

Экспрессия генов в клетках дрожжей

А.Г.Евстафьева

Эукариотические системы хозяин – вектор: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

Получение лекарств и пищевых веществ;

Суррогатная дрожжевая генетика;

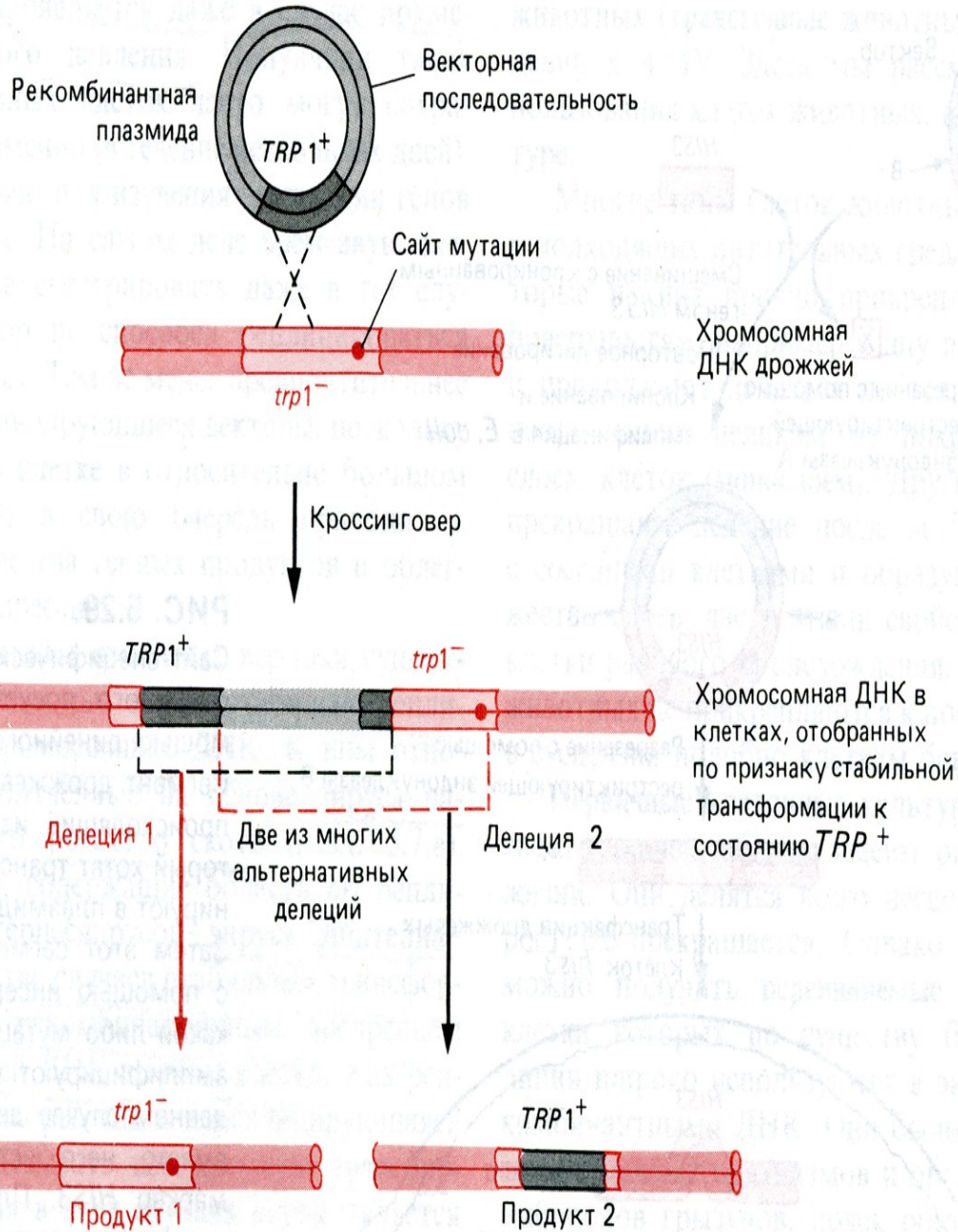
Пост-трансляционные модификации (гликозилирование по участку Asn-X-Ser/Thr в процессе секреции – присоединяются остатки маннозы)

Дрожжевые векторы:

1. YIp интегративные
2. YEр эписомальные
3. YRp репликативные
4. YCr центромерные
5. YAC дрожжевые искусственные хромосомы

Селективные маркеры:
URA3, LEU2, TRP1, HIS3

1. Интегративные плазмиды



2.Эписомальные плазмиды

2 мкм – плазида дрожжей (6318 bp);

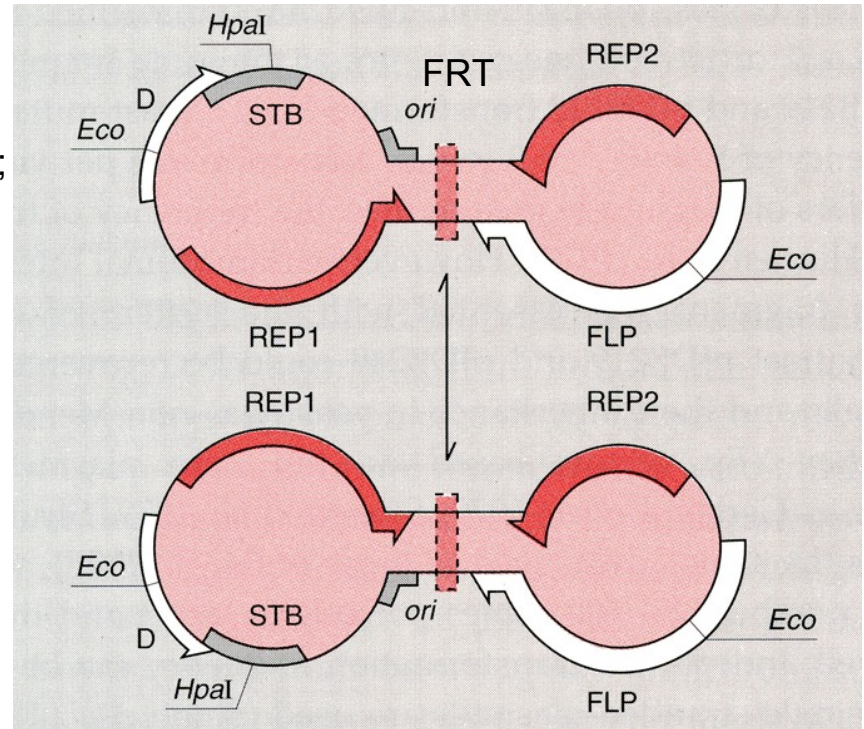
ori – ориджин репликации;

REP1, *REP2* – гены, участвующие в репликации,

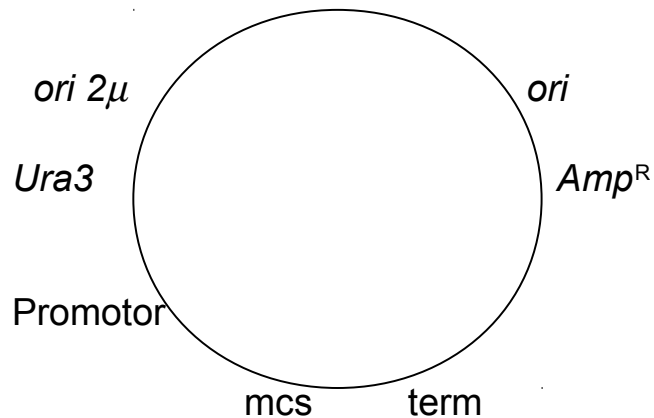
D – локус амплификации (50-100 копий на клетку);

STB – локус, обеспечивающий равное распределение плазмид между материнской и дочерней клетками;

FLP – сайт-специфическая рекомбиназа.



Шатл-векторы:



Репликативные (3) и центромерные (4) плазмиды

YRp:

ARS – autonomously replicating sequence;

1-20 копий на клетку;

Нестабильность (ассоциированы с материнской клеткой).

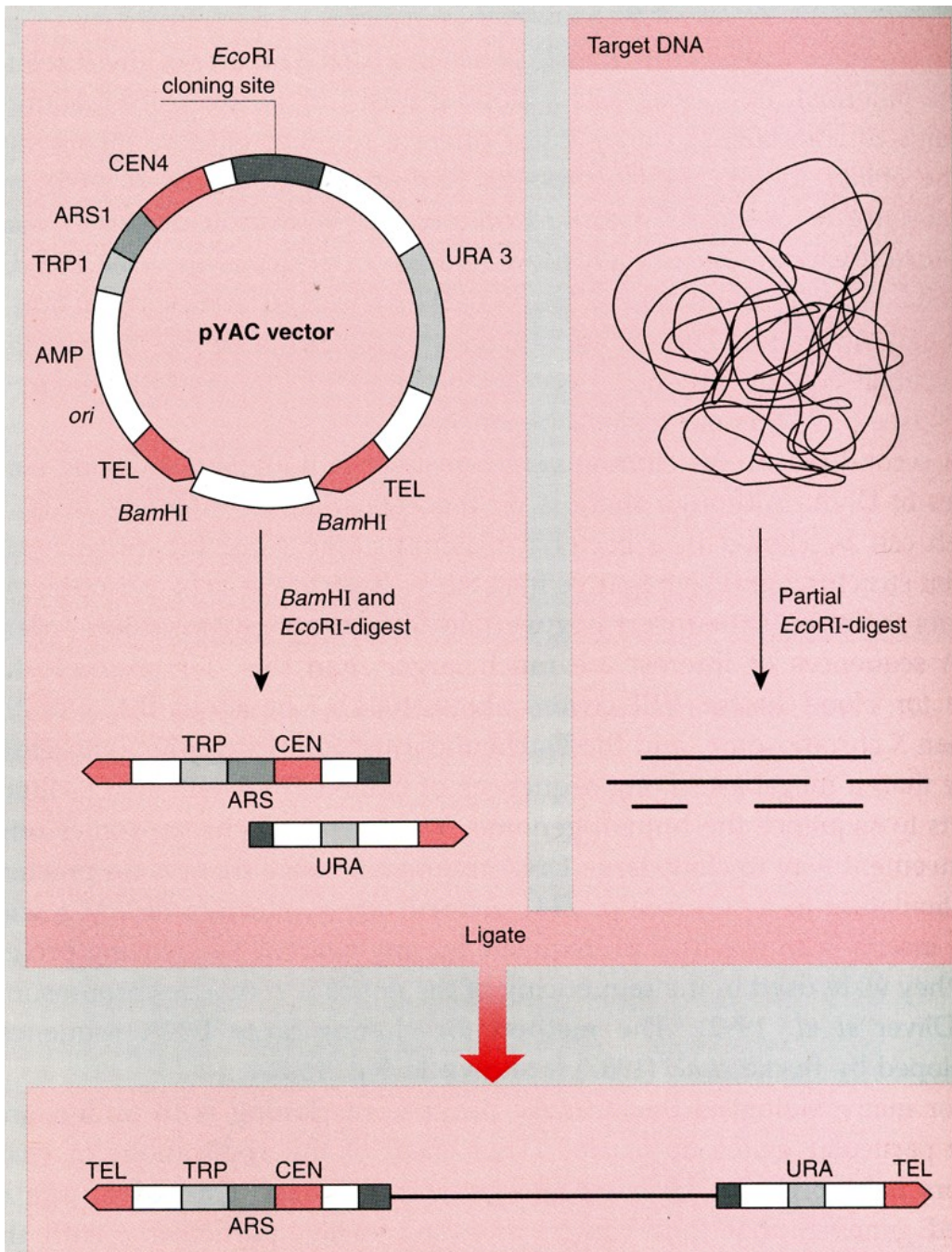
YCp:

CEN – центромерные участки;

1-2 копии на клетку;

Стабильность (при мейозе сегрегация по Менделю).

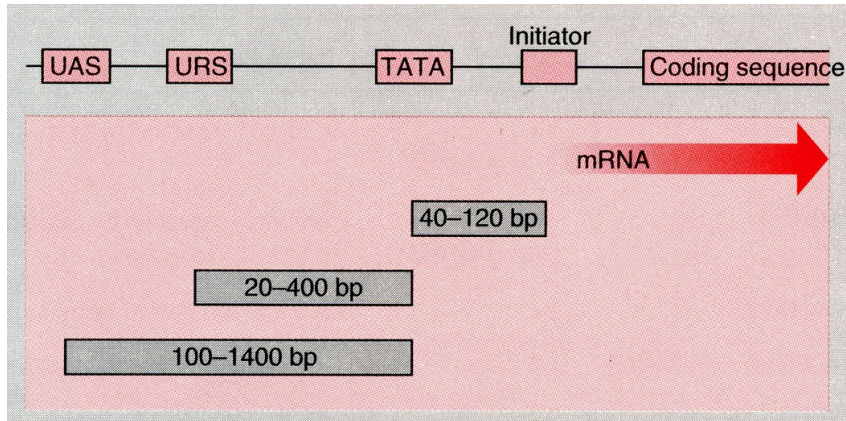
УАС'и



- ТЕL-теломеры;
- 1-2 копии на клетку;
- Стабильность возрастает с длиной вставки.

Экспрессия в клетках дрожжей

Дрожжевые промоторы



Трансляция:

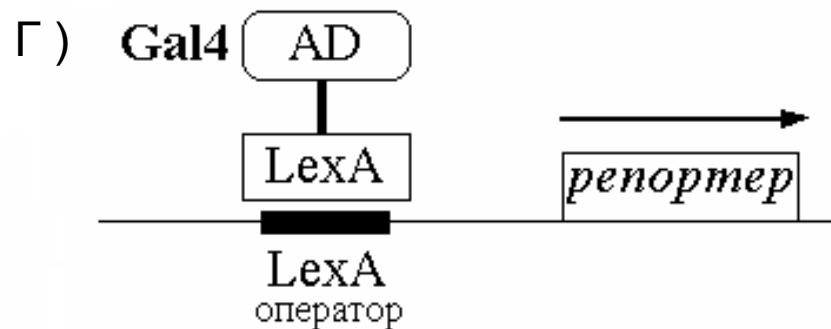
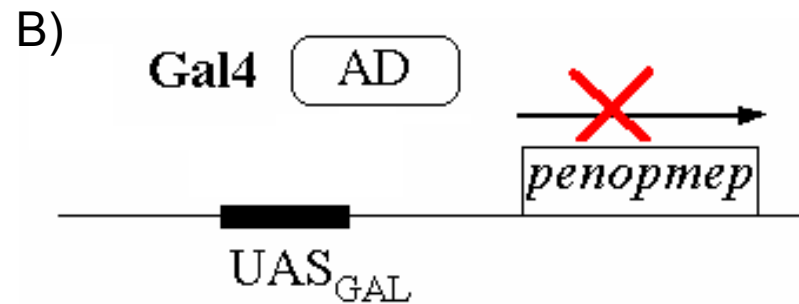
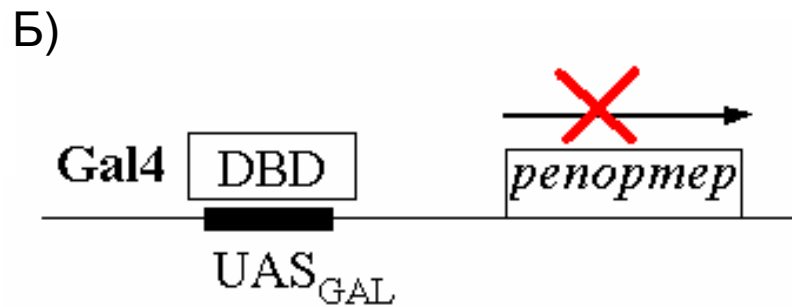
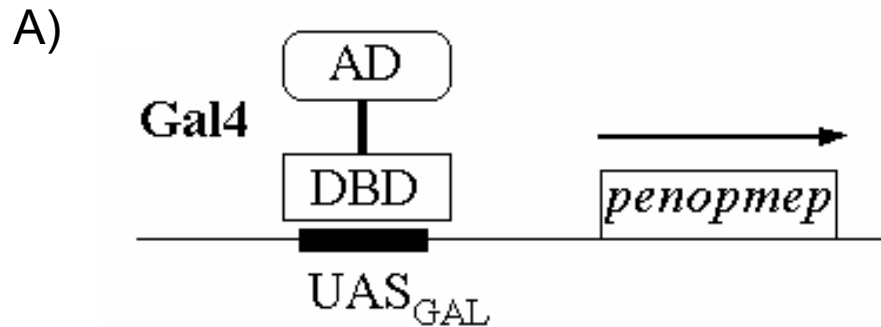
5' – Cap-----A₋₃ NN **ATG** G₄-----

Промотор	сила	регуляция
PGK (фосфоглицераткиназный)	4+	20-кратная индукция глюкозой
GAL1 (галактокиназный)	3+	1000-кратная индукция галактозой (репрессия глюкозой)
PHOS (кислой фосфатазы)	2+	200-кратная репрессия фосфатом
ADH (алкогольдегидрогеназный)	2+	конститутивный
CUP1 (металлотинеиновый)	+	20-кратная индукция ионами меди
MET25 (метиониновый)	+	регулируется концентрацией метионина

Двухгибридная система

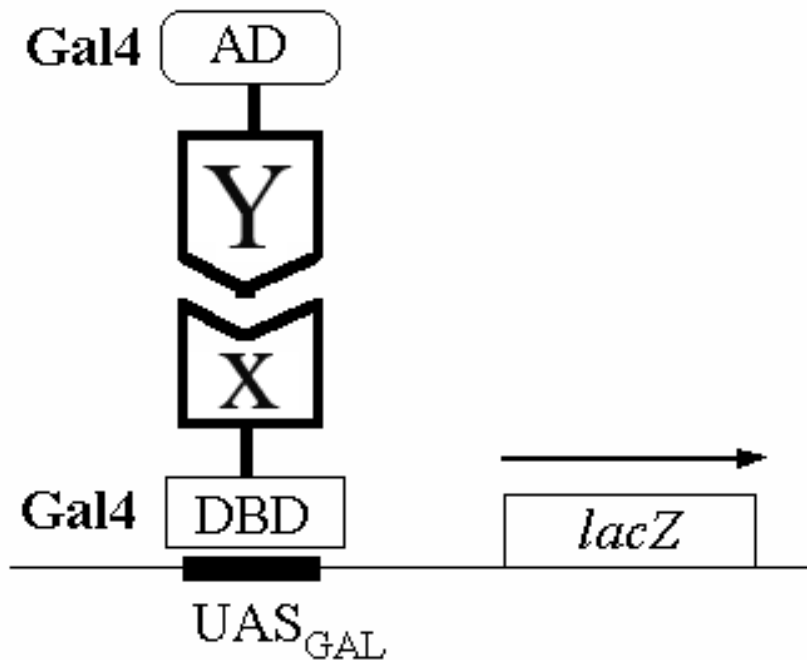
- Fields S. & Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature, 340, 245-247.
- **Дрожжевая двугибридная система** – метод, позволяющий не только исследовать взаимодействие пары известных белков, но и **искать новые взаимодействующие белки *in vivo***, используя дрожжевую клетку, как живую пробирку.

Доменная структура дрожжевого активатора транскрипции Gal4

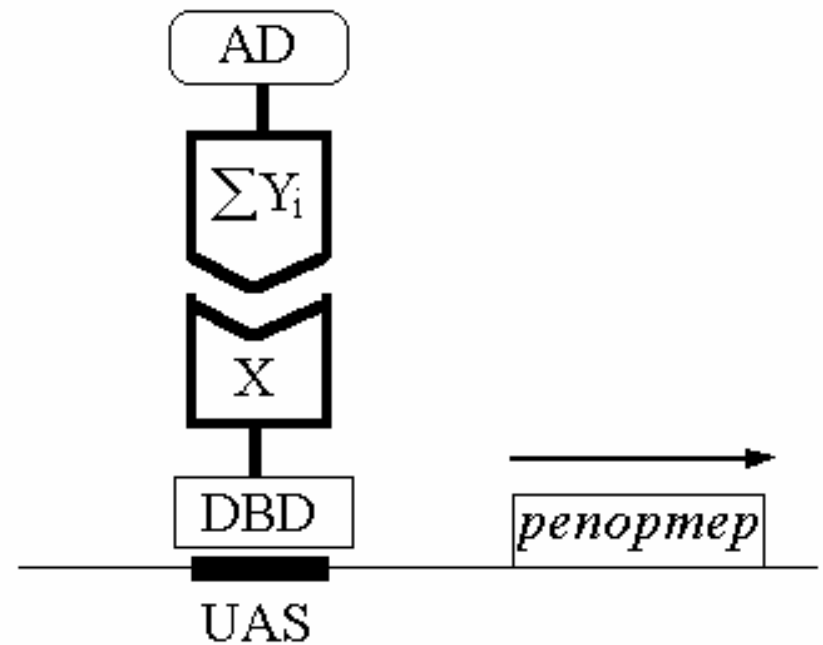


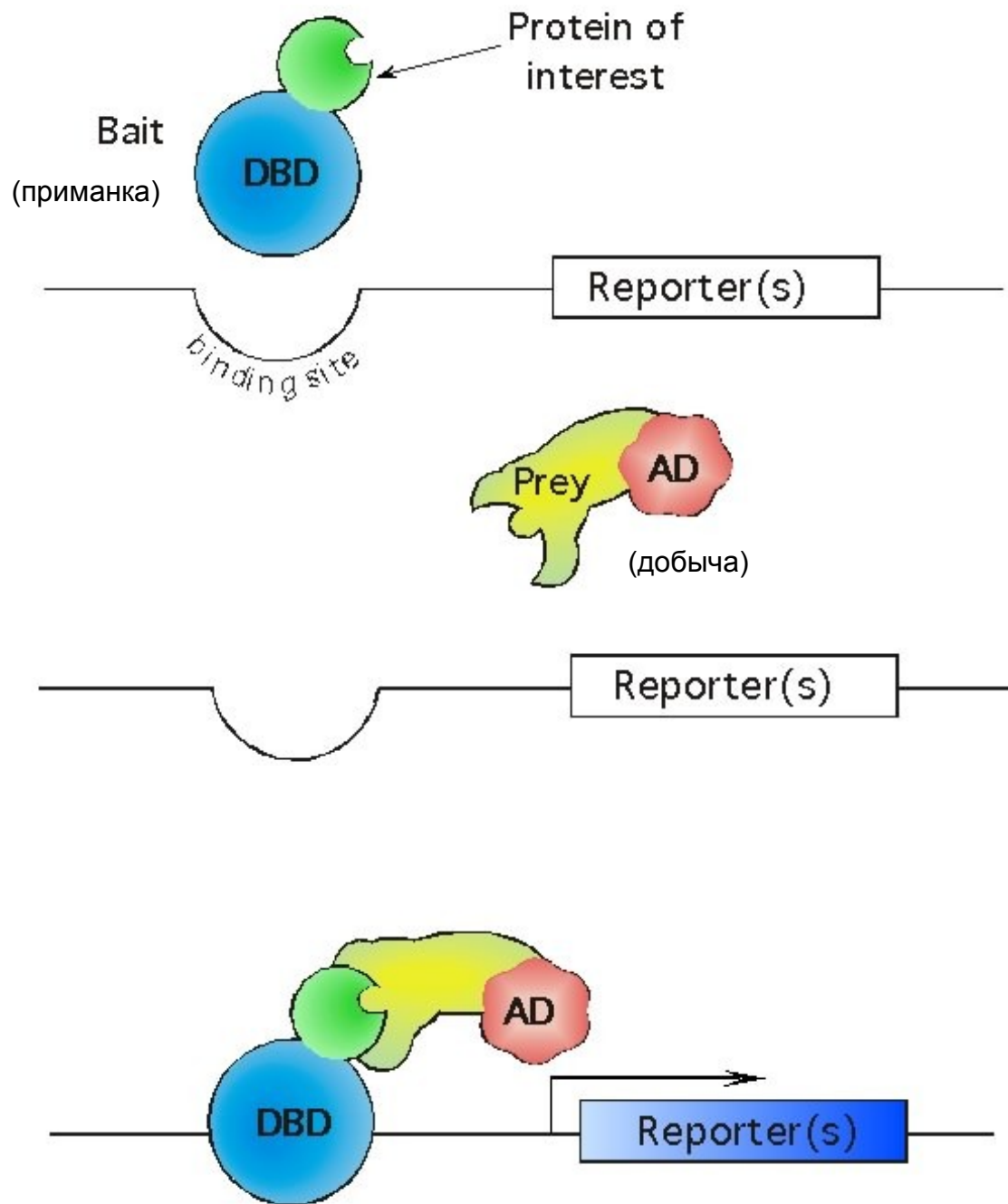
Модель дрожжевой двухгибридной СИСТЕМЫ

a)

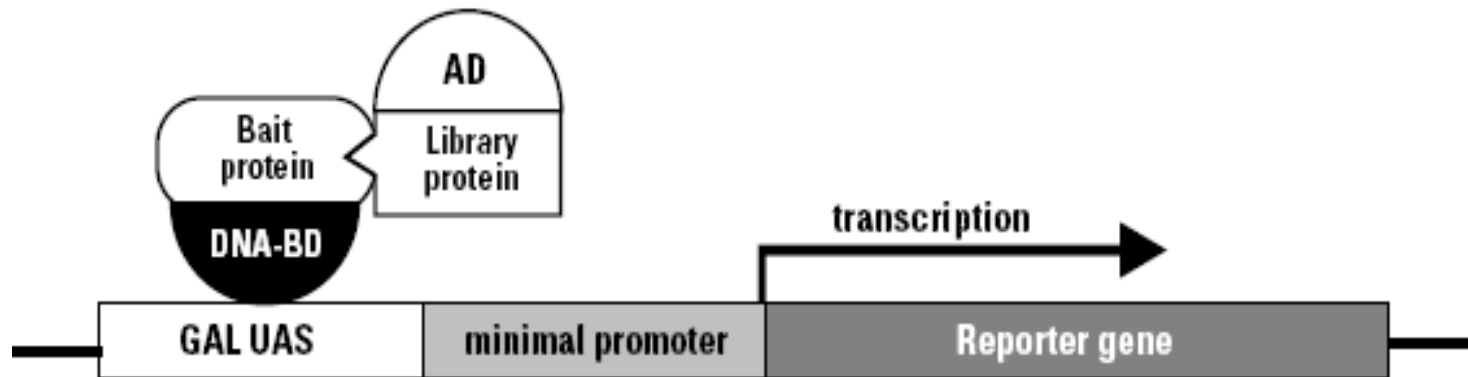


б)





Элементы дрожжевой двугибридной системы



- В качестве ДНК-связывающего домена используют:
 - 1. **DB** домен белка **Gal4** (локализуется в ядре, т.к. содержит NLS);
 - 2. Бактериальный белок **LexA** (не содержит NLS, однако эффективно транспортируется в ядро).
- Оба белка связываются со специфическими сайтами ДНК (UAS Gal или LexA операторами) в виде **димеров**.
- Также используют активирующие домены:
 - 1. Сильный **AD** белка **Gal4**;
 - 2. Очень сильный **AD** белка **P16** вируса герпеса;
 - 3. Слабый бактериальный **AD B42**.

Репортерные гены, используемые в дрожжевой двугибридной системе

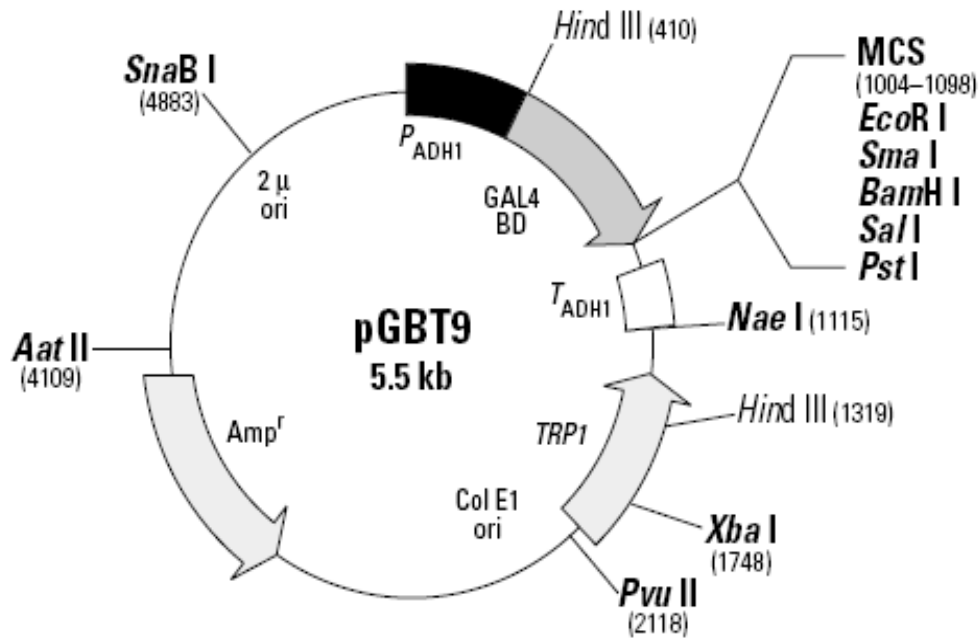
- **1. *lacZ*** – позволяет **количественно** (по величине бета-галактозидазной активности) оценить силу взаимодействия между белками.
- Ген ***lacZ*** может находиться как **на мультিকопийной плазмиде**, так и быть **интегрированным в дрожжевой геном**.
- **2. *HIS3 (LEU2)*** - гены, кодирующие ферменты, необходимые для синтеза определенной аминокислоты. Обычно они **интегрированы в дрожжевой геном**.
- Позволяют проводить **селекцию**. На среде, не содержащей гистидин или лейцин, вырастают только те клоны, в которых в результате взаимодействия двух гибридных белков активируется транскрипция репортерного гена.

-

Схема скрининга библиотеки кДНК для поиска белков, взаимодействующих с белком X

1. Клонирование кДНК белка X в вектор для получения гибридного белка **DBD-X**;
2. Проверка экспрессии **DBD-X** (иммуноблотинг);
3. Тест на автоактивацию **DBD-X**;

Вектор для получения гибридного белка **DBD-X**

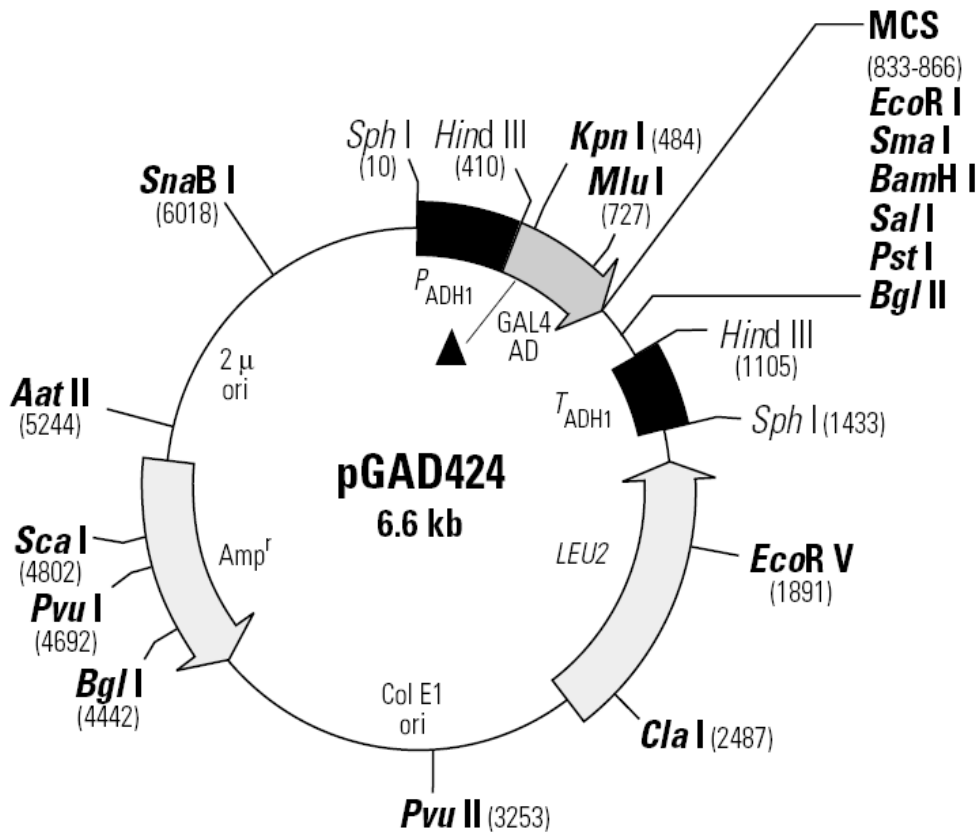


- Промотор (**P**) и терминатор (**T**) **ADH1** (алкогольдегидрогеназный);
- **DB** домен белка **Gal4** (содержит NLS);
- **MCS** (полилинкер);
- Селективный маркер **TRP1**; (**Amp^r**);
- Ориджин репликации **2 μ** , (**ColE1**);

Схема скрининга библиотеки кДНК для поиска белков, взаимодействующих с белком X

4. Совместная экспрессия в дрожжевых клетках **DBD-X** и библиотеки **AD-Yi** (котрансформация соответствующими плазмидами);
5. Отбор колоний, выросших на селективной среде

Вектор для получения гибридного белка AD-Y



При встраивании библиотеки кДНК в полилинкер (**MCS**) вектора **pGAD424** экспрессируются химерные белки, содержащие **AD GAL4** на N-конце.

Слитые с AD GAL4 белки транскрибируются с укороченного (слабого) промотора **ADH1** и содержат сигнал ядерной локализации (**NLS**) Т-антигена вируса SV40 (черный треугольник).

Штамм *S.cerevisiae* HF7c

- MATa, *ura3*- 52, **his3**- 200, *ade2*- 101, *lys2*-801, **trp1**- 901, **leu2**- 3, 112, *gal4*-542, *gal80*-538,
- LYS2 : : GAL1UAS -GAL1TATA -HIS3,
- URA3 : : GAL4 17-mers(x3) -CYC1TATA –lacZ

- **Репортерные гены:** 1) GAL1 UAS -GAL1 TATA - **HIS3**,
- 2) GAL4 17-mers(x3) -CYC1 TATA – **lacZ**

- **Двугибридные плазмиды** кодируют: **DB-X** (TRP1) и **AD-Y** (LEU2)
-
- **Селекция:**
- **Двойная** (- Trp, - Leu) - вырастут все клетки, трансформированные обоими двугибридными плазмидами;
- **Тройная** (- Trp, - Leu, - His) - вырастут только те клетки, в которых белки **X** и **Y** взаимодействуют.

Схема скрининга библиотеки кДНК для поиска белков, взаимодействующих с белком X (продолжение)

6. Проверка **β -галактозидазной** активности клонов, выросших на среде с тройной селекцией;
7. Выделение библиотечной плазмиды из **His+**, **lacZ+** клонов;
8. Проверка выделенной **библиотечной плазмиды** в двугибридной системе, тест на специфичность;
9. **Секвенирование** кДНК из библиотечной плазмиды;
10. Проверка взаимодействия независимыми методами (коиммунопреципитация, *in vitro* связывание);
11. Проверка биологической функциональности найденного взаимодействия

Проверка специфичности взаимодействия в двугибридной системе

- β -gal
- DB-X + AD-Y blue
- DB + AD-Y white
- DB-UP + AD-Y white
- (UP-unrelated protein(s))

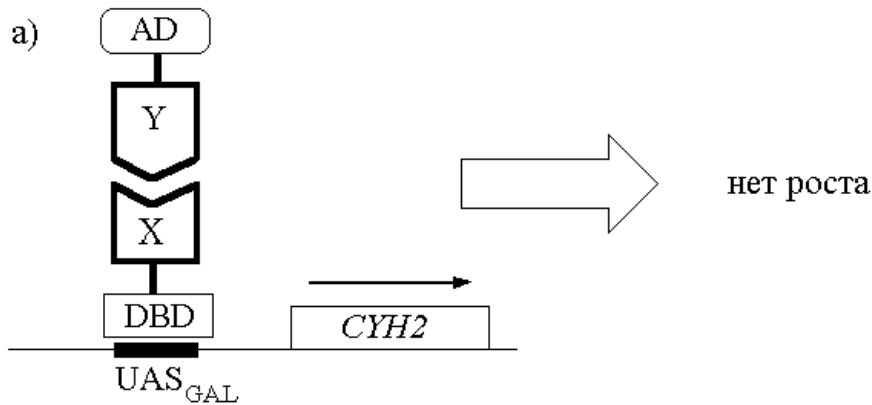
Фальшивые позитивы

- **Фальшивые позитивы** – клоны, содержащие DBD-X и AD-Y, которые индуцируют транскрипцию репортерных генов, но X и Y при этом не взаимодействуют, или Y взаимодействует не только с X, но и с набором случайных белков, слитых с DBD.
- Предполагают, что:
- в первом случае причина в **мутации** в предпромоторной области или в белке DBD-X;
- во втором случае белок Y содержит область **взаимодействия с низкой аффинностью** со многими разными белками (например, протяженную гидрофобную область).
- Из 73 отсеквенированных **фальшивых позитивов** наибольшую часть составляют белки теплового шока (16), рибосомальные белки (14), цитохромоксидазы (5), другие митохондриальные белки (3), субъединицы протеосомы (4), ферритин (4), аминоксил-тРНК синтетазы (3), коллагеновые белки, белки, содержащие мотив «цинкового пальца» (3), виментин (2), неорганические пирофосфатазы (2) и PCNA. Остальные белки были идентифицированы только один раз.

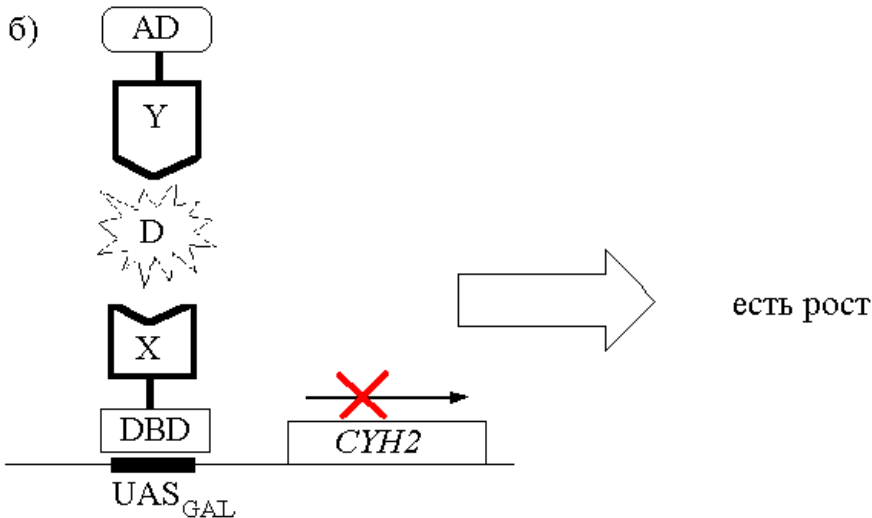
Промоторы, используемые в векторах дрожжевой двугибридной системы

- | Промотор | Регулируемость | Уровень синтеза белка |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------|
| <i>ADH1</i> (дикого типа) | Этанол-репресслируемый | / Высокий |
| <i>ADH1</i> (410 п.н.)# | Конститутивный | / Средний |
| <i>ADH1</i> (410 п.н.) | Конститутивный | / Низкий |
| <i>ADH1</i> (700 п.н.) | Конститутивный | / Высокий |
| <i>GAL1</i> (дикого типа) | Индукцируется галактозой | / Высокий |
- (# - минимальный промотор *ADH1* (410 п.н.) находится рядом с сегментом ДНК из рBR322, который действует как энхансер транскрипции в дрожжах).
 - Использование **индуцибельного промотора** позволяет:
 1. Проверить, что активация репортерного гена зависит от синтеза гибридного белка, содержащего AD;
 2. Работать с белками, **токсичными** для клеток дрожжей.
 - Для работы с **токсичными** белками используют также **слабые промоторы**
 - или **низкокопийные векторы** (например, центромерные)

Обратная двухгибридная система

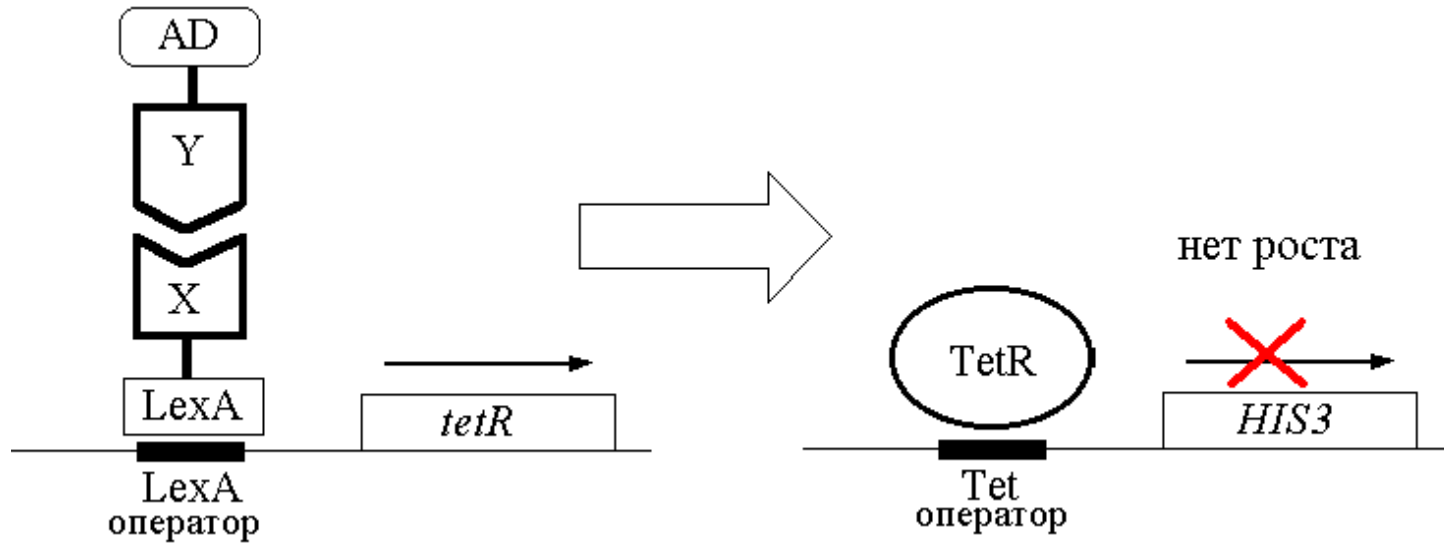


а) взаимодействие белков X и Y ведет к экспрессии токсичного для дрожжей гена и не позволяет клеткам расти; (*CYH2* восстанавливает чувствительность дрожжей к циклогексимиду)

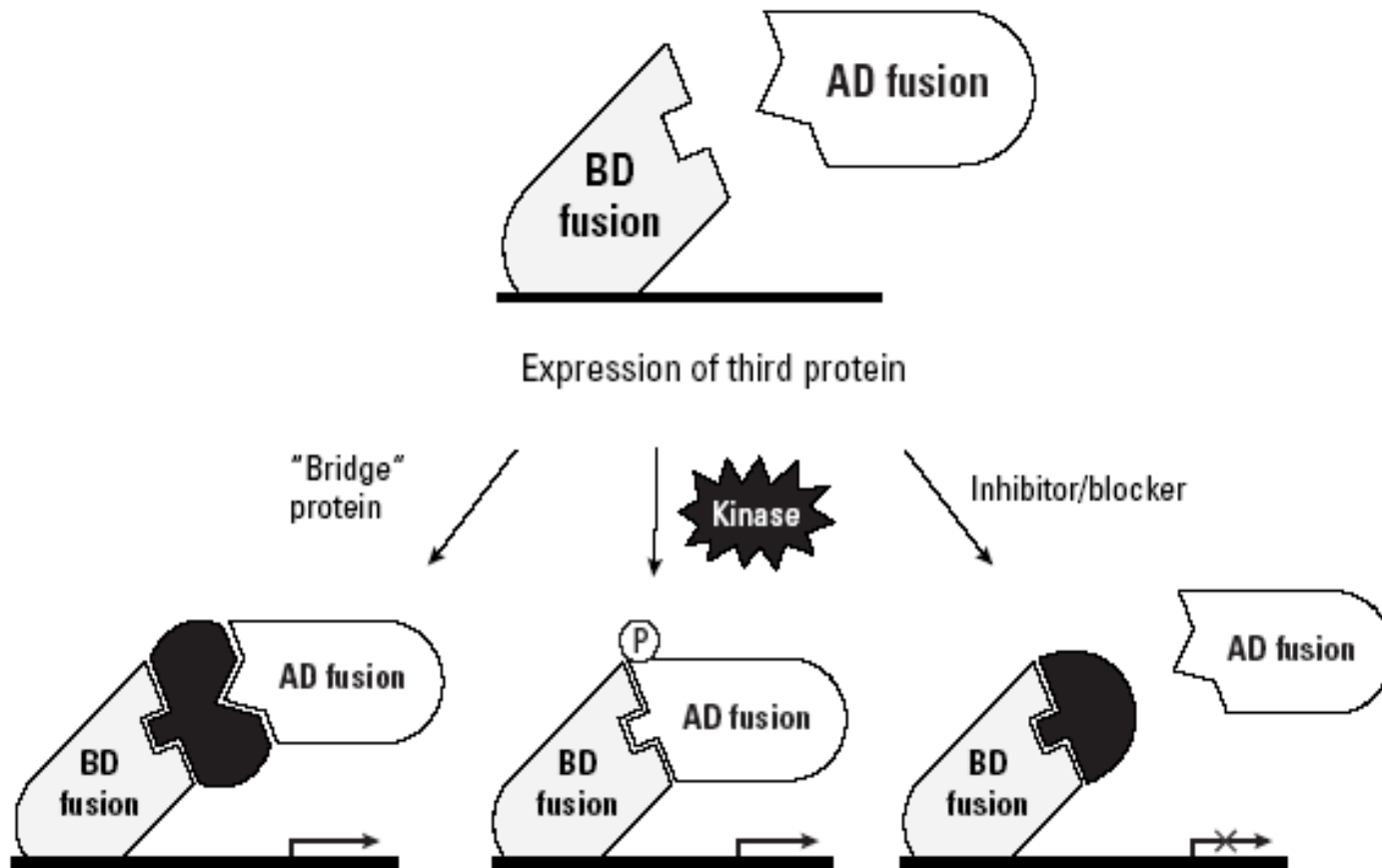


б) D – диссоциатор – нарушает взаимодействие белков X и Y, позволяя, таким образом, клеткам расти.

Модель сплит-системы

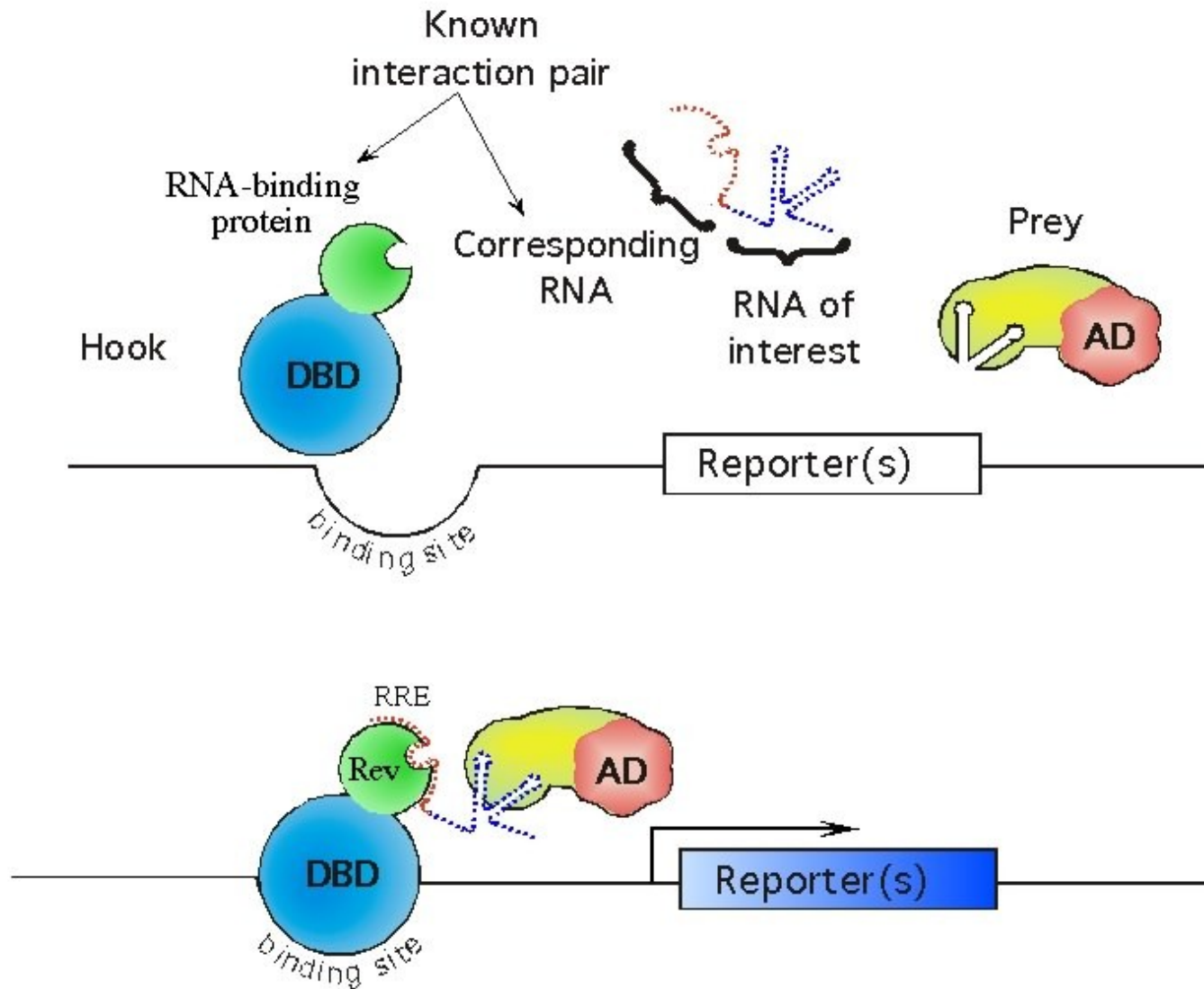


Белковая тригибридная система

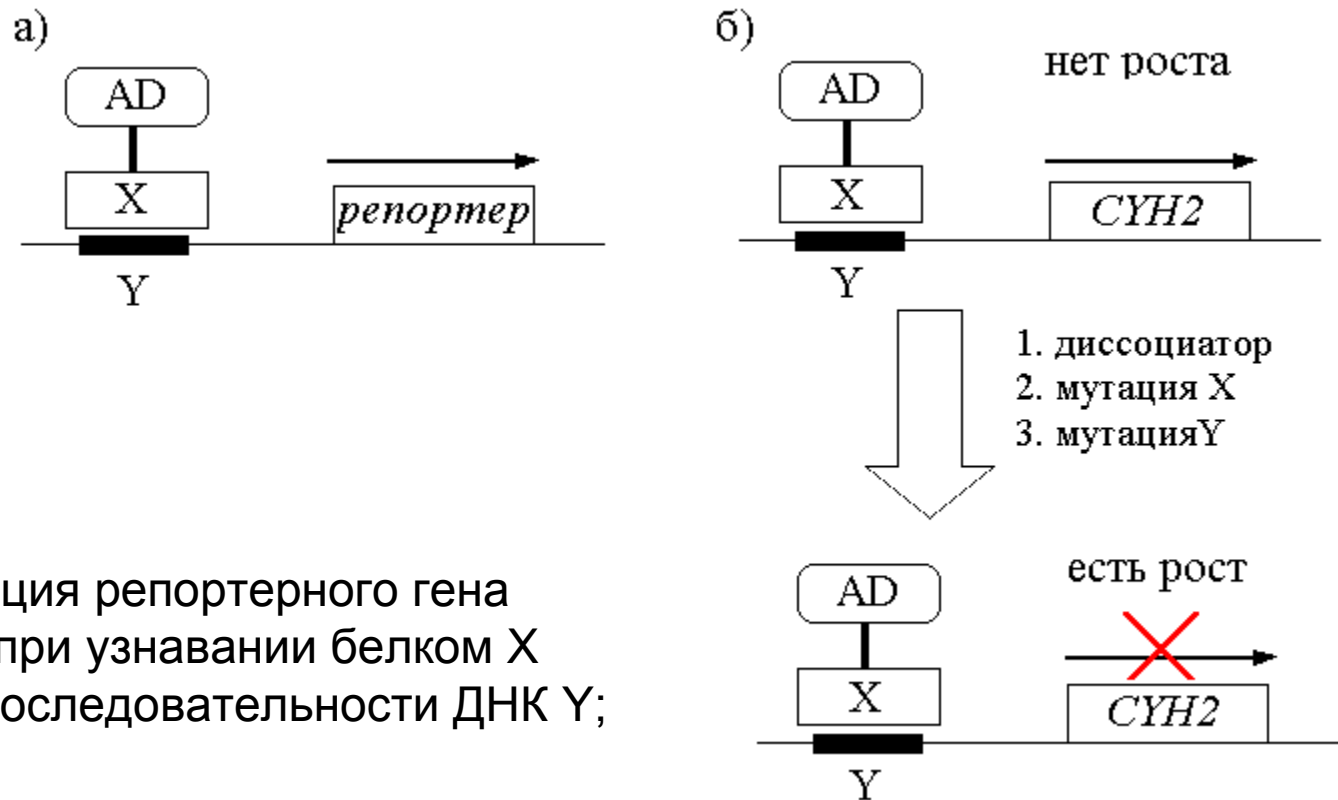


В дрожжевой клетке экспрессируются химерные белки DBD-X, AD-Y и третий белок (или библиотека белков). Третий белок может служить «мостиком» для взаимодействия X-Y, модификатором или диссоциатором этого взаимодействия.

Поиск белков, взаимодействующих с РНК



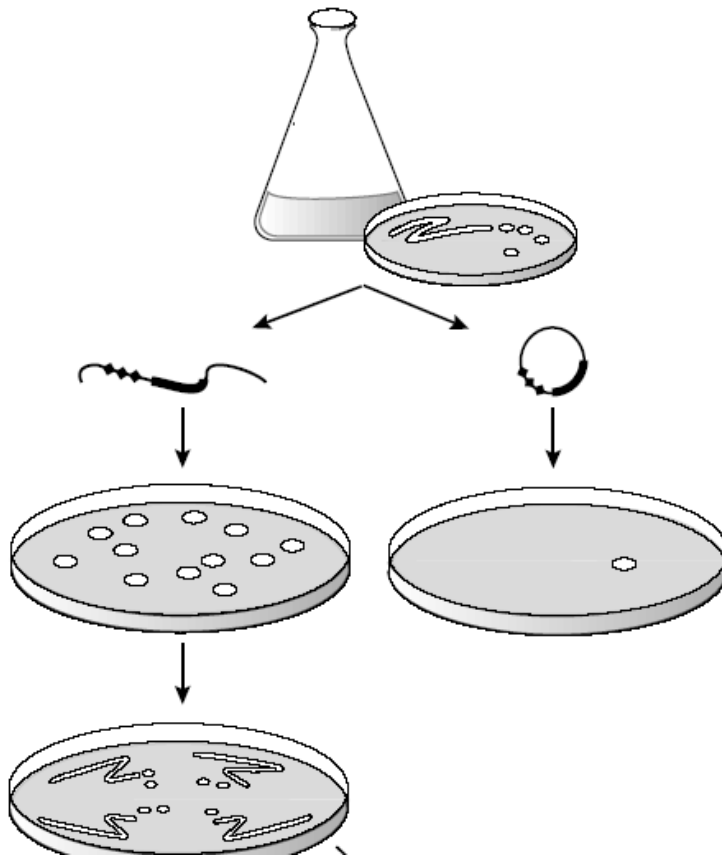
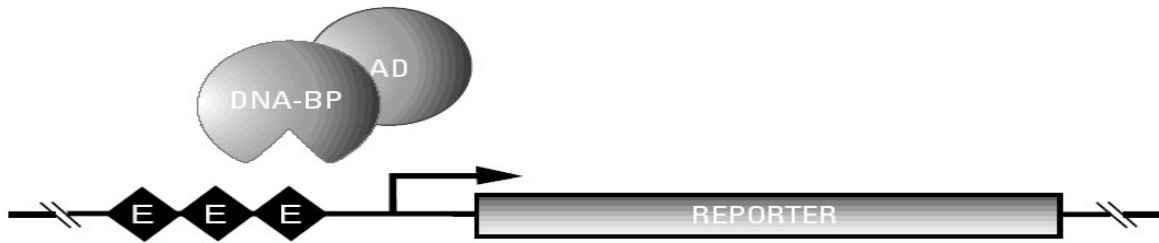
Модель одногибридной дрожжевой системы



а) Транскрипция репортерного гена активируется при узнавании белком X специфической последовательности ДНК Y;

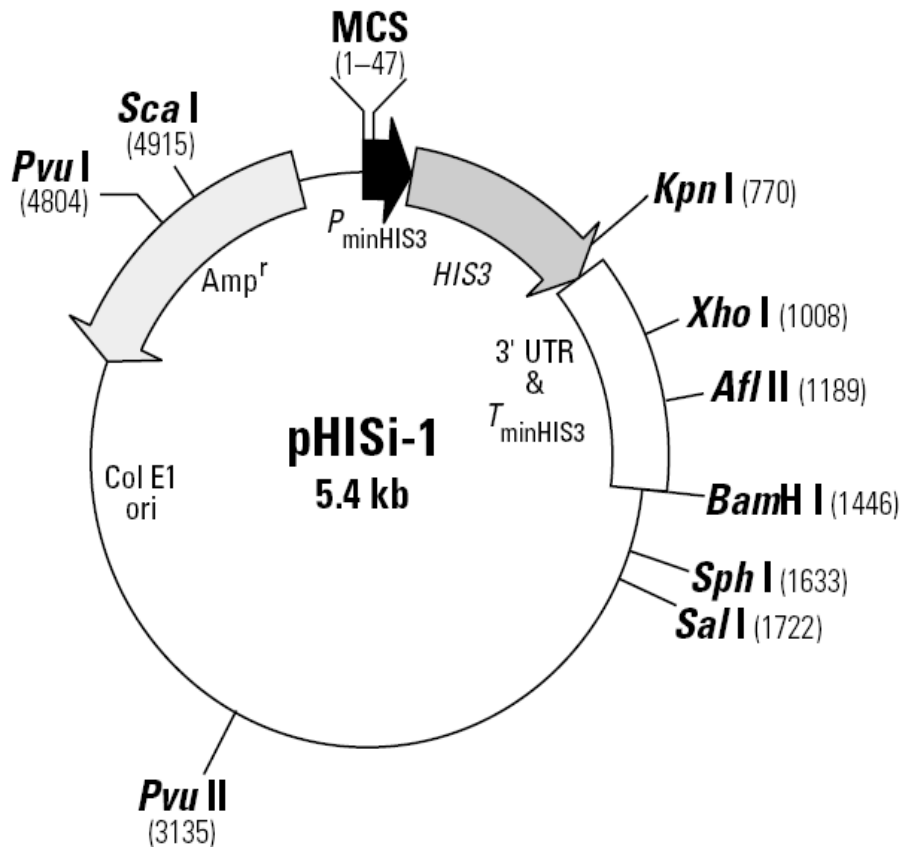
б) Обратная одногибридная система.

Дрожжевая одногибридная система



- Приготовить **компетентные клетки**.
- **Трансформировать** их вектором (target-reporter), **линеаризованным для интеграции**.
- **Селектировать** рекомбинанты на среде **/-His/**.
- Перештриховать выросшие колонии.

Карта репортерного вектора pHSi-1



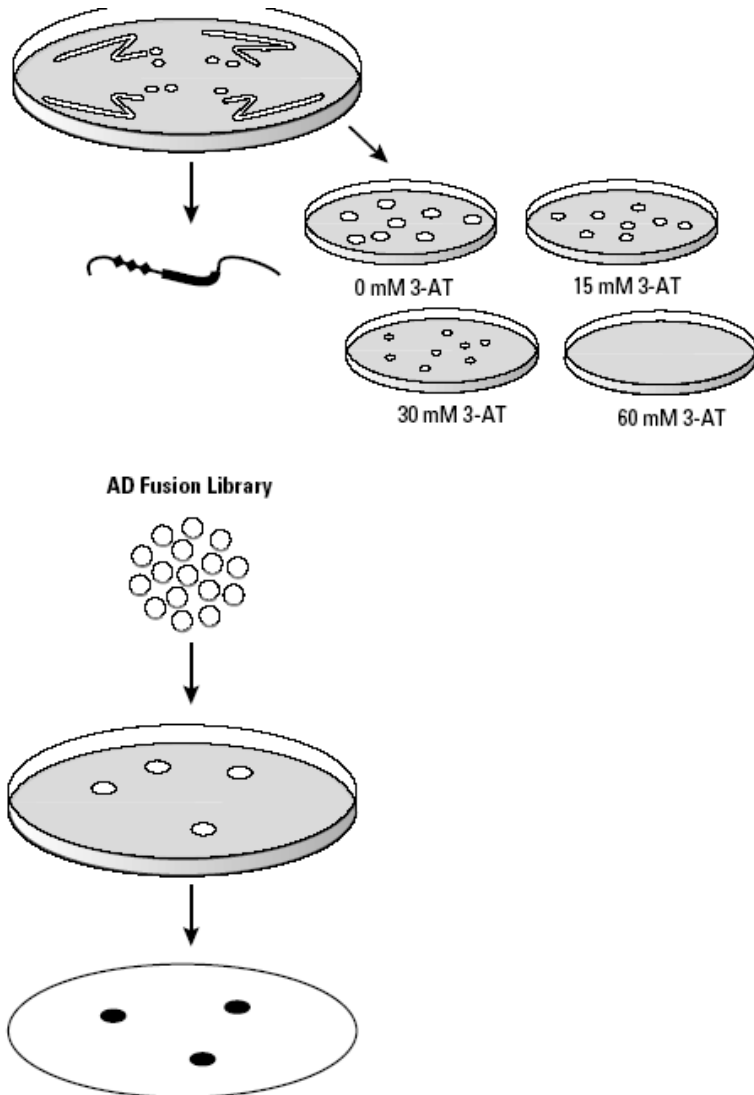
Вектор содержит дрожжевой ген **HIS3** под контролем минимального промотора локуса **HIS3 (P_{minHIS3})**.

- Исследуемые фрагменты ДНК (**target elements**) встраивают в полилинкер (MCS).

- Ген **HIS3** служит селективным маркером для **интеграции** линеаризованного по Xho I или Afl II сайтам репортерного вектора в нефункциональный локус **his3** дрожжевого штамма.

Без активации транскрипция гена **HIS3** с минимального промотора P_{min HIS} в дрожжевых клетках очень низка, но достаточна для **селекции при интеграции** репортерной плазмиды.

Дрожжевая одноклеточная система (продолжение)



- Для **HIS3**-репортерного штамма определить оптимальную концентрацию **3-AT** для ингибирования базальной экспрессии **HIS3**.
- Интегрировать **lacZ**-репортерную плазмиду в **HIS3**-репортерный штамм.
- Трансформировать [**HIS3**, **lacZ**]-репортерный штамм **библиотекой слитых с AD белков**, селективировать на минимальной среде **-His/-Leu/ + 3-AT/**.
- Тестировать **бета-галактозидазную активность** выросших колоний
- **Клоны His⁺ , LacZ⁺** являются кандидатами на экспрессию AD/библиотечных белков, связывающихся с **target**-элементом.