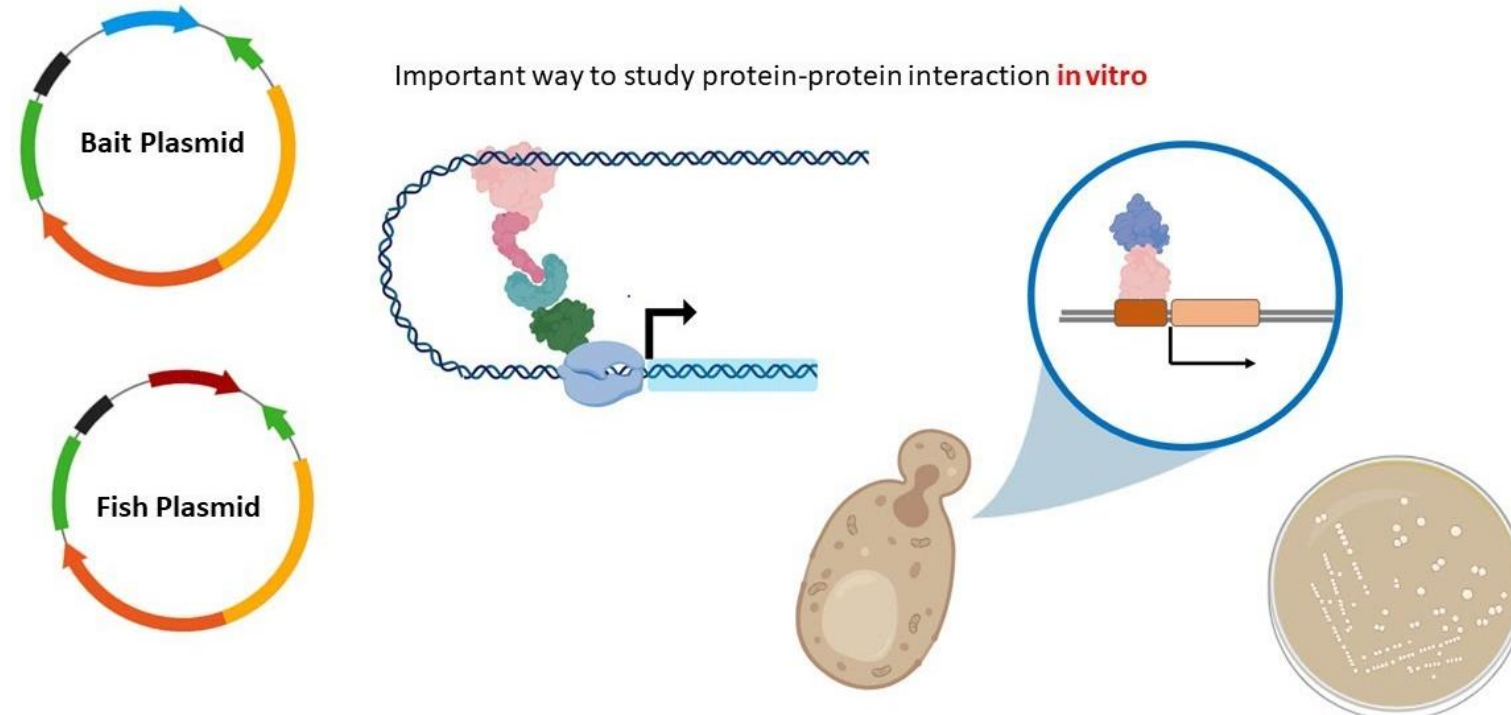


# Метод двугибридного анализа



**Преподаватель:** старший преподаватель  
кафедры молекулярной биологии и генетики,  
PhD, Смекенов И.Т.

**Дисциплина:** Рекомбинация ДНК

## Цель

Изучить основы и применение двугибридного анализа для исследования взаимодействий белок-белок, а также рассмотреть особенности и значение модульных свойств GAL4 в данной системе.

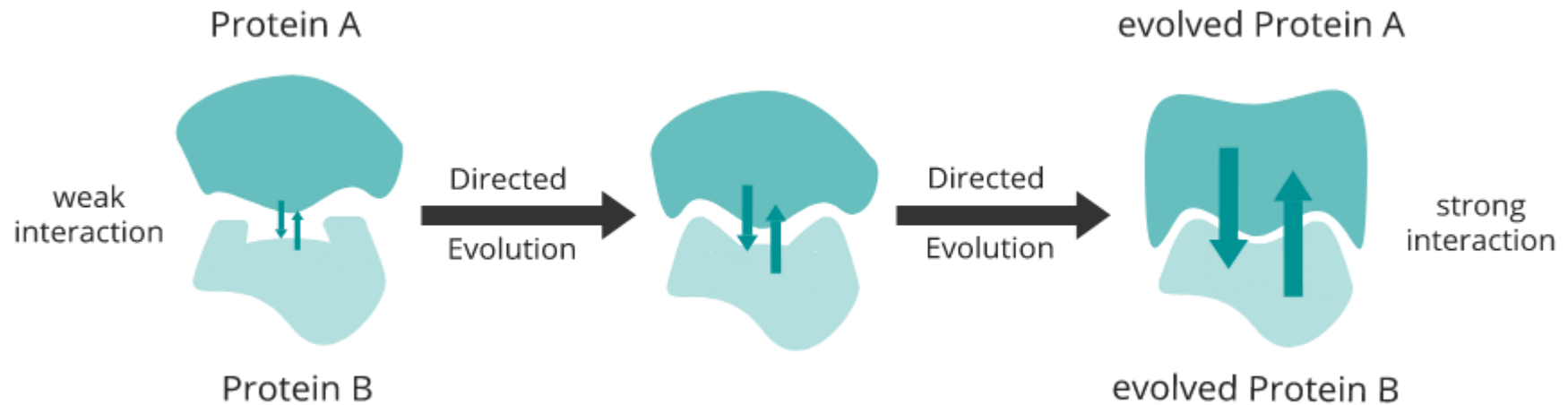
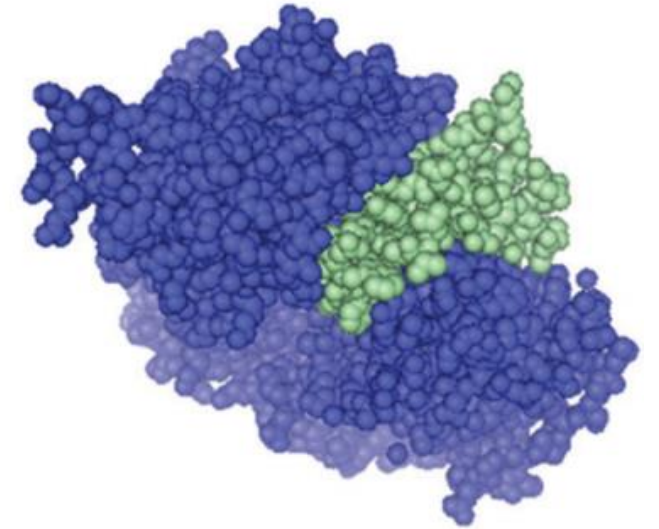
## Задачи:

1. Объяснить необходимость поиска белок-белковых взаимодействий для понимания клеточных процессов и патологий.
2. Рассмотреть методологию и основные этапы двугибридного анализа (Y2H) для исследования взаимодействий белков.
3. Описать модульные свойства белка GAL4 и их роль в активации транскрипции.
4. Изучить структуру и особенности генотипа дрожжевого штамма-реципиента (L40) и его применение в Y2H анализе.

**Ключевые слова:** *двугибридный анализ, белок-белковые взаимодействия, GAL4, Ras/Raf/MEK, дрожжевой штамм L40, β-галактозидаза*

- **Двугибридный анализ** — молекулярно-биологический метод, позволяющий с высокой точностью детектировать белок-белковые и ДНК-белковые взаимодействия в условиях *in vivo*.

Protein-protein interaction (PPI)



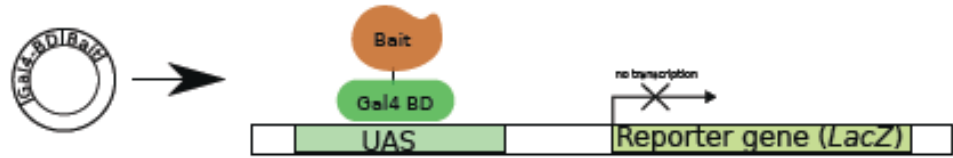
## НЕОБХОДИМОСТЬ ПОИСКА БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

- Большинство процессов осуществляется мультипротеиновыми клеточными комплексами.
- Идентификация и анализ их компонентов позволяет понять, как ансамбль экспрессируемого белка (весь «протеом») организован в функциональные единицы.
- *Какие методы используются для решения этой проблемы?*
  - Биохимические методы поиска белок-белковых взаимодействий (ко-иммунопреципитация, GST pull down);
  - Выделения белковых комплексов (тандемная аффинная очистка-метка);
  - Генетические системы для поиска белок-белковых взаимодействий (**Yeast 2-Hybrid**, split-TEV, фаговый дисплей);
  - Другие методы для характеристики белок-белковых взаимодействий (передача энергии флуоресценции)

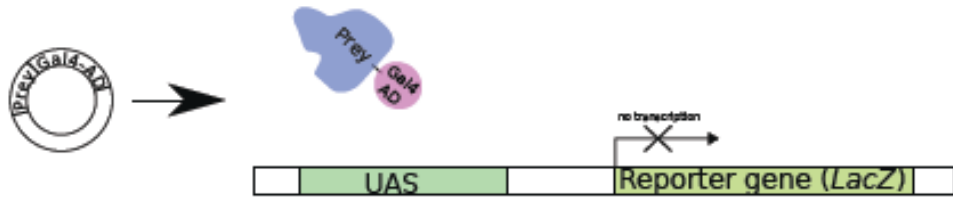
# Обзор анализа Y2H: поиск взаимодействия между двумя белками



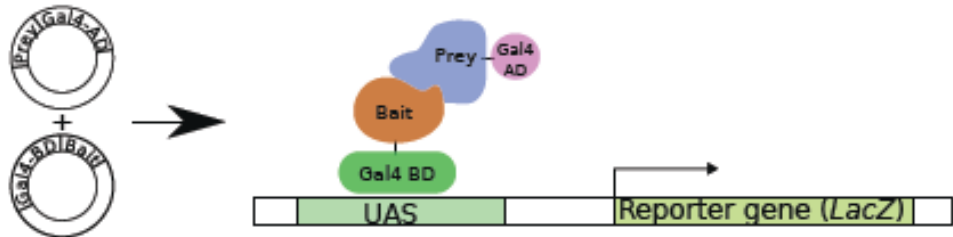
A. Regular transcription of the reporter gene



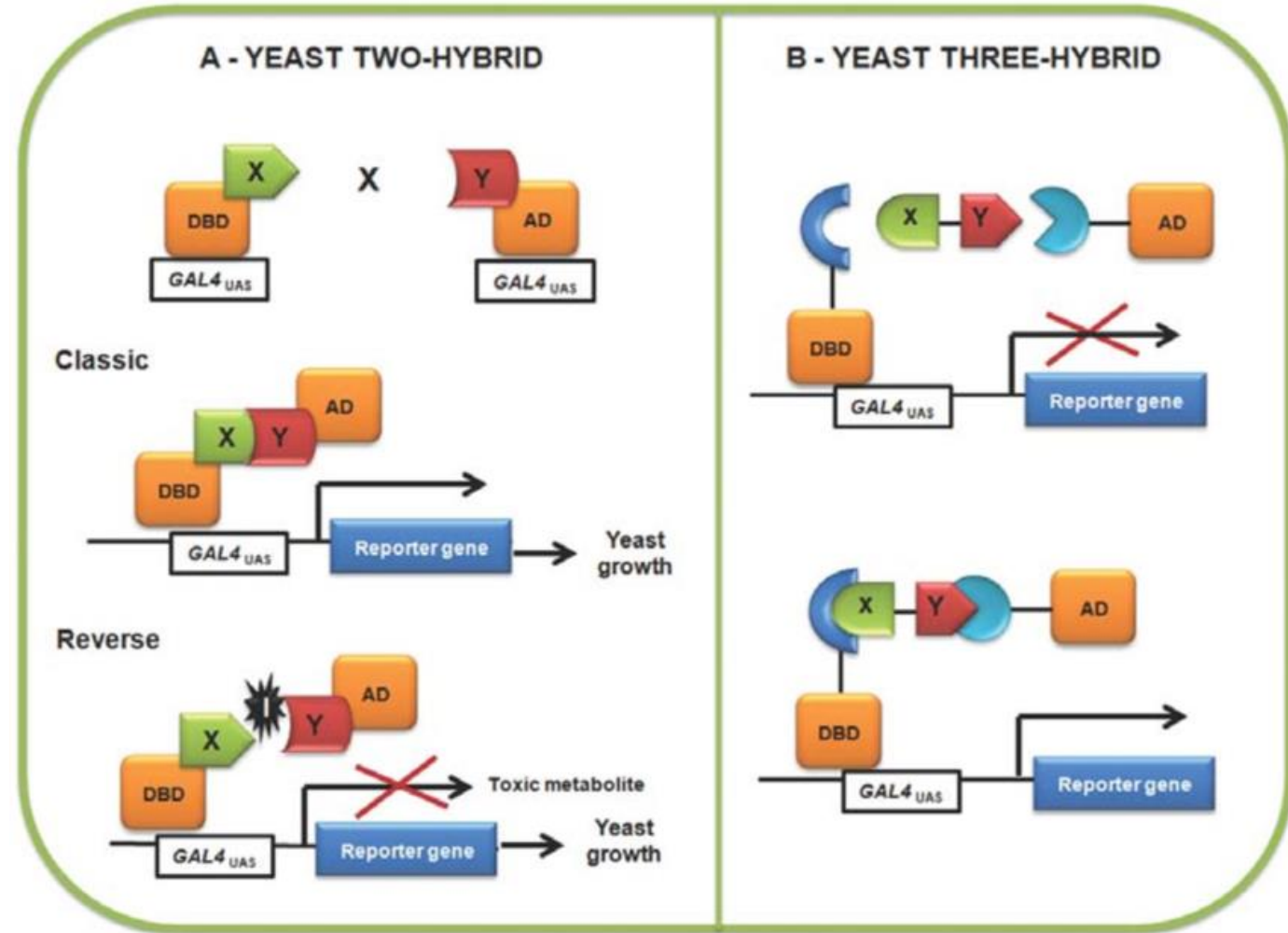
B. One fusion protein only (Gal4-BD + Bait) - no transcription



C. One fusion protein only (Gal4-AD + Prey) - no transcription



D. Two fusion proteins with interacting Bait and Prey



## **Модульные свойства GAL4 и других факторов транскрипции в целом способствовали этой стратегии.**

- Ма и Пташне ( [7](#) ) впервые продемонстрировали этот принцип. Они показали, что белок GAL80, обычно отрицательный регуляторный белок, который взаимодействует с GAL4, может быть преобразован в активатор транскрипции путем слияния его с доменом активации (AD). Активация этим гибридным белком, GAL80-AD, зависела от присутствия производного GAL4, несущего домен связывания GAL80 (С-концевой 30 аминокислот), но не имеющего собственного домена активации ( [7](#) ).

**Обзор наиболее часто используемых двугибридных векторов. Последний столбец описывает происхождение промотора и регистрационный номер в EMBL (AC).**

| Имя                   | Выделение-маркер | Функциональная область | промотор, AC  |
|-----------------------|------------------|------------------------|---|
| <b>На основе GAL4</b> |                  |                        |   |
| pMA424                | <i>HIS3</i>      | GAL4DB                 | Исходный вектор, 12 кб  |
| pGBT9                 | <i>TRP1</i>      | GAL4DB                 | ADH1 (усеченный)<br>AC: <a href="#">U07646</a>                        |
| pAS1                  | <i>TRP1</i>      | GAL4DB + HA            | ADH1 (полная длина),<br>CYH2  |
| pAS2                  | <i>TRP1</i>      | GAL4DB + HA            | ADH1 (полная длина)<br>CYH2<br>AC: <a href="#">U30496</a>             |
| pAS2-1                | <i>TRP1</i>      | GAL4DB                 | ADH1 (полная длина)<br>CYH2<br>AC: <a href="#">U30497</a>             |
| pGAD2F                | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | Исходный вектор, 13 кб  |
| pGAD424               | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (усеченный)<br>AC: <a href="#">U07647</a>                        |
| pGAD10                | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (усеченный)<br>AC: <a href="#">U13188</a>                        |
| pGAD-GL               | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (усеченный)  |
| pGAD-GH               | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (полная длина)   |
| pGAD1318              | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 | ADH1 (полная длина)   |
| pSE1107               | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 |   |
| pSD-10                | <i>URA3</i>      | VP16AD                 |   |
| pACT1                 | <i>LEU2</i>      | GAL4AD                 |   |
| pACT2                 | <i>LEU2</i>      | GAL4AD + HA            | ADH1 (усеченный),<br>средняя экспрессия<br>AC: <a href="#">U29899</a> |

| <b>На основе LexA</b> |               |                               |  |
|-----------------------|---------------|-------------------------------|--|
| pBTM116               | <i>TRP1</i>   | LexA                          | ADH1 (усеченный)   |
| pLexA                 | <i>HIS3</i>   | LexA                          | ADH1 (полная длина)<br>= pEG202  |
| pB42AD                | <i>TRP1</i>   | B42 + SV40 NLS + HA           | GAL1 (полноразмерный),<br>индуцибельный промотор<br>= pJG4-5               |
| pHybLex /<br>Zeo      | <i>Зеоцин</i> | LexA                          | ADH1 (усеченный)   |
| pYESTrp               | <i>TRP1</i>   | Эпитоп V5 + SV40 NLS +<br>B42 | GAL1 (полноразмерный),<br>индуцибельный промотор                           |
| pGilda                | <i>HIS3</i>   | LexA                          | GAL1 (полноразмерный), индуцибельный<br>промоторный<br>центромерный вектор |

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC140126/>

**Таблица 3**

Обзор наиболее часто используемых штаммов дрожжей, используемых репортерных генов и конституции (происхождения) их промотора в двухгибридной системе на основе GAL4.

|         | Репортерные гены | БПЛА регулируется +<br>происхождение БПЛА | Выражение        |                |
|---------|------------------|---|------------------|----------------|
|         |                  |   | неиндуцированный | индуцированный |
| H7Fc    | <i>LacZ</i> ,    | GAL4, 3 x UAS G 17-mer                    | -                | низкий         |
|         | <i>HIS3</i>      | GAL4, GAL1 (= 4 x UAS G 17-mer)           | -                | высокий        |
| YRG-2   | <i>LacZ</i> ,    | GAL4, 3 x UAS G 17-mer                    | -                | низкий         |
|         | <i>HIS3</i>      | GAL4, GAL1 (= 4 x UAS G 17-mer)           | -                | высокий        |
| SFY526  | <i>LacZ</i>      | GAL4, GAL1 (= 4 x UAS G 17-mer)           | -                | высокий        |
| Y187    | <i>LacZ</i>      | GAL4, GAL1 (= 4 x UAS G 17-mer)           | -                | высокий        |
| Y190    | <i>LacZ</i> ,    | GAL4, GAL1 (= 4 x UAS G 17-mer)           | -                | высокий        |
|         | <i>HIS3</i>      | GAL4, GAL1 (= 4 x UAS G 17-mer)           | низкий           | высокий        |
| CG-1945 | <i>LacZ</i> ,    | GAL4, 3 x UAS G 17-mer                    | -                | низкий         |
|         | <i>HIS3</i>      | GAL4, GAL1 (= 4 x UAS G 17-mer)           | очень низкий     | высокий        |
| L40     | <i>HIS3</i> ,    | 4 x LexA op                               |                  |                |
|         | <i>LacZ</i>      | 8 x LexA op                               |                  |                |



# Стратегия

*1-Конструирование генно-инженерных дрожжей с Gal4-регулируемым трансгеном*

*2-Плазмидная экспрессия фактора транскрипции Gal4*



A. Regular transcription of the reporter gene

*Gal4 представляет собой единый белок с двумя функционально разными доменами: BD: ДНК-связывающий домен AD: домен активации РНК-полимеразы II (транскрипция информационной РНК)*

# Стратегия

*1-Конструирование генно-инженерных дрожжей с Gal4-регулируемым трансгеном*

*2-Плазмидная экспрессия модифицированного фактора транскрипции Gal4 (домен активации заменен другим белком, называемым «приманка»)*

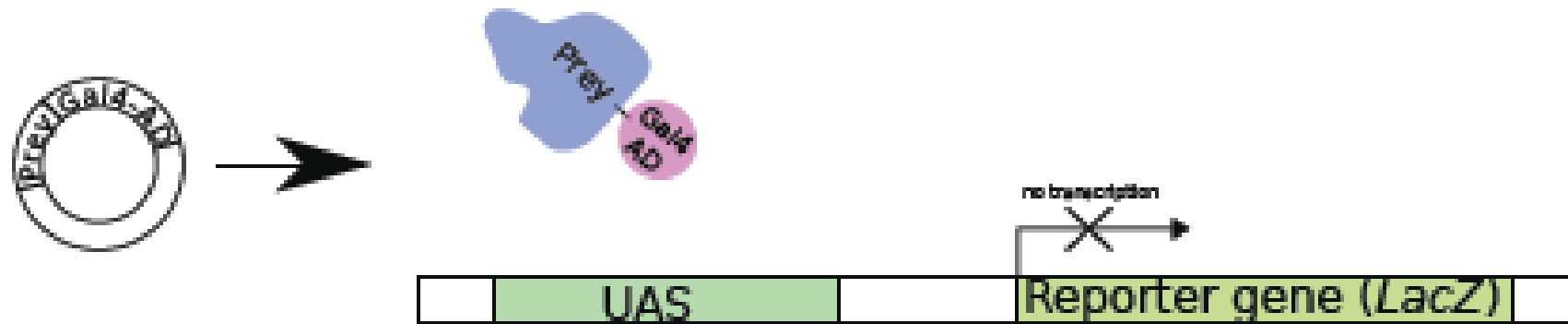


B. One fusion protein only (Gal4-BD + Bait) - no transcription

# Стратегия

*1-Конструирование генно-инженерных дрожжей с Gal4-регулируемым трансгеном*

*2-Плазмидная экспрессия модифицированного фактора транскрипции Gal4 (ДНК-связывающий домен заменен другим белком, называемым «добычей»)*

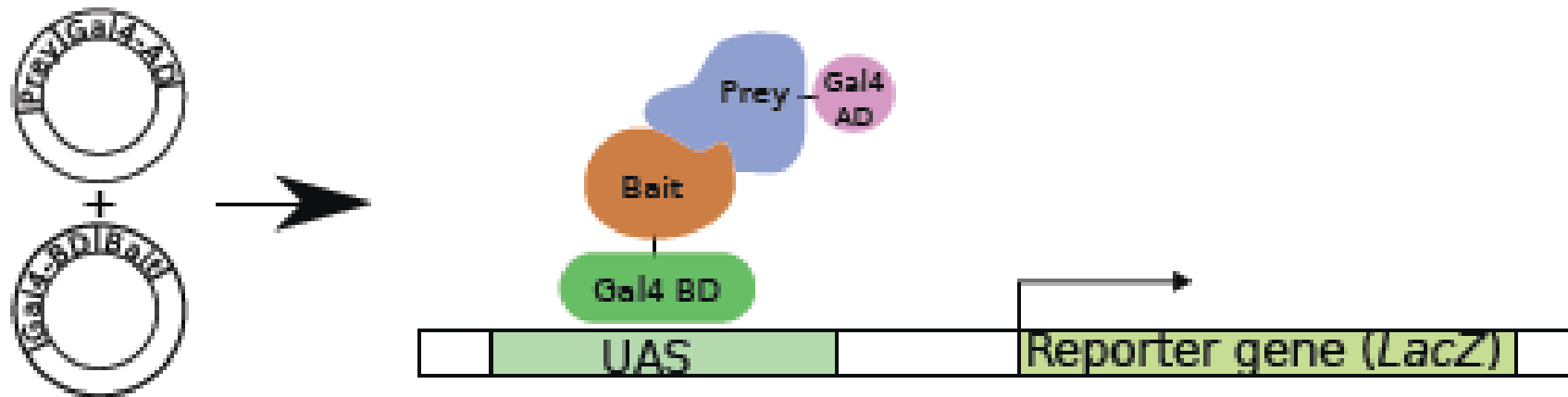


C. One fusion protein only (Gal4-AD + Prey) - no transcription

# Стратегия

*1-Конструирование генно-инженерных дрожжей с Gal4-регулируемым трансгеном*

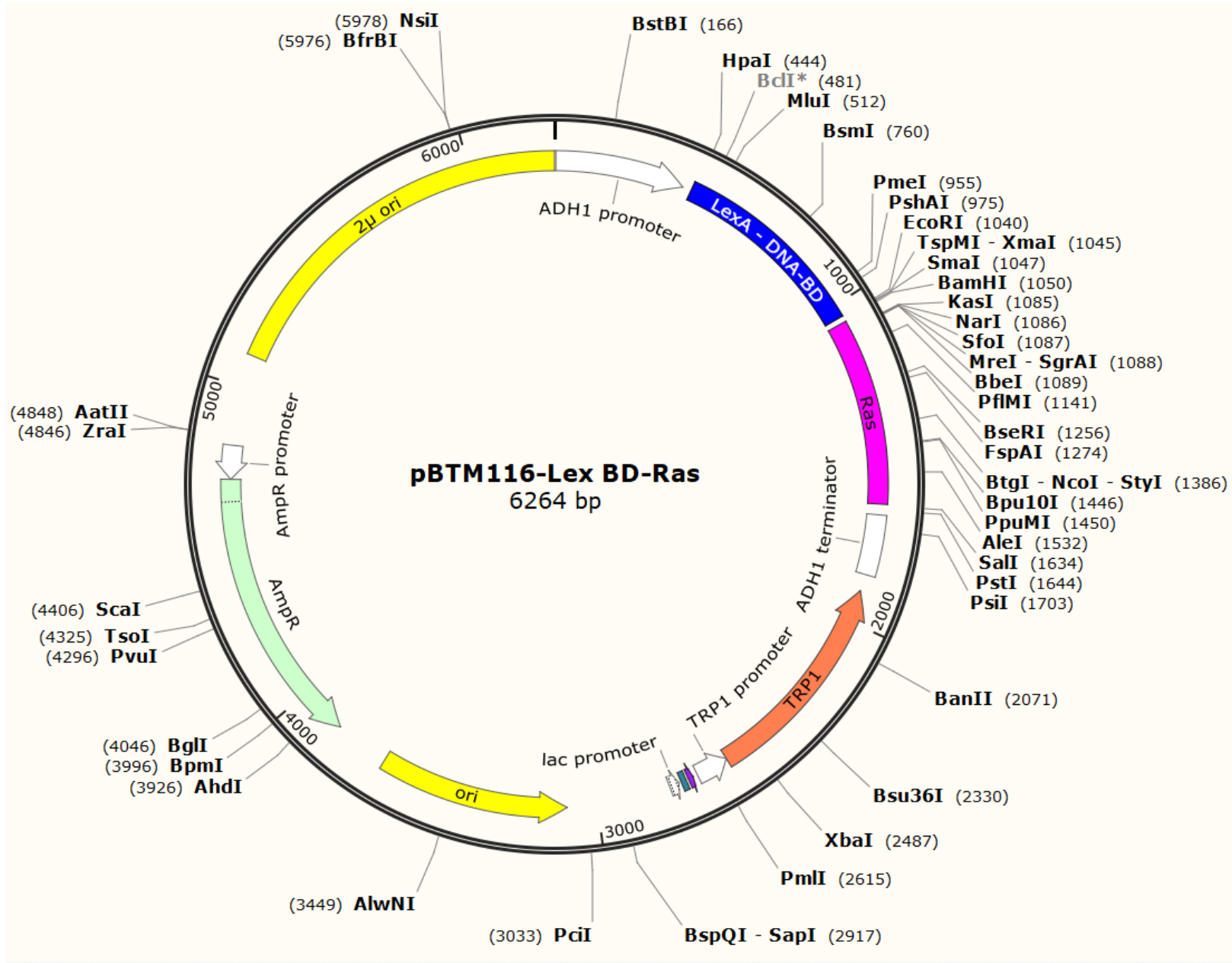
*2-Две разные плазмиды, экспрессирующие №1: модифицированный фактор транскрипции Gal4 (домен активации заменен другим белком, называемым «приманка»), №2: модифицированный фактор транскрипции Gal4 (ДНК-связывающий домен заменен другим белком, называемым «добычей»).*



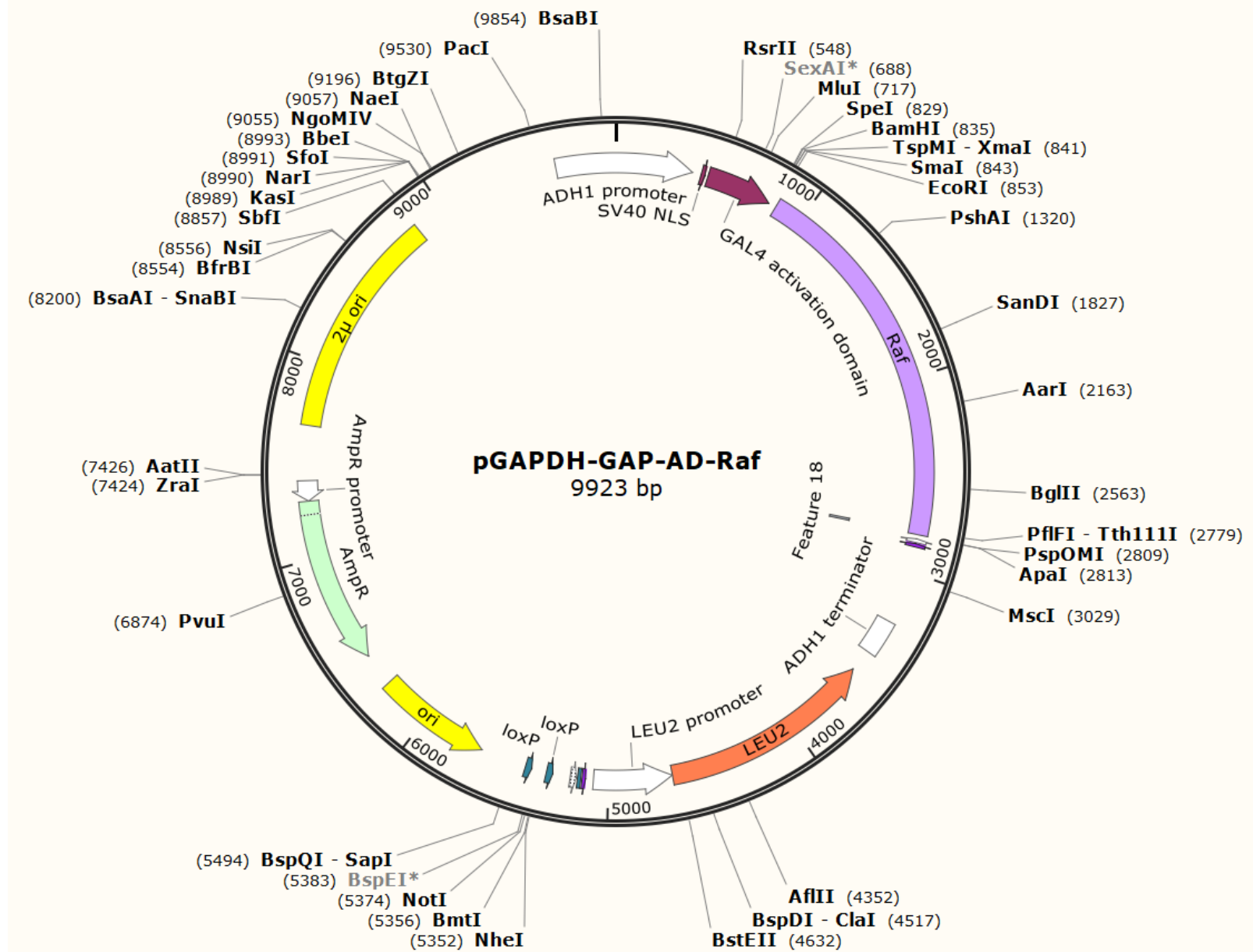
D. Two fusion proteins with interacting Bait and Prey

► *если приманка физически взаимодействует с добычей, репортерный ген (LacZ) транскрибируется (продуцируется β-галактозидаза)*

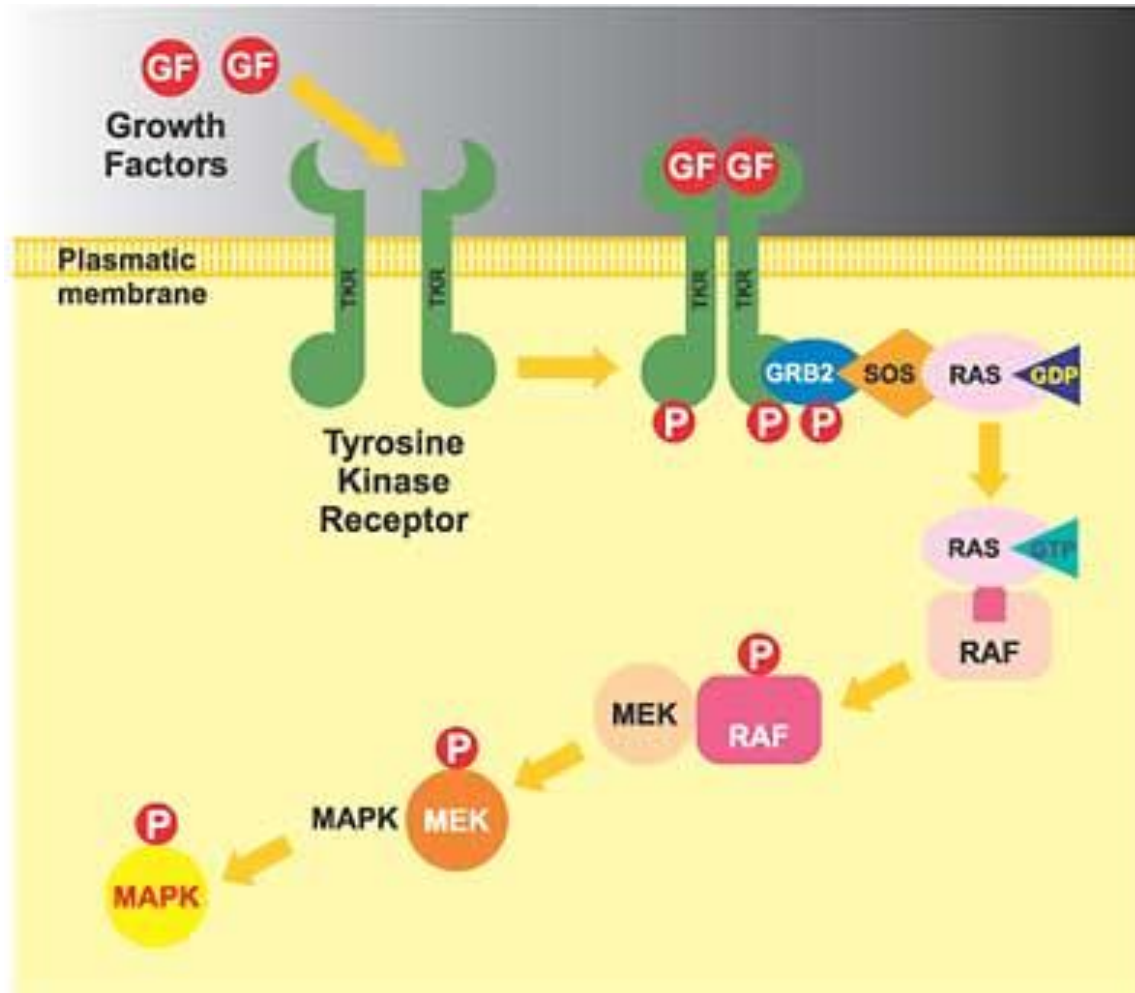
# Рестрикционная карта плазмиды №1



# Рестрикционная карта плазмиды №2



# Обзор Ras / Raf / MEK

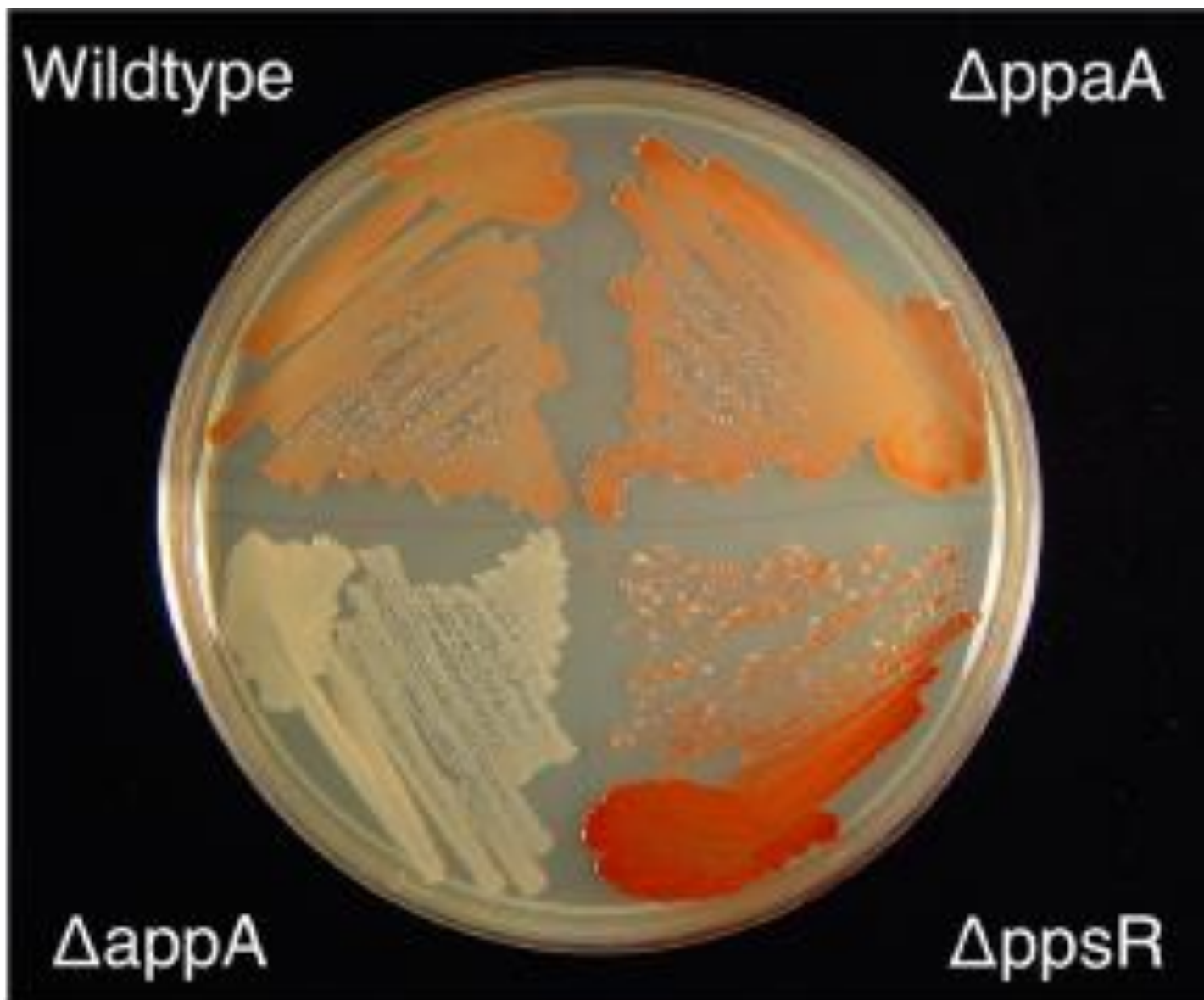


*Активация пути приводит к пролиферации клеток, участвующей во многих раковых заболеваниях.*

**Генотип дрожжевого штамма-реципиента (L40):**  
***trp1<sup>-</sup>, leu2<sup>-</sup>, his3<sup>-</sup>, ade2<sup>-</sup>, URA3::lexA<sub>op</sub>-lacZ***

*По соглашению у дрожжей мутировавшие аллели пишутся строчными буквами, тогда как аллели дикого типа упоминаются заглавными буквами. Мутации **his3<sup>-</sup>** и **ade2<sup>-</sup>**, хотя и присутствуют в этом штамме, здесь не используются, но они являются обязательными для компенсации соответствующих ауксотрофий с помощью добавок гистидина и аденина. Присутствие **ade2<sup>-</sup>** придает штамму розовый цвет при выращивании на богатой среде. Химерный репортерный ген **lexA<sub>op</sub>-lacZ** был введен путем гомологичной рекомбинации в локусе **URA3** (последний ген все еще функционирует).*





## Фенотип дрожжевого штамма (L40):

MM: синтетическая минимальная среда

A: аденин; W: триптофан; L: лейцин; H: гистидин

|        | MM<br>+<br>A,W,L, H | MM<br>+<br>A,W,L, (-H) | MM<br>+<br>A,L,H, (-W) | MM<br>+<br>W,L,H (-A) | MM<br>+<br>A,W,H, (-L) |
|--------|---------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Growth | YES                 | NO                     | NO                     | NO                    | NO                     |

## Фенотип дрожжевого штамма (L40):

MM: синтетическая минимальная среда

A: аденин; W: триптофан; L: лейцин; H: гистидин

|                                   | MM<br>+<br>A,W,L, (-H) | MM<br>+<br>A,L,H, (-W) | MM<br>+<br>W,L,H (-A) | MM<br>+<br>A,W,H, (-L) | MM<br>+<br>A, H, (-W,L) |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| L40                               | -                      | -                      | -                     | -                      | -                       |
| L40 + p#1-<br>Bait                |                        |                        |                       |                        |                         |
| L40 + p#2-<br>Prey                |                        |                        |                       |                        |                         |
| L40 + p#1-<br>Bait + p#2-<br>Prey |                        |                        |                       |                        |                         |

## Фенотип дрожжевого штамма (L40):

MM: синтетическая минимальная среда

A: аденин; W: триптофан; L: лейцин; H: гистидин

|                                   | MM<br>+<br>A,W,L, (-H) | MM<br>+<br>A,L,H, (-W) | MM<br>+<br>W,L,H (-A) | MM<br>+<br>A,W,H, (-L) | MM<br>+<br>A, H, (-W,L) |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| L40                               | -                      | -                      | -                     | -                      | -                       |
| L40 + p#1-<br>Bait                | -                      | +                      | -                     | -                      | -                       |
| L40 + p#2-<br>Prey                |                        |                        |                       |                        |                         |
| L40 + p#1-<br>Bait + p#2-<br>Prey |                        |                        |                       |                        |                         |

## Фенотип дрожжевого штамма (L40):

MM: синтетическая минимальная среда

A: аденин; W: триптофан; L: лейцин; H: гистидин

|                                   | MM<br>+<br>A,W,L, (-H) | MM<br>+<br>A,L,H, (-W) | MM<br>+<br>W,L,H (-A) | MM<br>+<br>A,W,H, (-L) | MM<br>+<br>A, H, (-W,L) |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| L40                               | -                      | -                      | -                     | -                      | -                       |
| L40 + p#1-<br>Bait                | -                      | +                      | -                     | -                      | -                       |
| L40 + p#2-<br>Prey                | -                      | -                      | -                     | +                      | -                       |
| L40 + p#1-<br>Bait + p#2-<br>Prey |                        |                        |                       |                        |                         |

## Фенотип дрожжевого штамма (L40):

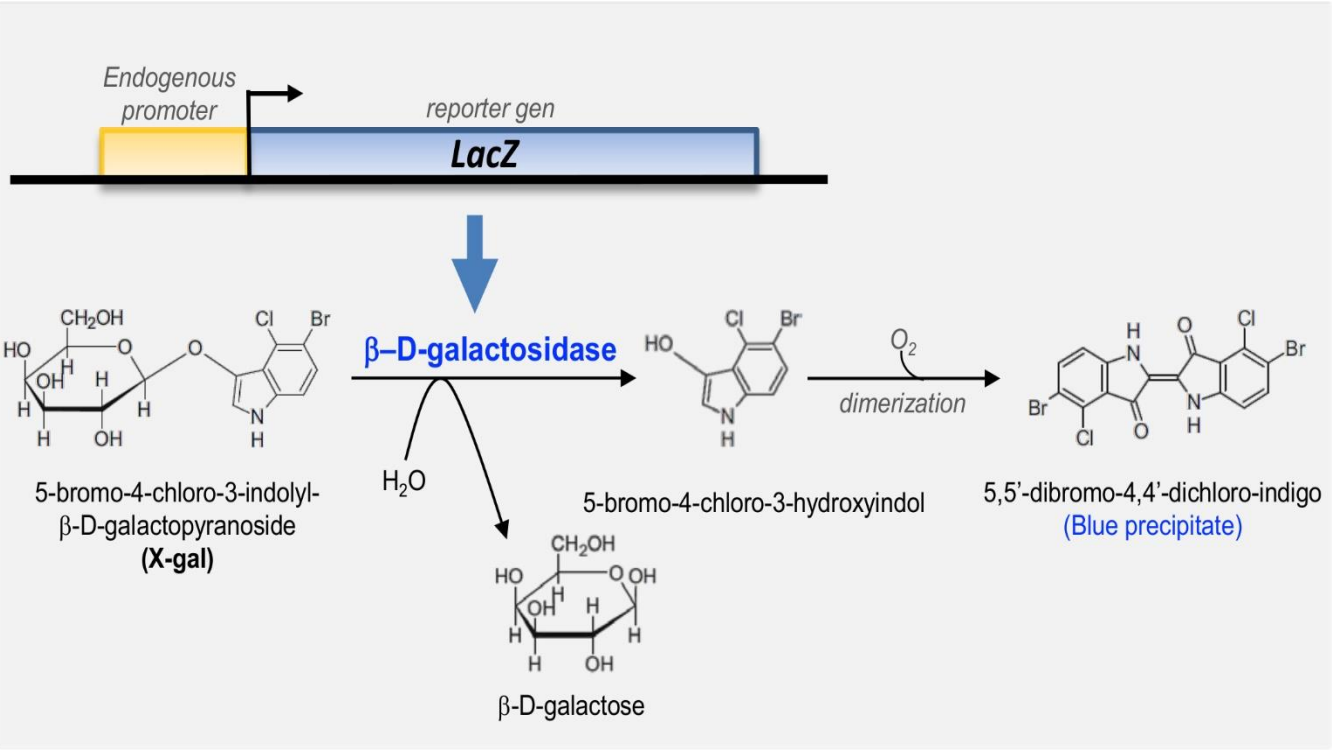
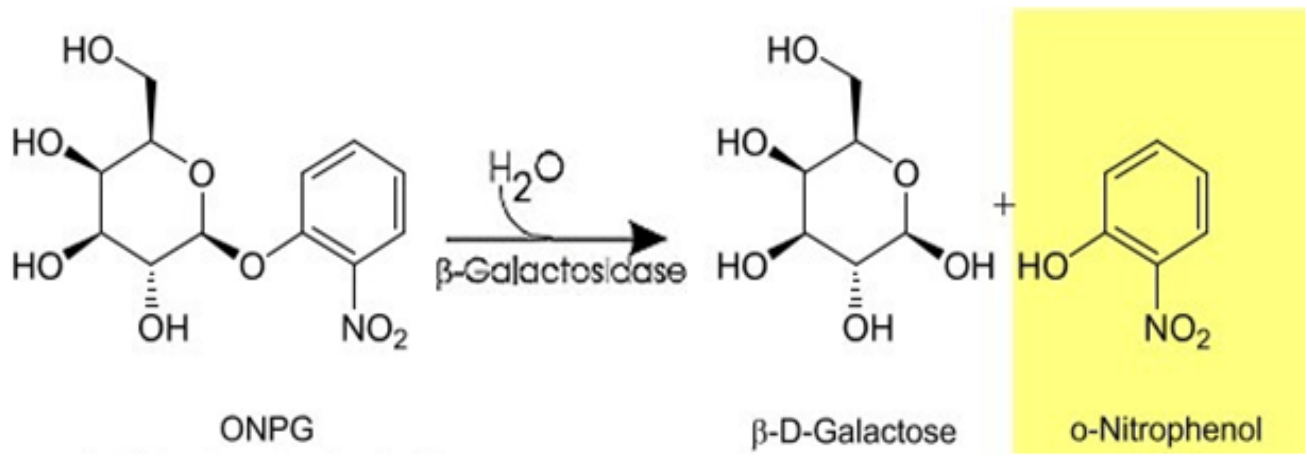
MM: синтетическая минимальная среда

A: аденин; W: триптофан; L: лейцин; H: гистидин

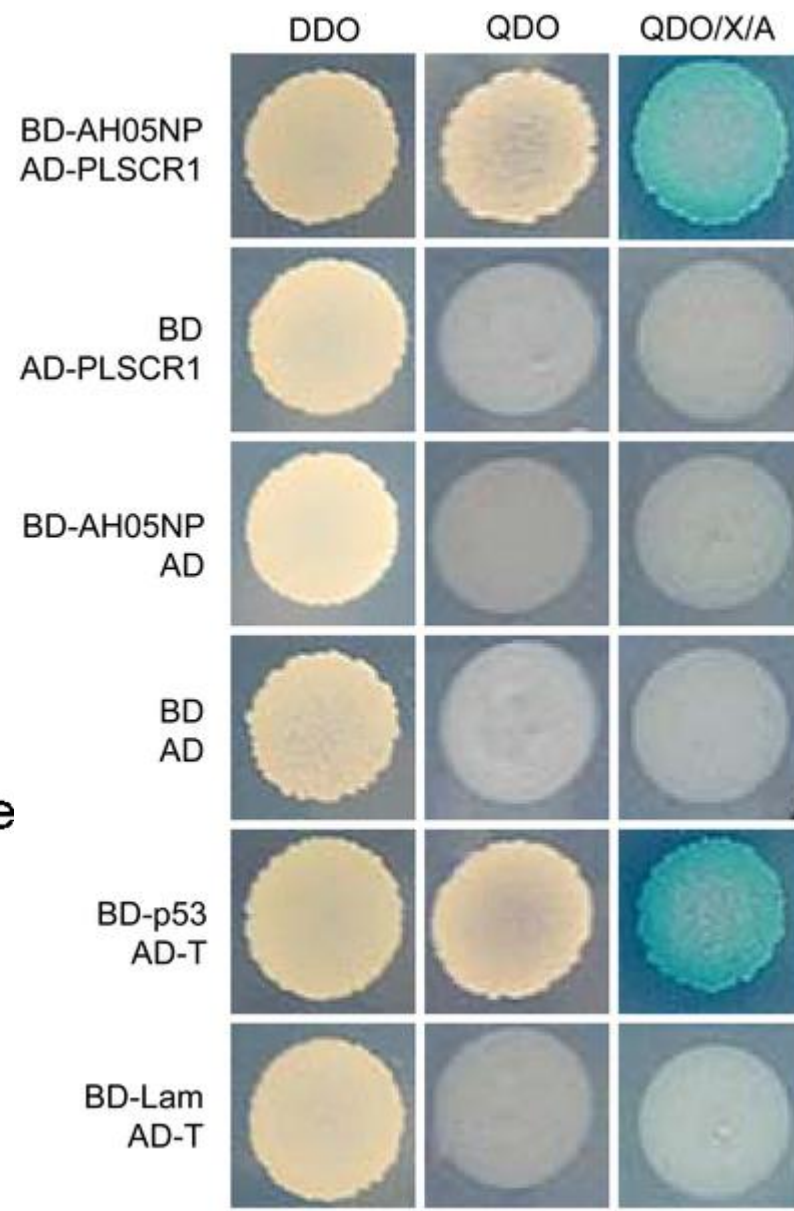
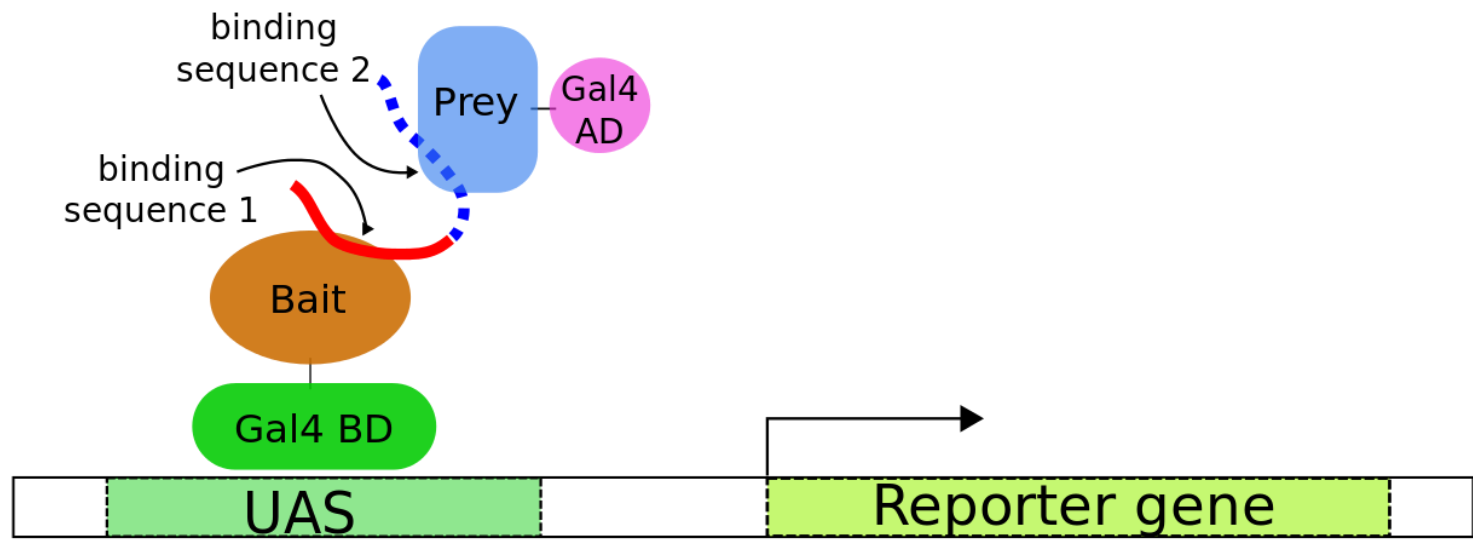
|                                   | MM<br>+<br>A,W,L, (-H) | MM<br>+<br>A,L,H, (-W) | MM<br>+<br>W,L,H (-A) | MM<br>+<br>A,W,H, (-L) | MM<br>+<br>A, H, (-W,L) |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| L40                               | -                      | -                      | -                     | -                      | -                       |
| L40 + p#1-<br>Bait                | -                      | +                      | -                     | -                      | -                       |
| L40 + p#2-<br>Prey                | -                      | -                      | -                     | +                      | -                       |
| L40 + p#1-<br>Bait + p#2-<br>Prey | -                      | +                      | -                     | +                      | +                       |

# β-галактозидаза

- Фермент β-галактозидаза, катализирующий гидролиз β-галактозидов, включая лактозу, кодируется геном *LacZ E. coli*.
- Активность фермента измеряется с помощью простого фотометрического анализа, который измеряет гидролиз субстрата о-нитрофенил-Р-о-галактопиранозида (ONPG) β-галактозидазой в бесклеточных экстрактах.
- β-галактозидазу можно также контролировать гистохимически с использованием субстрата X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индоил β -D-галактозид).
- Потенциальным недостатком использования β-галактозидазы в качестве репортерного фермента является наличие эндогенной активности β-галактозидазы в некоторых тканях млекопитающих, включая мозг.
- Однако оптимум pH для этого фермента низкий (pH 3,5), тогда как оптимум pH фермента *E. coli* составляет 7,3. Наличие ложноположительных результатов можно свести к минимуму, проводя анализ при pH 7,5 и включая экстракт нормальной ткани в качестве контроля.



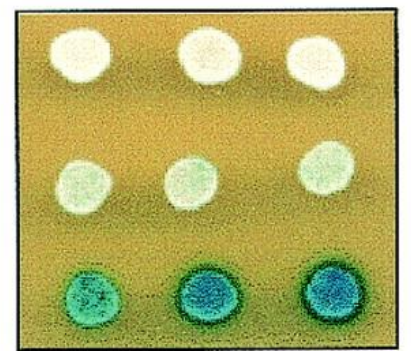
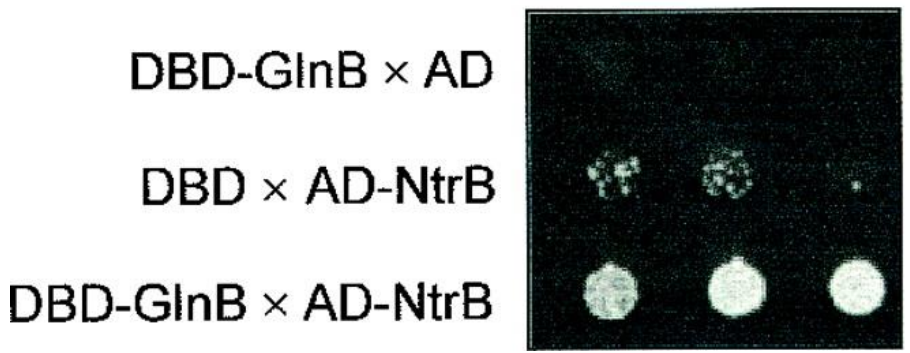




**A**  
- Leu

**B**  
+ X-Gal

**C**  
 $\beta$ -Galactosidase activity



**2**

**9**

**1388**

# ИСТОЧНИКИ:

- 1. Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. (1982) Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-1051.
- 2. Sleight, M. J. (1986) A non-chromatographic assay for expression of the chloramphenicol acetyl transferase gene in eucaryotic cells. *Anal. Biochem.* 156, 251-256.
- 3. Fowler, A. V. and Zabin, I. (1983) Purification, structure and properties of hybrid p galactosidase proteins. *J. Biol. Chem.* 258, 14,354-14,358.
- 4. Gorman, D. R., Rossant, J., Clapoff, S., Breitman, M. L., and Tsui, L.-C. (1987) In situ detection of  $\beta$  galactosidases in lenses of transgenic mice with a crystallin/lacZ gene. *Science* 235, 456-458.
- 5. Shimohama, S., Rosenberg, M. B., Fagan, A. M., Wolff, J. A., Short, M. P., Breakefield, X. O., Friedmann, T., and Gage, F. H. (1989) Grafting genetically modified cells into the rat brain: characteristics of E Coli  $\beta$ -galactosidase as a reporter gene. *Mol. Brain. Res.* 5, 271-278.
- 6. de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., and Subramanian, S. (1987) Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 125-137.
- 7. Brasier, A. R., Tate, J. E., and Habener, J. F. (1989) Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *BioTechniques* 7, 1116-1122.
- 8. Nguyen, V. T., Morange, M., and Bensaude, O. (1988) Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Anal. Biochem.* 171, 404-408.