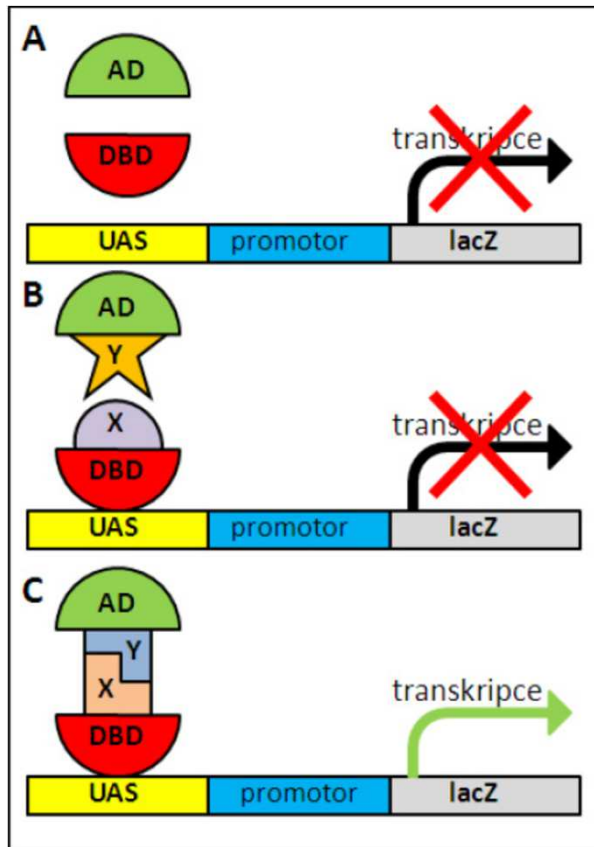


Transkripční aktivátor Gal4p



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

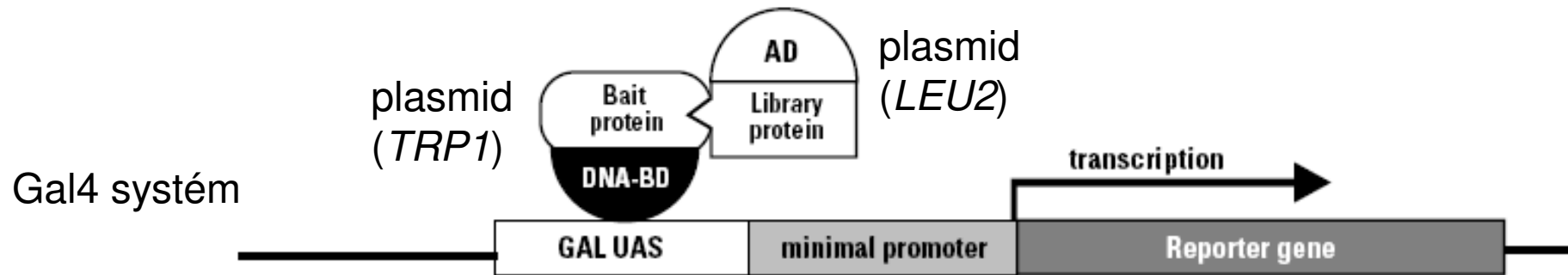


Figure 2. The two-hybrid principle. The DNA-BD is amino acids 1–147 of the yeast GAL4 protein, which binds to the GAL UAS upstream of the reporter genes. The AD is amino acids 768–881 of the GAL4 protein and functions as a transcriptional activator.

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/α

AH109 Constructs

různé promotory

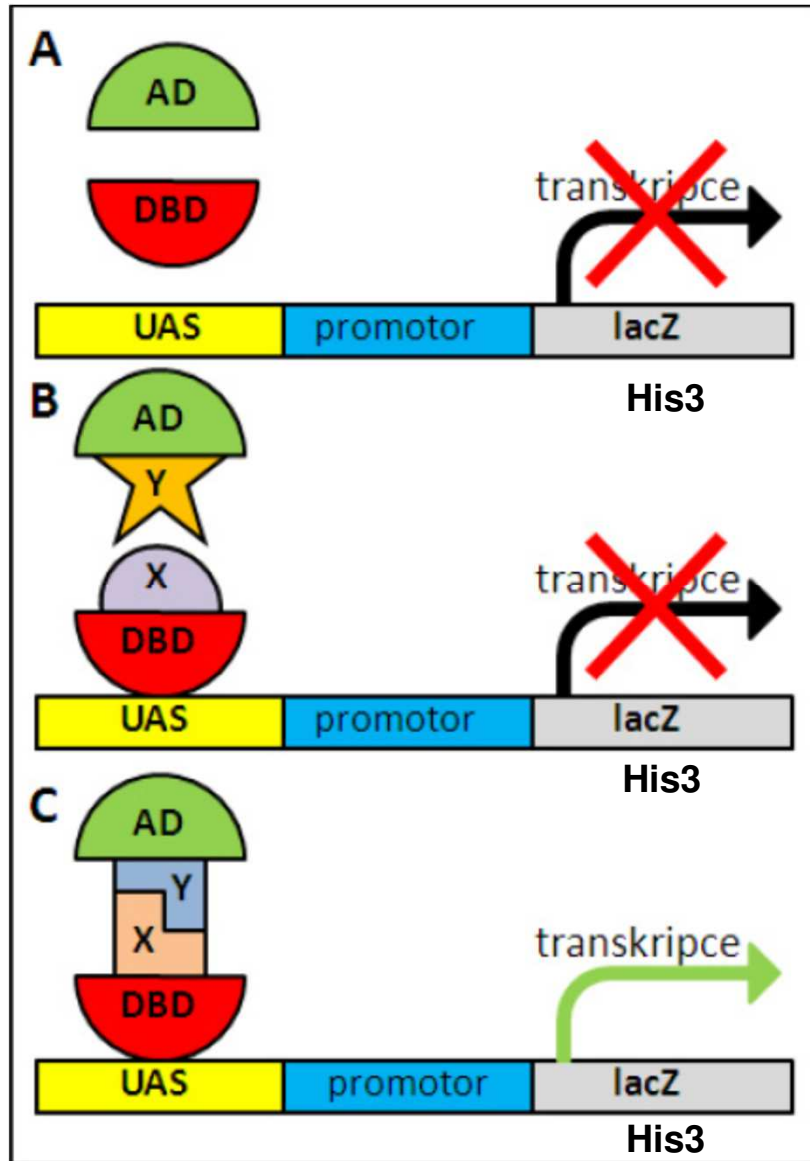
		velmi citlivý (3AT)
	GAL1 UAS	GAL1 TATA
		HIS3
		velmi stringetní
	GAL2 UAS	GAL2 TATA
		ADE2
		semikvanitativní (β-gal)
	MEL1 UAS	MEL1 TATA
		lacZ
	MEL1 UAS	MEL1 TATA
		MEL1

Reportérové geny

Reporter genes

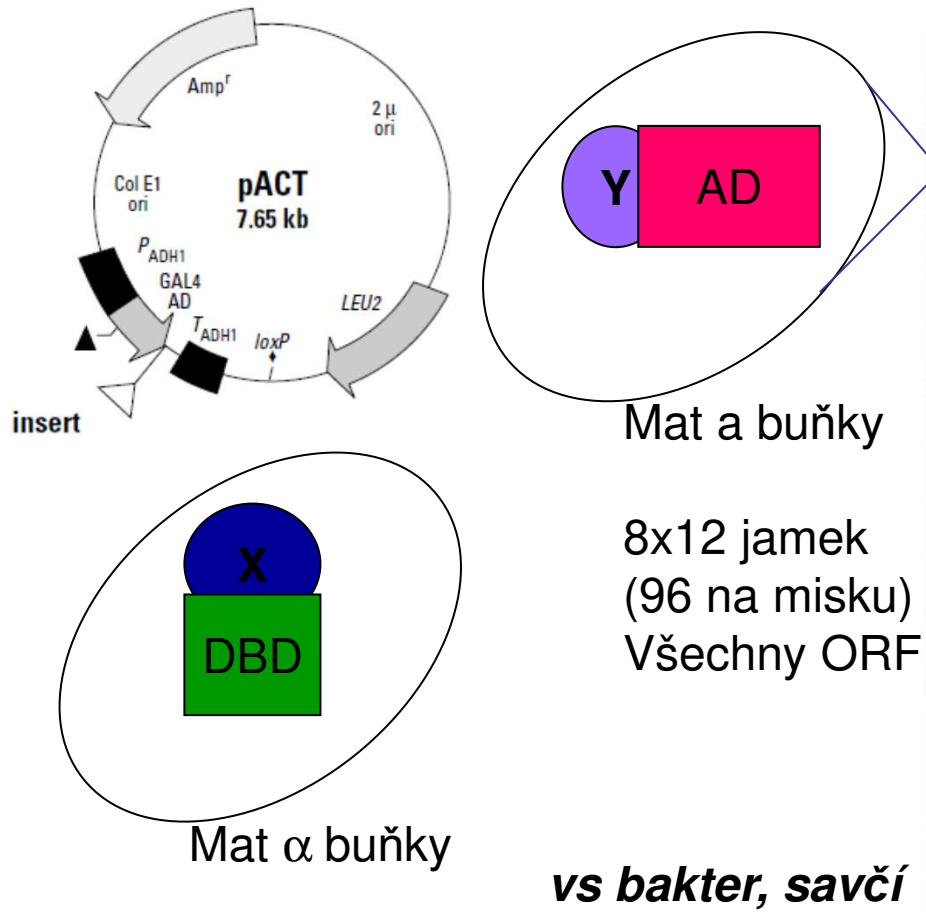
<i>E. coli lacZ*</i>	β -Galactosidase chromogenic reporter (178)	
<i>S. cerevisiae MEL1</i>	Secretory α -galactosidase chromogenic reporter (5)	kvantitativní
<i>E. coli gusA</i>	β -Glucuronidase chromogenic reporter (580)	
<i>Aspergillus oryzae lacA3</i>	Engineered secretory β -galactosidase chromogenic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

2-hybridní systém

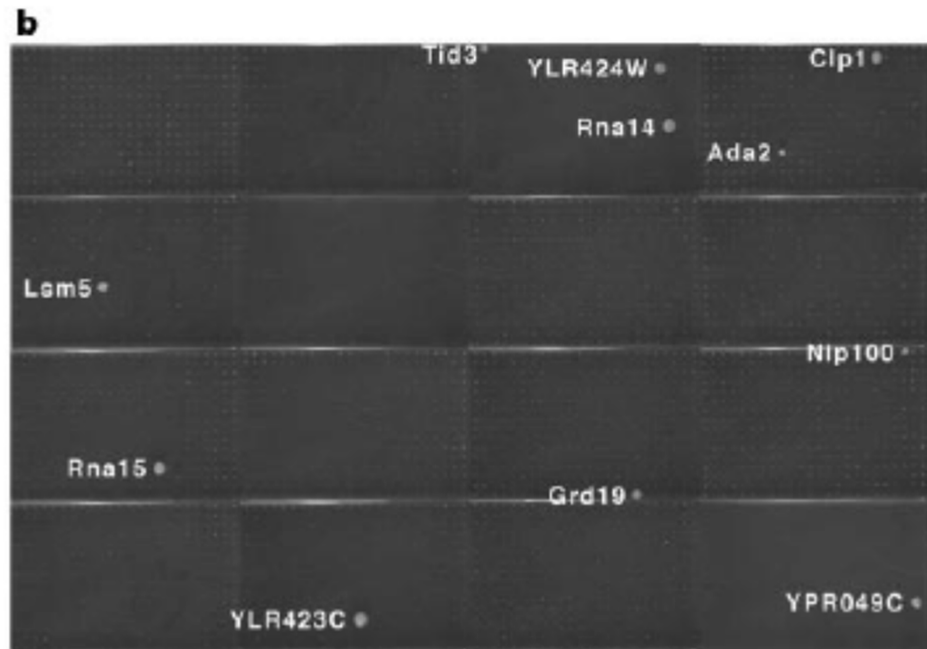
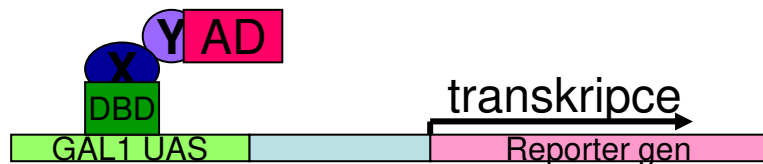


60 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
30 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
20 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
15 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
10 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
5 mM 3-AT (- Leu, Trp, His)			
Kontrola (- Leu, Trp)			
	BD-Nse3 + V1AD	BD-Nse3 + AD-Nse1 (1-116)	VBD + AD-Nse1 (1- 116)

Kvasinkový „INTERACTOME“

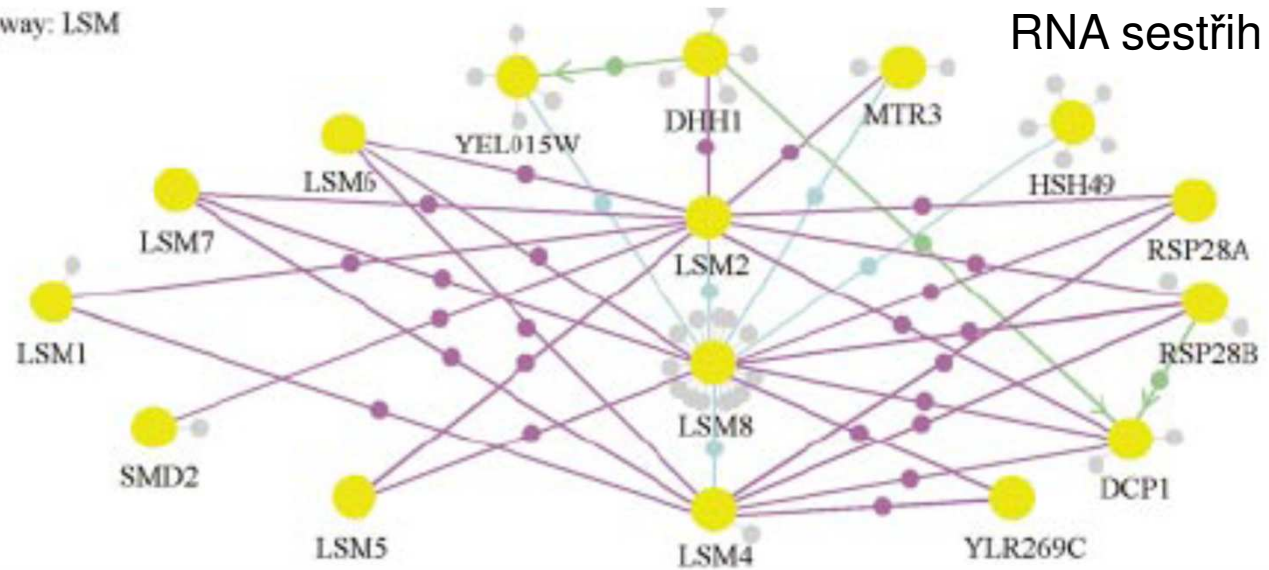


Místo transformací dvou plasmidů do jedné buňky byly BD plasmidy v α buňkách a AD v a buňkách – párováním byly vytvořeny jejich kombinace

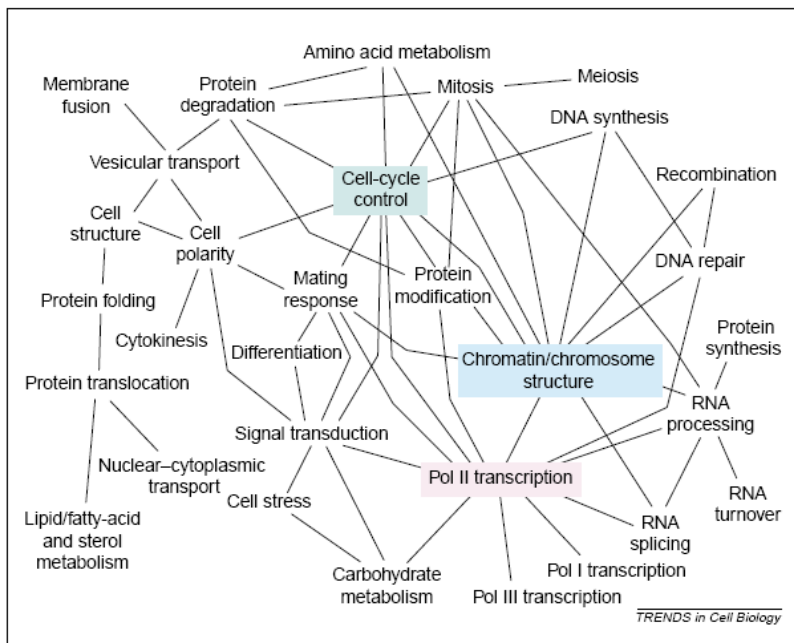


Protein „networks“

Pathway: LSM



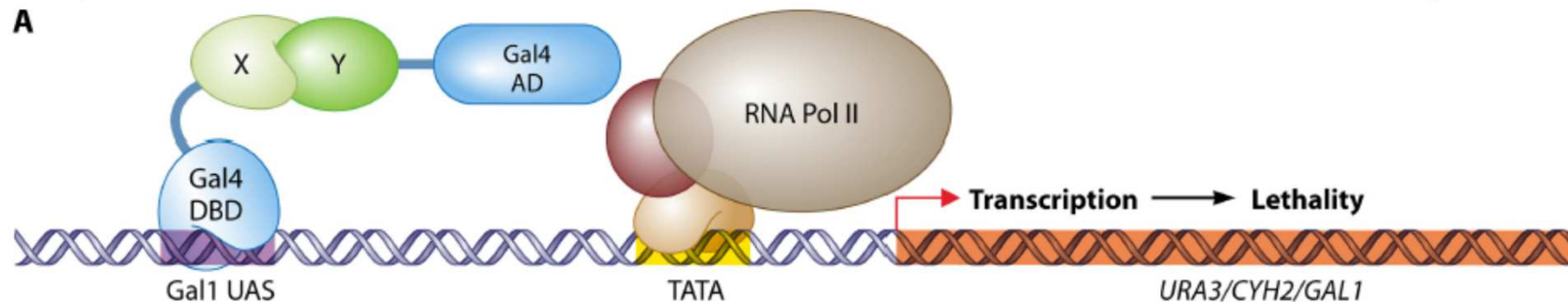
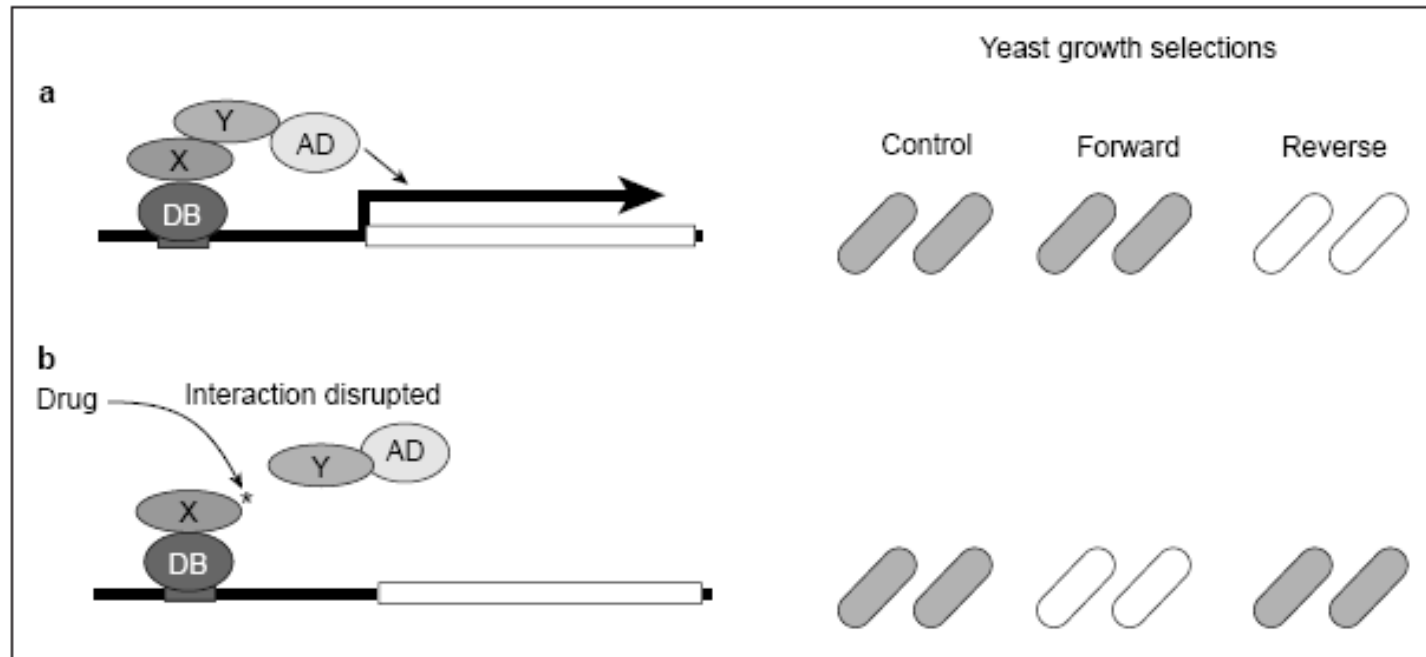
RNA sestřih



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

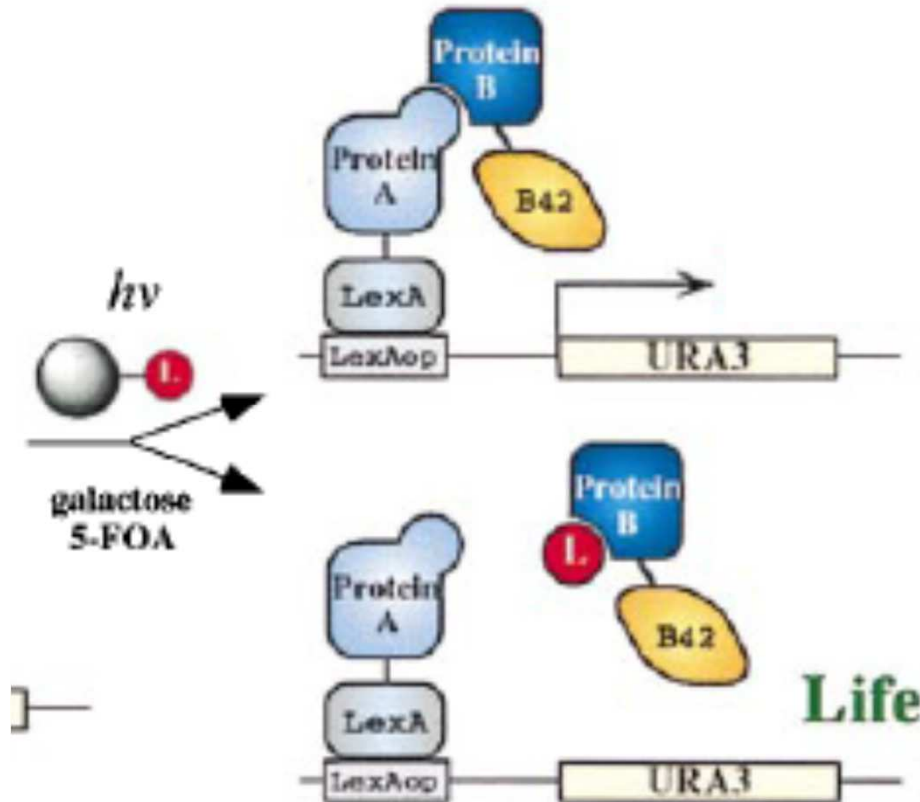
Network/sít' naznačuje funkční vztahy
Tucker et al, TiCB, 2001

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)

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)

Split-hybrid systém

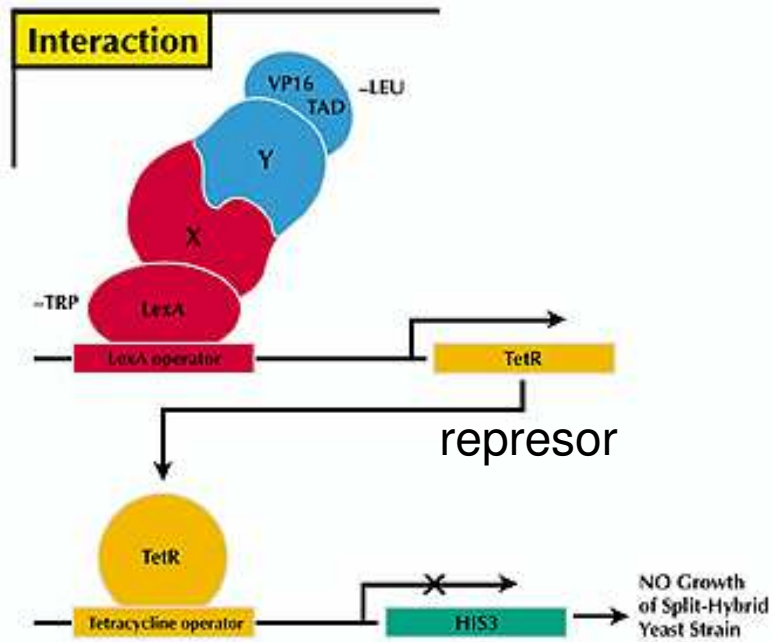


Fig. 1
Protein X is fused to the LexA DNA binding domain and Protein Y is fused to the transcriptional activator domain, VP16-TAD. Interaction between X and Y leads to the expression of the tetracycline repressor protein TetR. TetR expression prevents transcription of the HIS reporter gene making cells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

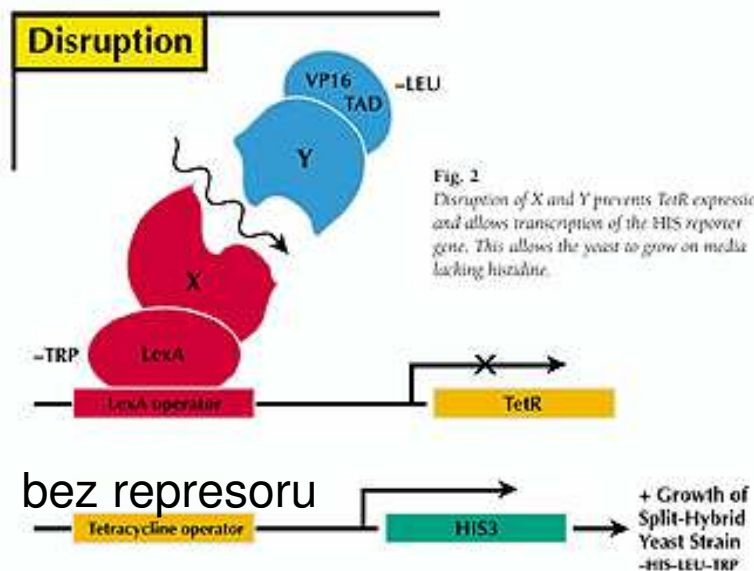
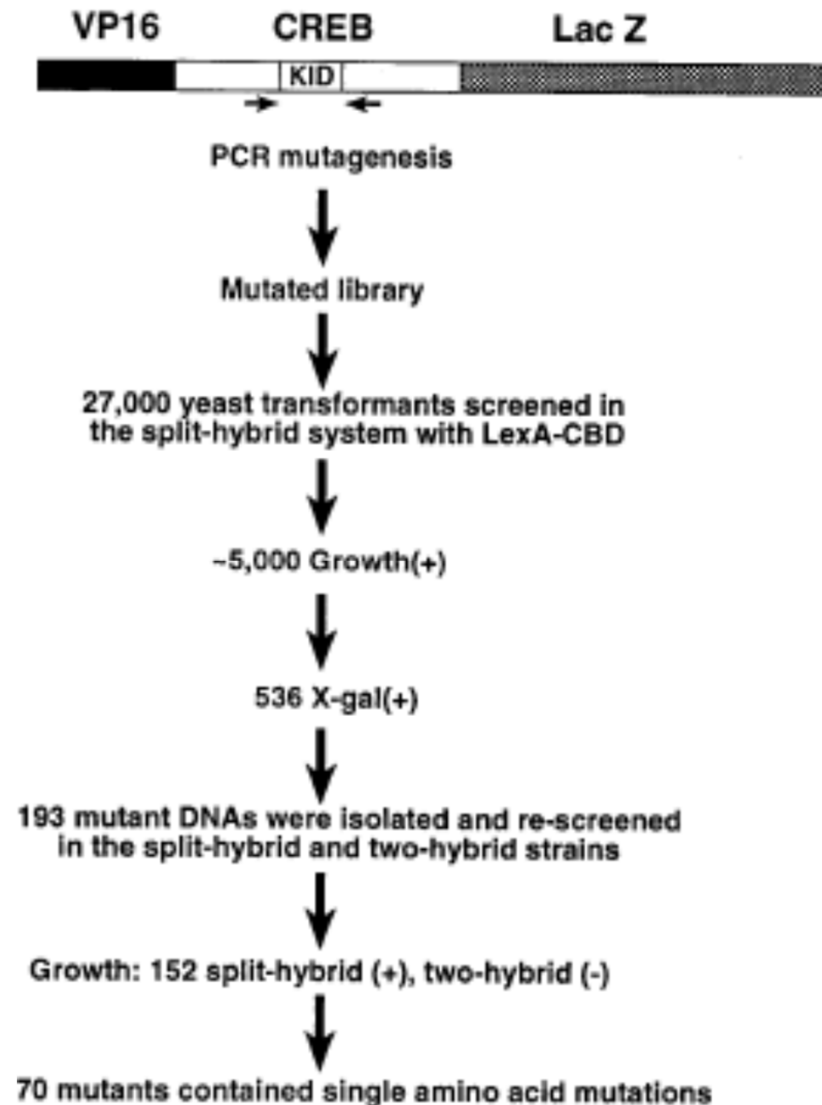
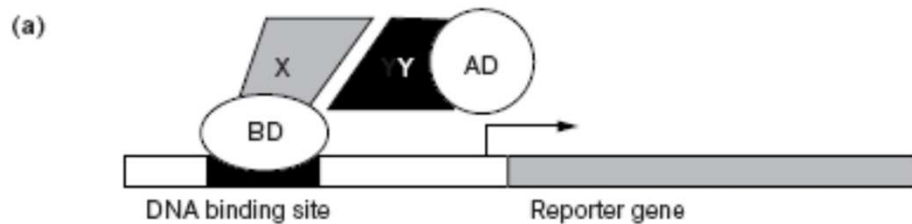
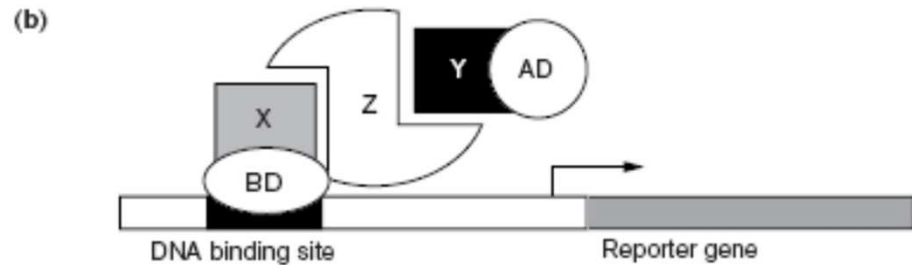


Fig. 2
Disruption of X and Y prevents TetR expression and allows transcription of the HIS reporter gene. This allows the yeast to grow on media lacking histidine.

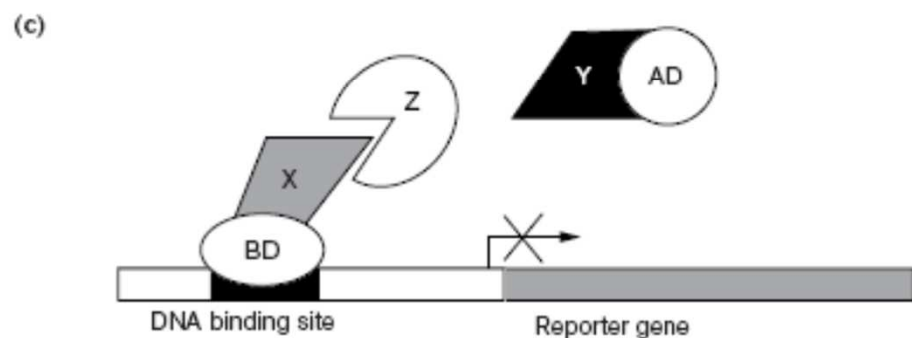




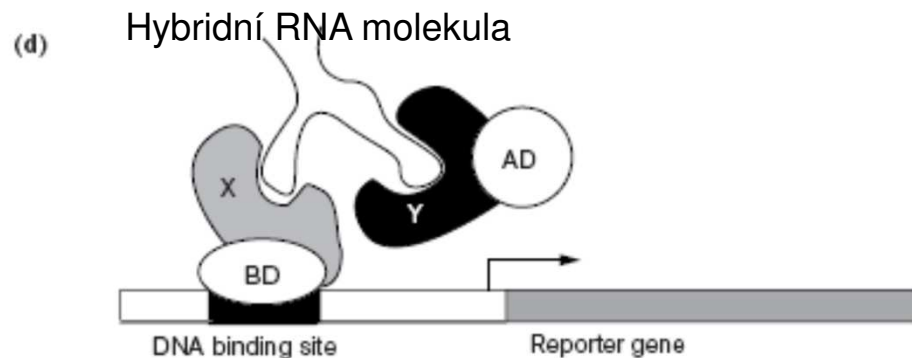
Klasický dvoj-hybridní systém



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

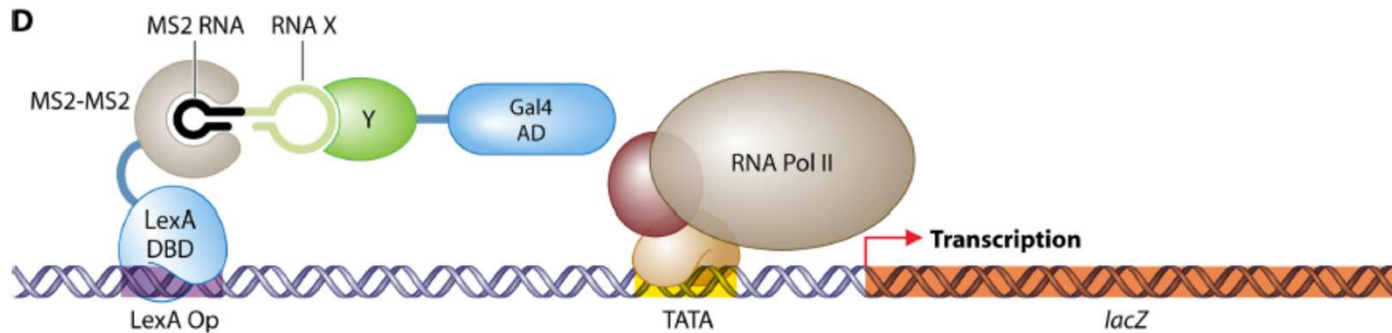


Dvoj-hybridní systém
- proteinový inhibitor interakce



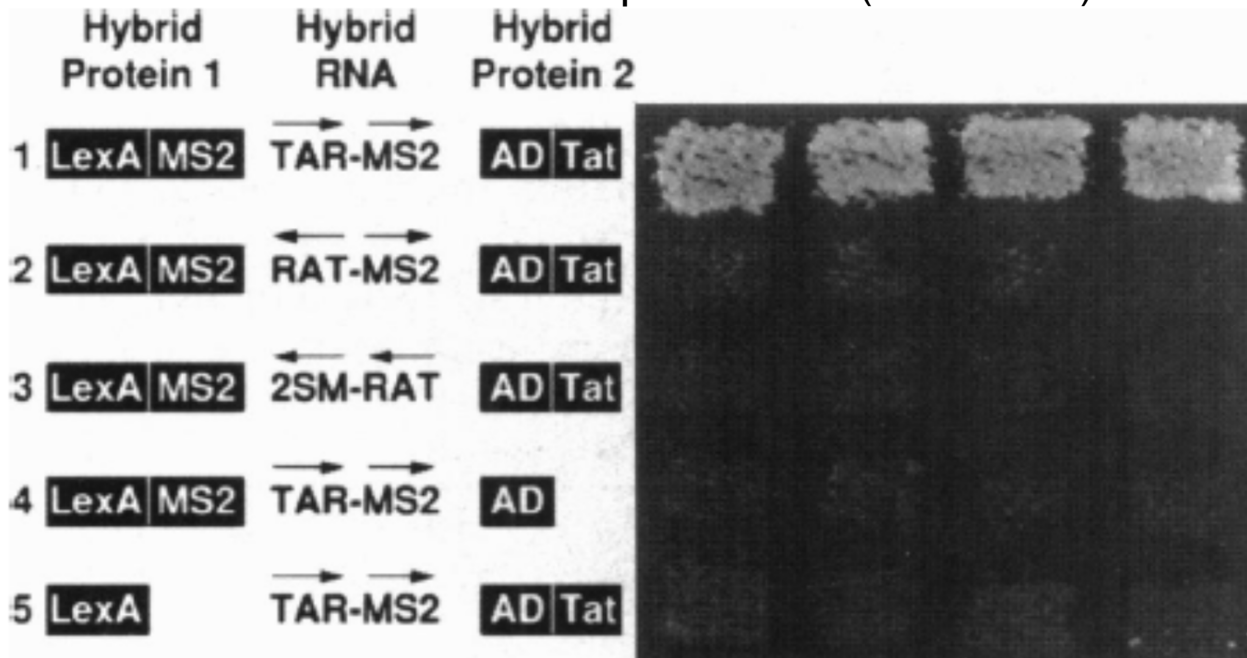
Troj-hybridní systém
– RNA interakce
- ligand/receptor

Analýza vazby protein-RNA (Y3H)

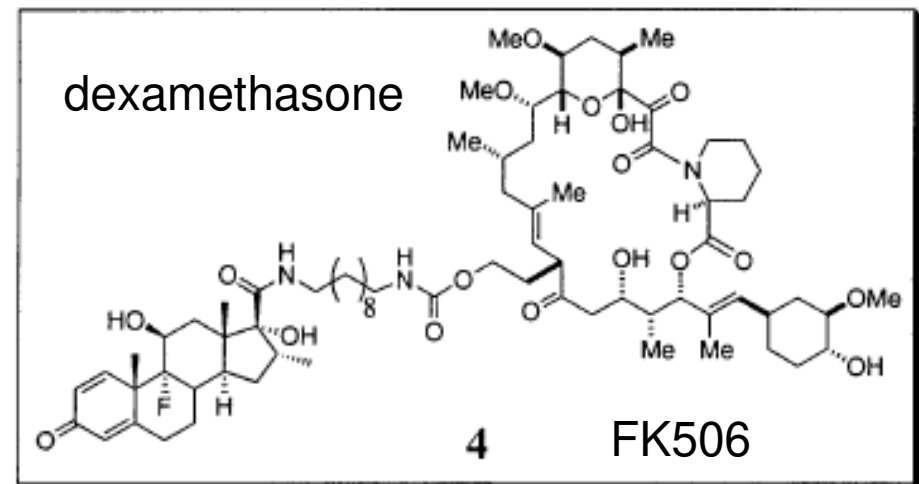
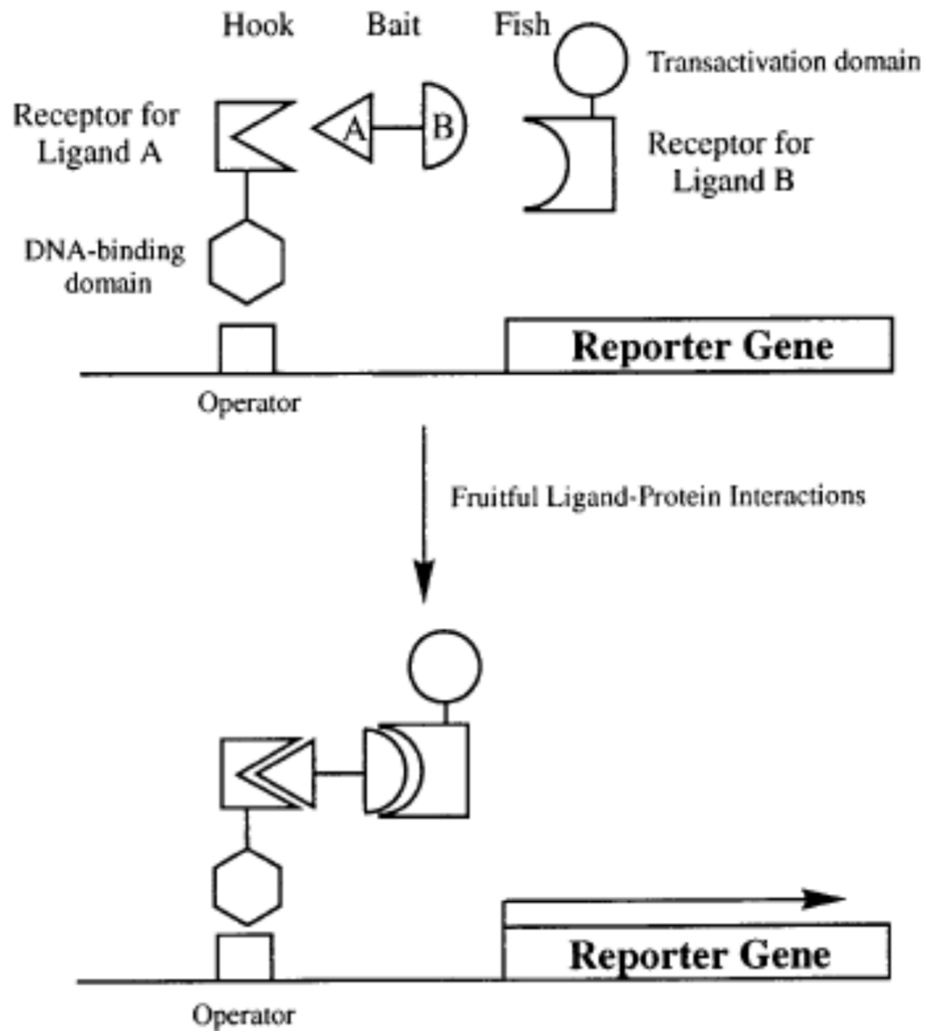


Tři hybridní/fúzní konstrukty:

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)



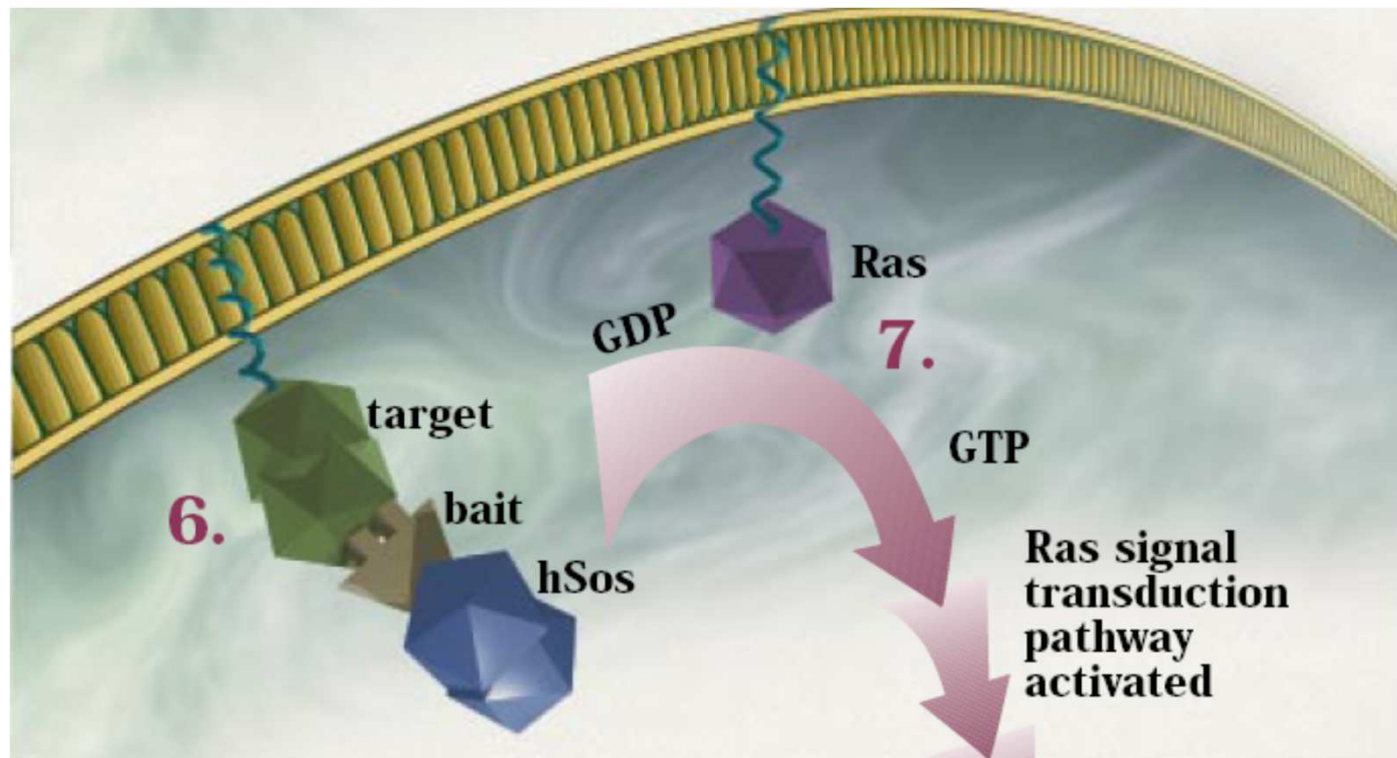
Tři hybridní/fúzní konstrukty:

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

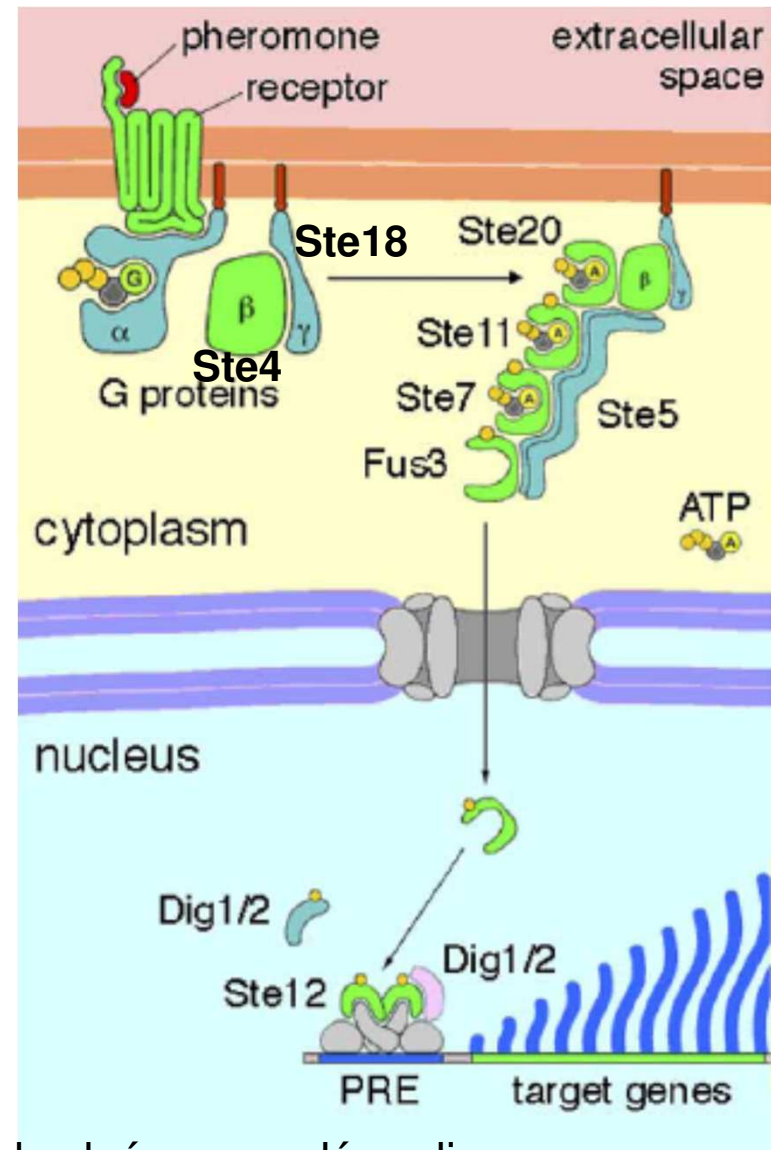
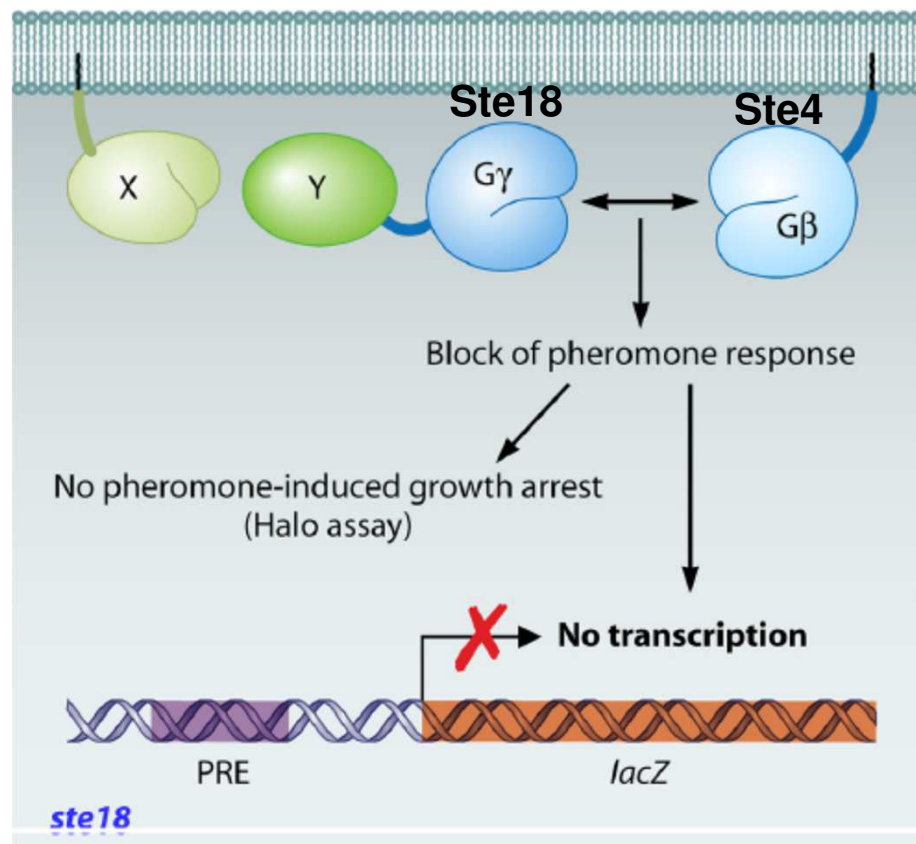
Kvasinkový *cdc25-2* ts mutant – lidský hSOS (guanine exchange factor) aktivuje RAS pokud je ukotven na membránu v jeho blízkosti

- 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 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)

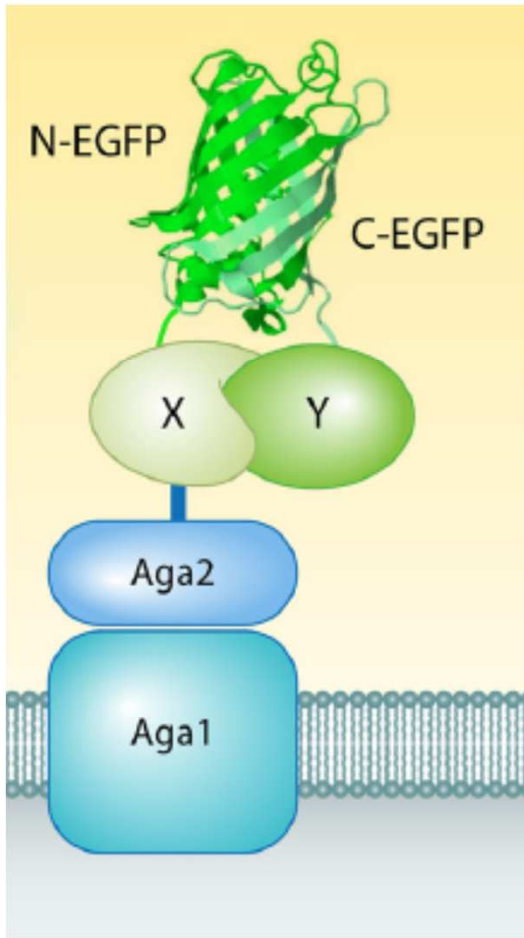


vhodný pro analýzu disrupce

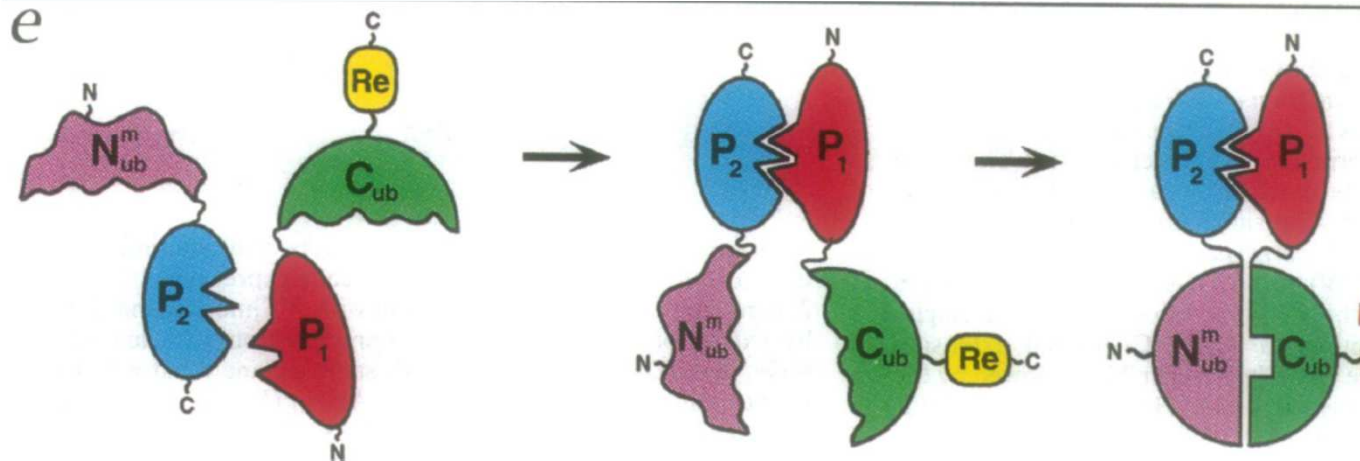
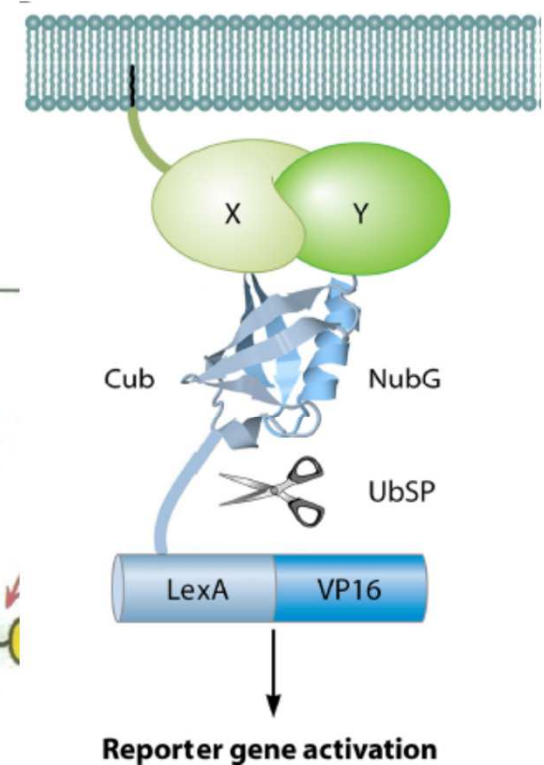
Komplementace proteinů

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

