

Princip i razvoj metode dvostrukog kvaščevog hibrida

Šoštarić, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:674554>

Rights / Prava: [In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

**PRINCIP I RAZVOJ METODE
DVOSTRUKOG KVAŠ EVOG HIBRIDA**

**PRINCIPLES AND DEVELOPMENT OF YEAST
TWO-HYBRID SYSTEM**

SEMINARSKI RAD

Iva Šoštari

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentorica:

Doc. dr. sc. Ivana Ivan i Ba e

Zagreb, 2012.

SAŽETAK

Me uproteinske interakcije igraju temeljnu ulogu u obnašanju različitih bioloških funkcija, pa je stoga njihova identifikacija i karakterizacija ključna za razumijevanje biologije stanice. Metoda dvostrukog kvaševog hibrida domišljata je tehnika molekularne genetike koja omogućava jednostavnu detekciju velikog broja proteinskih interakcija *in vivo*.

Ovaj rad daje osvrt na temeljne principe sustava dvostrukog kvaševog hibrida, njegove prednosti i nedostatke, te neke od popularnih modifikacija i novih primjena ove metode.

SUMMARY

Protein-protein interactions play a major role in various biological mechanisms. Therefore, the identification and characterization of such interactions is the key to understanding cell biology. Yeast two-hybrid system is an inventive molecular genetic method which enables us to easily detect a great number of protein interactions *in vivo*.

This paper offers an overview of basic principles of yeast two-hybrid system, its advantages and disadvantages, and some of the popular modifications and novel applications of the method.

SADRŽAJ

1. Uvod	3
2. Metabolizam galaktoze u kvasca.....	4
3. Osnove metode	5
4. Nedostatci metode	7
5. Prednosti metode	10
6. Postavljanje sustava dovstrukog kvaš evog hibrida	11
6.1. Konstrukcija fuzijskih proteina	11
6.2. Odabir biblioteke sekvenci	13
6.3. Odabir doma ina	14
7. Modifikacije metode	15
7.1. Unaprje enja sustava dvostrukog kvaš evog hibrida	15
7.2. Reverzni sustav	15
7.3. SRS sustav.....	16
7.4. USPS sustav	17
7.5. Sustav trostrukog kvaš evog hibrida.....	17
7.5.1. Sustav koji uklju uje kinazu	17
7.5.2. Proteinski sustav trostrukog hibrida.....	17
7.5.3. Sustav koji uklju uje RNA.....	18
8. Nove primjene metode	18
8.1. Supresija interakcije	18
8.2. Zamka za proteazu	19
8.3. Analiza itavog genoma	19
10. Literatura	20

1. UVOD

Me uproteinske interakcije predstavljaju osnovu brojnih, ako ne i svih stani nih mehanizama, pa je njihova karakterizacija klju na za razumijevanje biologije stanice. Procesi kao što su sinteza DNA, aktivacija transkripcije, translacija ili lokalizacija proteina redom zahtijevaju prisutnost složenih proteinskih kompleksa. Identifikacija proteina koji stupaju u interakciju i karakterizacija uo ene interakcije omogu uje nam stvaranje jasnije slike o spomenutim procesima, njihovoj evoluciji i ulozi u stani nom metabolizmu te pruža potencijal za manipulaciju otkrivenim interakcijama (Young 1998, Sobhanifar 2003).

Dostupnost itavih genomskih sekvenci brojnih prou avanih organizamainicirala je razvoj novih pristupa u biološkim istraživanjima i postavila biologe pred izazov interpretacije velike koli ine podataka. Istraživanja se uglavnom usredoto uju na karakterizaciju brojnih nepoznatih gena i njihovih transkripata. Karakterizacija nepoznatog proteina i definiranje njegove uloge u stani nom metabolizmu može se posti i indirektno, odnosno identifikacijom njegovih proteinskih partnera. Procijenjeno je da prosje an protein stupa u interakciju s barem pet proteinskih partnera, što tvori kompleksnu mrežu interakcija koja nadilazi složenost genoma (Legrain i sur. 2000). Za prou avanje takve složene mreže interakcija potrebna je metoda koja omogu uje pretraživanje velikog broja proteina istovremeno, kako bi karakterizacija genskih produkata uhvatila korak sa sekvenciranjem i identifikacijom gena (Causier 2003). Tako er, kako bi se steklo detaljno razumijevanje proteinskih interakcija na molekularnoj razini, potrebno je uzeti u obzir stani no okruženje u kojem se prou avane interakcije odvijaju. Stoga metode koje prou avaju proteinske interakcije *in vivo* imaju zna ajnu prednost nad metodama koje ne prou avaju proteine u njihovim prirodnim uvjetima.

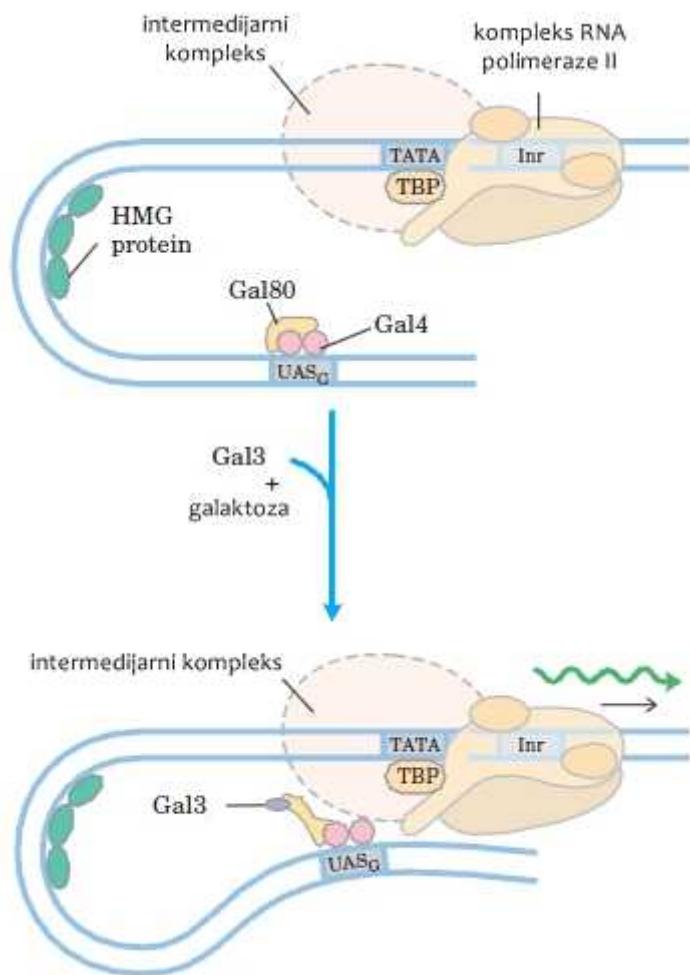
Metoda dvostrukog kvaš evog hibrida, koju su razvili Fields i Song 1989., jednostavan je geneti ki sustav koji detektira interakciju izme u dva proteina *in vivo*. Detekcija interakcije postiže se kreiranjem proteinskih fuzija proteina od interesa s domenama transkripcijiskog faktora koji regulira metabolizam galaktoze u kvazu *Saccharomyces cerevisiae*. Ukoliko dolazi do interakcije nastali proteinski kompleks aktivira gen iji je produkt lako detektirati (Chien i sur. 1991). Spomenuta metoda je zbog injenice da prou ava proteinske interakcije *in vivo* te zbog mogu nosti brzog ispitivanja velikog broja proteina stekla zna ajnu popularnost i do danas omogu ila identifikaciju brojnih proteinskih partnera. Od svog nastanka metoda je doživjela mnoge promjene i modifikacije kako bi zadovoljila potrebe pojedina nih istraživanja, te je dugo vremena predstavljala temeljnu metodu

sistemske biologije. Razvojem novih tehnologija njezina uloga postaje manje zna ajna, ali svakako ne i zanemariva (Auerbach i Stagljar 2005).

2. METABOLIZAM GALAKTOZE U KVASCA

Za razumijevanje metode dvostrukog kvaš evog hibrida neophodno je razumijevanje metabolizma galaktoze u vrste kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Enzimi potrebni za unos i razgradnju galaktoze u kvasaca (Gal1, Gal2, Pgm2, Gal7, Gal10, Mel1) kodirani su genima raspore enim na više razli itih kromosoma. Inicijacija genske transkripcije kod kvasaca se, kao i kod drugih organizama, postiže pomo u više molekularnih mehanizama koji su me usobno uskla eni. Iako se geni *GAL* transkribiraju zasebno, istovremeno posjeduju sli ne promotore i koordinirano su transkripcijski regulirani zajedni kim setom proteina (Sobhanifar 2003). Promotori gena *GAL* sadrže *TATA box*, Inr sekvencu i uzvodnu aktiviraju u sekvecu (*upstream activator sequence*, UAS_G) koju prepoznaje transkripcijski aktivator Gal4 (Nelson i Cox 2008). Transkripcijski represor Gal80 sposoban je vezati Gal4 i inhibirati njegovu aktivnost. Posljednji transkripcijski regulator, Gal3, služi kao detektor galaktoze u stanici. Vezanjem galaktoze i ATP-a Gal3 prolazi konformacijsku promjenu koja mu omogu uje interakciju s Gal80, uslijed ega je onemogu ena migracija Gal80 iz citoplazme u stani nu jezgru (Timson 2007). Kompleks Gal3 s Gal80 tako ostavlja transkripcijski aktivator Gal4 slobodnim te se on nesmetano veže za UAS_G i time aktivira transkripciju *GAL* gena u prisutnosti galaktoze. Valja istaknuti da kvasci preferentno koriste glukoza kao izvor ugljika; ukoliko je glukoza dostupna ve ina *GAL* gena ostaje neaktivna, neovisno o dostupnosti galaktoze. Opisani regulacijski sustav stoga je pod dodatnom kontrolom kompleksnog sustava represije katabolitima koji uklju uje više proteina (Nelson i Cox 2008).

Transkripcijski aktivator Gal4 veže DNA kao dimer, pri emu svaki monomer sadrži dvije funkcionalno važne domene - DNA vezuju u domenu (*DNA-binding domain*, BD) i aktivacijsku domenu (*activation domain*, AD). DNA vezuju a domena prepoznaje i veže karakteristi nu sekvencu DNA (UAS_G), dok aktivacijska domena aktivira RNA polimerazu koja prevodi nizvodni gen u mRNA (Nelson i Cox 2008). Gal4 ne može funkcionirati kao transkripcijski aktivator ukoliko nije fizi ki vezan za aktivacijsku domenu, no ta veza ne mora biti kovalentna. Upravo se ta karakteristika Gal4 pokazala klju nom za razvoj metode dvostrukog kvaš evog hibrida.



Slika 1. Regulacija transkripcije gena

metabolizma galaktoze u kvasaca.

Transkripcija gena za metabolizam galaktoze u kvasaca je pod utjecajem zajedni kog djelovanja tri proteina: Gal4, Gal80 i Gal3, pri emu Gal4 ima glavnu ulogu aktivatora koji se veže DNA. Gal4-Gal80 kompleks nije sposoban aktivirati transkripciju. Interakcija Gal3 s Gal80 dovodi do konformacijske promjene Gal80, koji zatim oslobađa Gal4 i omogućuje transkripcijsku aktivaciju.

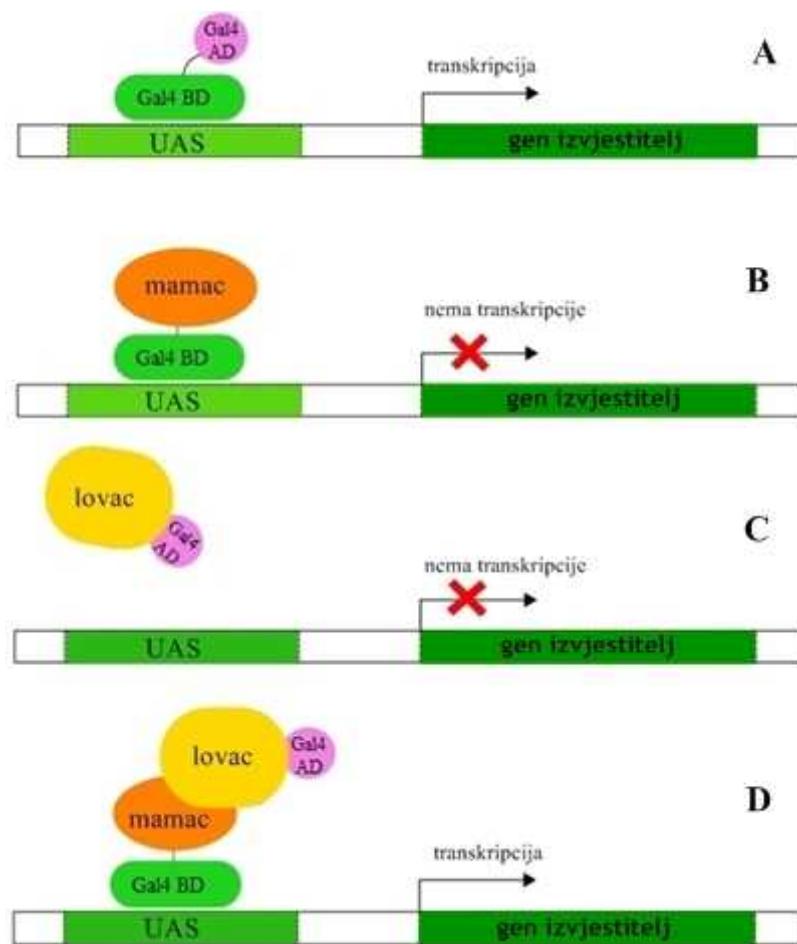
(Izvor: Nelson i Cox 2008)

3. OSNOVE METODE

Sustav dvostrukog kvašenog hibrida provodi se ekspresijom dvaju fuzijskih proteina u kvasca - takozvanog „lovca“ (*hunter*) i „mamac“ (*bait*). Fuzijski proteini su proteini nastali translacijom genske sekvene nastale spajanjem dviju ili više sekvenci gena koji kodiraju za prirodno odvojene proteine ili dijelove proteina (Gietz i sur. 1997).

Prva genska fuzija se osmisli tako da kodira za hibridni protein, protein mamac, koji se sastoji od proteina od interesa koji želimo ispitati i DNA vezujuće domene proteina Gal4. DNA vezujuće domene omogućuju mjesno specifičnu lokalizaciju hibridnog proteina u jezgri. Druga genska fuzija koja se uvodi kodira za hibridni protein, protein „lovac“, koji sadrži aktivacijsku domenu Gal4 i koji takođe ulazi u jezgru. Ostatak proteina lovca može biti kodiran poznatim genom ili predstavljati biblioteku sekvenci (*sequence library*), što nam omogućuje sustavno pretraživanje potencijalnih proteinskih partnera (Chien i sur. 1991).

Konstrukte koji kodiraju za spomenute fuzijske proteine potrebno je unijeti u stani nu liniju kvasca koja sadrži UAS_G sekvencu, koju prepoznae Gal4 DNA vezuju a domena, smještenu uzvodno od gena izvjestitelja. Ukoliko do e do interakcije proteina od interesa i nekog od njegovih potencijalnih partnera, Gal4 DNA vezuju a domena i Gal4 aktivacijska domena su time dovedene u fizi ku blizinu potrebnu za aktivaciju transkripcije gena izvjestitelja. Produkt gena izvjestitelja nam zatim omogu uje detekciju spomenute interakcije. Važno je napomenuti da, ukoliko želimo da metoda bude uspješna, domena hibrida mamca koja pripada proteinu od interesa ne smije biti sposobna samostalno aktivirati gen izvjestitelj (Sobhanifar 2003).



Slika 2. Pregled osnova metode dvostrukog kvaš evog hibrida. A. Transkripcijski faktor Gal4 sastoji se od dvije domene esencijalne za transkripciju gena izvjestitelja: DNA vezuju e domene (BD) i aktivacijske domene (AD). B. i C. Dva konstruirana fuzijska proteina (BD-mamac i AD-lovac) nisu sposobni samostalno aktivirati transkripciju. D. Do transkripcije dolazi samo ako su oba fuzijska proteina eksprimirana te ukoliko stupaju u interakciju.

(Izvor: http://en.wikipedia.org/wiki/Two-hybrid_screening)

Identifikacija proteina koji stupaju u interakciju s mamacem zahtijeva unos niza plazmida, koji sadrže gene za proteine fuzionirane s aktivacijskom domenom, u stani ne linije kvasaca. Protein lovac može predstavljati jedan poznati protein ili biblioteku poznatih ili nepoznatih proteina. U ovom kontekstu biblioteka predstavlja kolekciju sekvenci koje kodiraju za proteine eksprimirane u određenom organizmu ili tkivu. Transformirane stani ne linije se zatim pretražuju u potrazi za aktivnošću gena izvjestitelja te se na taj način identificiraju proteini koji stupaju u interakciju s ispitivanim proteinom od interesa (Auerbach i Stagljar 2005).

Osim sustava koji se bazira na metabolizmu galaktoze, razvijena je i nekolicina drugih sustava. U jednom od popularnijih alternativnih sustava DNA vezuju u domenu i takozvanog bakterijskog protein LexA. LexA je prirodno odgovoran za represiju SOS gena u bakterija time što veže operatorske sekvence koje su integralni dio promotora. Kada se koristi u metodi dvostrukog kvazi-evog hibrida, LexA se ponaša kao aktivator, prije svega zato što su operatori na koje se veže smješteni uzvodno od promotora i kodiraju regulatore gena izvjestitelja (Luban i Goff 1995).

4. NEDOSTATCI METODE

Kao i svaka druga biološka metoda, sustav dvostrukog kvazi-evog hibrida ima svoje prednosti i nedostatke. Kako bi se izbjegla pogrešna interpretacija rezultata potrebno je dobro poznavanje svih manjkavosti metode koju koristimo i potencijalnih problema na koje možemo naići tijekom njezina provođenja. Treba, naime, imati na umu da sustav dvostrukog kvazi-evog hibrida nije primjenjiv na sve vrste proteina i međuproteinskih interakcija.

Budući da je aktivacija gena izvjestitelja ključna za dovođenje zaključaka o međuproteinskoj interakciji proučavanih fizijskih proteina, izuzetno je važno provjeriti da li je protein od interesa sposoban samostalno inducirati transkripciju, odnosno bez prisutnosti aktivacijske domene (Sobhanifar 2003). Ukoliko je zaista tako, potrebno je pronaći način sprjeavanja takve auto-aktivacije, o čemu će biti riječ nešto kasnije.

Jedan od bitnijih nedostataka metode je neophodnost korištenja fizijskih proteina. Oslanjanje na umjetno dizajnirane hibride uvijek sa sobom nosi određeni rizik, budući da fuzionirane domene mogu utjecati na prirodnu konformaciju proteina. Ukoliko je protein u pogrešnoj konformaciji njegova prirodna vezna mjesta mogu postati nedostupna, što znatno narušava njegovu aktivnost. Ipak, korištenje hibridnih proteina do danas se pokazalo vrlo

uspješnim, prije svega zato što su proteinske domene mahom sposobne neovisno zauzeti nativnu konformaciju, omogu uju i tako istovremeno postojanje domena razli itog porijekla unutar istog, hibridnog proteina. Najbolji na in za provjeru ispravnosti konformacije proteina mamca je testiranje interakcije izme u spomenutog proteina i fuzijskog proteina lovca za koji sa sigurnoš u znamo da stupa u interakciju s našim ispitivanim proteinom. Dakako, i u ovom slu aju može se pojaviti problem ukoliko protein lovac zauzme pogrešnu konformaciju. Interakcija dvaju proteina esto nije simetri na, što zna i da ovisi o tome koji je protein korišten kao lovac, a koji kao mamac. Stoga je jedno od rješenja za izbjegavanje pojave lažnih negativa recipro na zamjena uloga proteina lovca i mamca, odnosno fuzija Gal4 aktivacijske domene s proteinom koji je prethodno bio fuzioniran s Gal4 DNA vezuju om domenom, i obrnuto. Valja napomenuti da takva zamijena nije jednostavna, i za sobom povla i mnogo dodatnih eksperimenata i provjera budu i da njome ne izbjegavamo ranije opisane steri ke probleme (Van Crielkinge i Beyaert 1999).

Potencijalno ograni enje metode dvostrukog kvaš evog hibrida je korištenje kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) kao doma ina. Ispitivani proteini moraju biti stabilni i sposobni zauzeti nativnu konformaciju unutar stanica kvasca, kako bi dobiveni rezultati odgovarali stvarnom biološkom stanju. Nadalje, neke interakcije uvelike ovise o posttranslacijskim modifikacijama proteina (kao što su formiranje disulfidnih mostova, glikolizacija ili fosforilacija) koje se odvijaju u viših eukariota, ali se ne moraju nužno ispravno odvijati u kvaš evim stanicama. Kako bi se izbjegao ovaj problem potrebna je ko-ekspresija enzima odgovornih za posttranslacijske modifikacije, koji tako er moraju biti aktivni u danim uvjetima. Dakako, takvo rješenje zahtijeva prethodnu identifikaciju posttranslacijskih modifikacija potrebnih za pravilno funkcioniranje proteina od interesa (Brückner i sur. 2009). Ekspresija proteina mamca dodatno fuzioniranog s odgovaraju im modifikacijskim enzimom uspješno je iskorištena pri identifikaciji interakcije ovisne o acetilaciji histona, i interakcije ovisne o fosforilaciji RNA polimeraze II (Guo i sur. 2004). Nedostatak kompleksnijih posttranslacijskih modifikacija problem je koji je mnogo teže zaobi i, a koji zahtjeva kreiranje posebno modificirane linije kvasca sposobne za proizvodnju ljudskih proteina (Hamilton i sur. 2007).

Metoda dvostrukog kvaš evog hibrida nije jednako u inkovita za sve vrste proteina. Budu i da se fuzijski proteini iju interakciju testiramo moraju nalaziti unutar stani ne jezgre, ispitivanje vanstani nih ili membranskih proteina može predstavljati problem i op enito je manje uspješno (Sobhanifar, 2003).

Pri klasi noj pripremi dvostrukih hibrida pomo u biblioteke cDNA svega je jedna od šest fuzioniranih DNA sekvenci u pravilnom okviru itanja. Unato tome, rezultat je preko milijun neovisnih klonova koje treba analizirati, što samu metodu dovodi na granicu izvedivosti ukoliko želimo dobru zastupljenost analiziranih proteina. Problem se može zaobi i tako da se prethodno naprave sažete biblioteke cDNA sekvenci relevantnih tkiva ili tipova stanica, ili korištenjem jednostavnijeg organizma u istraživanju (Van Crieging i Beyaert 1999). Mnogi izolati ne moraju predstavljati cDNA sekvence pune dužine. Dokazano je da zasebne domene mogu reagirati uspješnije od cjelovitih klonova, a razlog tome je vjerojatno ispoljavanje funkcija pojedina nih domena uslijed nedostatka steri kih ograni enja uzrokovanih karakteristi nim smatanjem proteina (Auerbach i Stagljar 2005). Budu i da pretraživanjem biblioteka odabiremo optimizirane reakcije, konstrukti koji ne predstavljaju itave proteine doprinose stvaranju pogrešne slike prilikom o itavanja rezultata. Najbolje rješenje za ovaj problem uklju uje kloniranje isklju ivo cDNA sekvenci pune duljine i u ispravnom okviru itanja, što zahtjeva puno vremena i napornog rada no daje odli ne rezultate (Gietz i sur. 2007).

S obzirom na to da metoda dvostrukog kvaš evog hibrida mjeri aktivnost isklju ivo gena izvjestitelja, mora se uzeti u obzir mogu nost postojanja tre eg proteina koji je potencijalno odgovoran za povezivanje lovca i mamca. Iako je ta mogu nost slabo vjerojatna, ne treba na nju zaboraviti, pogotovo zato što esto predstavlja problem prilikom provedbe brojnih biokemijskih metoda i tehnika (Sobhanifar 2003).

Problem pretraživanja velikog broja proteina koje ne nalazimo prirodno u kvasaca je izme u ostalog taj što ne možemo znati na koji e se na in svaki od tih proteina ponašati u tom novom okruženju. Osim što, kao što je ranije spomenuto, proteini mogu izgubiti svoju prirodnu aktivnost, mogu tako er postati toksi ni za svog doma ina. Velik broj proteina, kao što su ciklini ili *homeobox* genski produkti, zaista je toksi an u okruženju stani ne jezgre, a neki od njih sposobni su razgraditi esencijalne proteine kvasca ili odcijepiti Gal4 domene fizijskih proteina. Interakciju takvih proteina stoga nije mogu e detektirati tijekom rasta, te se predstavljaju kao lažni negativi (Van Crieging i Beyaert 1999, Ratushny i Golemis 2008).

Budu i da se metodom dvostrukog kvaš evog hibrida ispituju sve kombinacije interakcija proteina, postoji mogu nost detekcije umjetnih proteinskih partnera, što je tipi an nedostatak iscrpnih pretraživa kih metoda. Neki proteini imaju velik potencijal postati interakcijski partneri, no prirodno nikada ne stupaju u interakciju. Razlog tomu može biti njihova prostorna i ili vremenska odvojenost; proteini mogu biti eksprimirani u razli itim tipovima stanica, lokalizirani u razli itim stani nim odjeljcima, eksprimirani u razli itim

fazama embriogeneze ili stani nog ciklusa, itd. Stoga je uvijek važno provjeriti ima li otkrivena interakcija dvaju proteina zadovoljavaju u biološku pozadinu (Auerbach i Stagljar 2005, Ratushny i Golemis 2008).

5. PREDNOSTI METODE

Usprkos ranije opisanim nedostatcima, metoda dvostrukog kvaš evog hibrida tako er ima stanovite prednosti nad klasi nim biokemijskim i geneti kim pristupima. Prije svega, važno je primijetiti da je rije o *in vivo* tehnici, što je samo po sebi napredno u odnosu na jednostavne biokemijske metode. Tako er, sustav koristi kvasac kao doma ina i time vjernije imitira okruženje u kojem se proteini nalaze u viših eukariota, nasuprot sustavima koji koriste bakterije kao doma ina (Ratushny i Golemis 2008). Nasuprot biokemijskim metodama koje esto zahtijevaju velike koli ine pro iš enih proteina ili antitijela dobre kvalitete, postavljanje pretraživanja kod metode dvostrukog kvaš evog hibrida nije naro ito zahtjevan proces. Sve što je potrebno je biblioteka cDNA sekvenci (koje ak ni ne moraju biti cjelovite) ili jedna sekvenca gena od interesa (Young 1998).

Slabe i suptilne interakcije (koje su esto i najzanimljivije u signalnim kaskadama) najlakše je detektirati pomo u ove metode, budu i da korištenje gena izvjestitelja rezultira zna ajnim poja avanjem signala. Važno je imati na umu da detekcija slabih signala podržava pojavu ve eg broja lažnih pozitiva, te je potrebno održavati ravnotežu izme u željene osjetljivosti i preciznosti metode (Causier 2003). Osim mogu nosti pretraživanja biblioteka sekvenci, sustav dvostrukog kvaš evog hibrida tako er nudi mogu nost karakterizacije poznatih interakcija. To se može posti i detekcijom aminokiselinskih ograna klju nih za interakciju ispitivanjem kreiranih mutanata ili funkcionalnom karakterizacijom zasebnih proteinskih domena (Puthalakath i sur. 2000). Provedba kvantitativnih eksperimenata omogu ava nam interpretaciju afiniteta vezanja pojedinih proteina. U nekoliko je navrata dokazano da sklonost interakciji predvi ena metodom dvostrukog kvaš evog hibrida dobro odgovara onoj odre enoj *in vitro* pomo u kvantitativnih biokemijskih metoda, pa nam tako izme u ostalog omogu uje razlu ivanje izme u visokog, srednjeg i niskog afiniteta me uproteinske interakcije (Pandey i sur. 2000).

Kao što je navedeno me u opisanim nedostatcima metode, smatra se da je metoda dvostrukog kvaš evog hibrida uglavnom ograni ena na prou avanje citoplazmatskih proteina. Vanstani ni proteini i proteinske domene esto su podvrnuti posttranslacijskim

modifikacijama koje se ne odvijaju u jezgri stanica kvasca, što zna ajno utje e na uspješnost njihovog prou avanja ovom metodom (Sobhanifar 2003). Unato tome zabilježene su brojne uspješne analize interakcija koje uklju uju transmembranske receptore. Prikladne vanstani ne reakcije izme u receptora i liganda su demonstrirane za hormon rasta i prolaktin, te njihove odgovaraju e receptore (Kajkowski i sur. 1997). Ipak, metoda se do danas nije pokazala uspješnom pri identifikaciji interakcije s domenama koje se prirodno nalaze unutar same stani ne membrane.

Pretraživanje metodom dvostrukog kvaš evog hibrida esto se naziva funkcionalnim pretraživanjem, budu i da ukoliko barem jedan od proteinskih partnera ima dobro definiranu ulogu u odre enom signalnom putu, možemo s lako om naslutiti i ulogu proteina koji s njime stupa u interakciju. Pripisivanje funkcije nepoznatom proteinu mamecu uvijek je mnogo zahtjevnije, pa je u tom slu aju precizna identifikacija proteinskih partnera koji stupaju u interakciju od klju ne važnosti (Causier 2003).

Iako ve sam ishod pretraživanja esto rezultira nastajanjem brojnih novih hipoteza, on još uvijek treba biti potvr en drugim metodama. Postoji dovoljno razloga za oprez pri korištenju sustava dvostrukog kvaš evog hibrida te za skepti nost prema dobivenim rezultatima, no unato svim nedostatcima na ovaj su na in velikom brzinom uspješno okarakterizirani brojni signalni putevi (Van Crieckinge i Beyaert 1999).

6. POSTAVLJANJE SUSTAVA DVOSTRUKOG KVAŠ EVOG HIBRIDA

6.1. Konstrukcija fuzijskih proteina

Postoji velik broj DNA vezuju ih i aktivacijskih domena pomo u kojih se mogu konstruirati fuzijski proteini, no još uvijek su najzastupljenije one bazirane na proteinu Gal4, djelomi no zato što su prve postale komercijalno dostupne. Alternativni sustavi koriste DNA vezuju u domenu bakterijskog proteina LexA i aktivacijsku domenu virusnog proteina VP16. Oba sustava imaju svoje prednosti i nedostatke, a preporu a se da se pretraživanje, ukoliko je to mogu e, provede u više sustava budu i da se neke interakcije druk ije detektiraju u svakome od njih. Važna je i razina aktivnosti aktivacijskih domena, odnosno njihova sposobnost da iniciraju transkripciju. Aktivacijske domene VP16 i Gal4 su obje snažni aktivatori, što itav sustav ini osjetljivijim ali manje preciznim (Young 1998).

Jedna od važnih stavki je i odabir promotora koji regulira razinu ekspresije ciljnog proteina. Najčešći korišten promotor je ADH1 promotor, koji prirodno omogućuje ekspresiju metaboličkog enzima alkohol dehidrogenaze 1 u kvasaca. Spomenuti promotor omogućuje visoku razinu ekspresije gena uz koji je vezan, koja doseže vrhunac tijekom logaritamske faze rasta kvasaca. Treba imati na umu da je ekspresija deset puta manja ukoliko kvasac raste na hranidbenoj podlozi koja ne sadrži izvor ugljika koji je moguće fermentirati. Kada je potrebna manja razina ekspresije ciljnih proteina koristi se kraće, manje efektivna verzija ADH1 promotora (Sobhanifar 2003).

Ukupna razina ekspresije fizijskih proteina ne ovisi samo o jednom promotoru i korištenom izvoru ugljika, nego i o broju kopija plazmida. Izvorištvo replikacije koje se najčešće koristi (takođe 2-mm) inicira DNA replikaciju slijedom kromosomskoj, a održava plazmid u 50-100 kopija po stanici. Ukoliko koristimo reverzni hibridni sustav, o kojem će biti riječ nešto kasnije, ili ispitujemo proteine tokom za stanice kvasca, poželjno je koristiti plazmide koji su održavani u malom broju kopija (Van Crielings i Beyer 1999).

Uvijek je korisno imati na radu provjere uspješnosti transformacije kvaševih stanica željenim plazmidima. Zbog toga plazmidi uglavnom nose i gen koji omogućava takvu provjeru. Gen *cyh2*, koji je prisutan u nekim komercijalno dostupnim vektorima, takođe se koristi u tehnici svrhe. *Cyh2* kodira za protein L9 kvaševog ribosoma, koji osigurava kvascu otpornost na toksin cikloheksamid. Dodavanjem cikloheksamida u hranidbenu podlogu lako možemo utvrditi koje su stanice uspješno transformirane, budući da su jedino kvasci koji sadrže plazmid otporni na toksin i sposobni preživjeti. Većini linija kvasaca koje se koriste za sustav dvostrukog kvaševog hibrida nedostaje neki od gena potrebnih za metabolizam esencijalnih aminokiselina, pa korištenje plazmida koji sadrži taj gen omogućuje pouzdanu provjeru uspješnosti transformacije. Dodatne provjere uključuju sekvenciranje hibridne DNA kako bi se osigurao unos ispravnog genskog konstruktta te povjeru ekspresije ciljnih proteina pomoći u *Western blott-a* (Gietz i sur. 1997, Van Crielings i Beyer 1999).

Budući da se sustav dvostrukog kvaševog hibrida temelji na uspješnom uspostavljanju funkcionalnog transkripcijskog faktora, auto-aktivacijska sposobnost jednog od fizijskih proteina može predstavljati značajan problem. Inicijacija transkripcije kao posljedica latentne aktivacijske sposobnosti prisutna je kod prosječno 5% svih proteina, te je još dodatno izražena kod nasumično generiranih fragmenata. Korištenje cDNA biblioteke fuzionirane s DNA vezujućim domenom rezultiralo bi pojmom velike kolичine lažnih pozitiva uslijed auto-aktivacije (Gietz i sur. 1997). Upravo zbog toga se sa aktivacijskom domenom fuzioniraju i sekvenci biblioteke. Ako transformiramo liniju kvasca samo

s plazmidom koji kodira za protein mamac, lako možemo utvrditi dolazi li do auto-aktivacije. U tom sluaju jedno od rješenja je utvrđivanje koja regija proteina aktivira transkripciju, te njezino uklanjanje (Sobhanifar 2003). Alternativno, umjesto fuzioniranja DNA vezujuće domene na C-terminalni kraj proteina, može se provesti N-terminalna fuzija. U slučajevima kada N-terminalni krajevi proteina nisu slobodni za interakciju zabilježeno je značajno pojava anje interakcijskih signala. Takvi konstrukti, uz rješavanje problema auto-aktivacije, mogu dovesti do identifikacije interakcijskih partnera koji nisu bili otkriveni prilikom regularnog pretraživanja (Van Crielinge i Beyaert 1999). U slučajevima kada je auto-aktivacija jednakom u inkovitom kao aktivacija pomoću proteinskog partnera, moguće je iskoristiti obrnuti pristup. Korištenjem toksičnog gena izvjestitelja i auto-aktivirajućeg proteina mamac pod inducibilnim promotorom, stanice kvasca u kojima transkripcija gena izvjestitelja nije blokirana uslijed proteinske interakcije neće preživjeti. Preživjele stanice u tom slučaju sadrže plazmid koji kodira za proteinskog interakcijskog partnera auto-aktivirajući proteina mamac (Causier 2003).

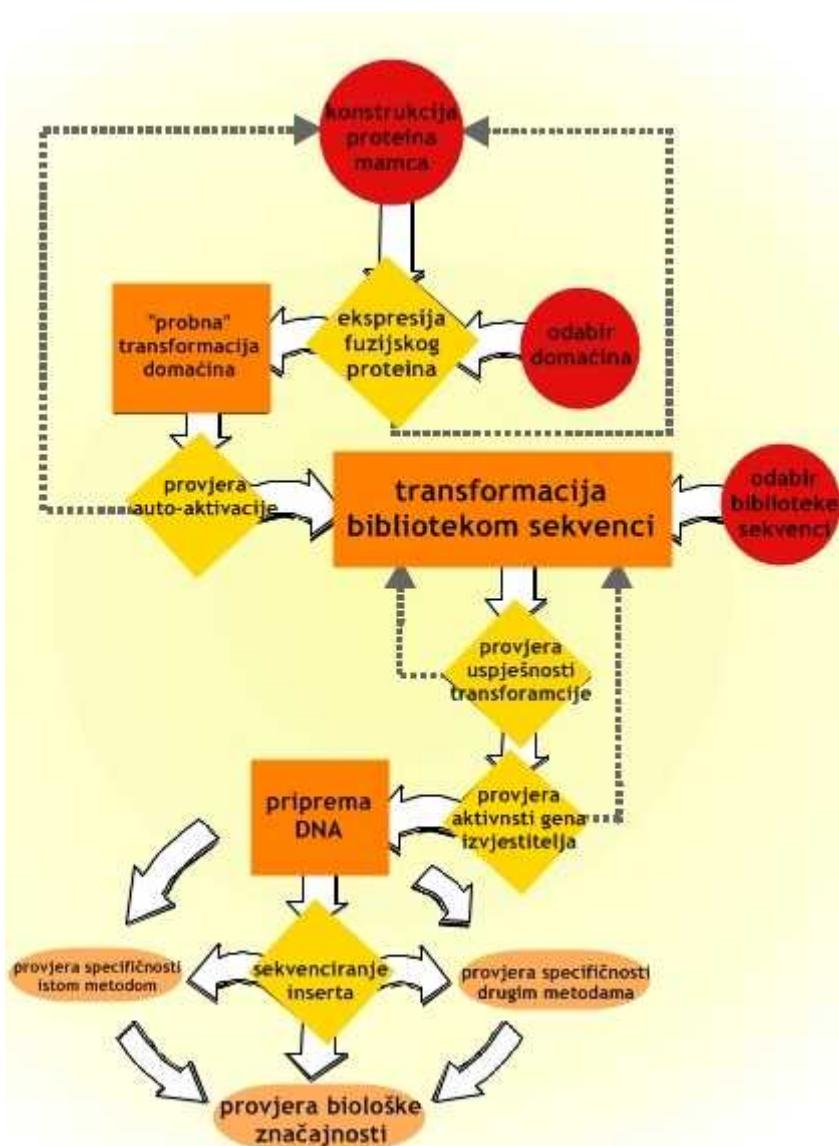
Konačno, od iznimne je važnosti da ispitivani proteini budu ispravno lokalizirani u stanici noj jezgri, budući da se ondje odvijaju najvažniji transkripcijski događaji. DNA vezujuće domene posjeduju vlastiti signal za lokalizaciju u jezgri, iako se ispravnost lako može provjeriti pozitivnom kontrolom. Iako je poželjno da oba proteina posjeduju lokalacijski signal, uglavnom je dovoljan signal samo jednog od proteina za prevođenje itavog proteinskog kompleksa u jezgru (Brückner i sur. 2009).

6.2. Odabir biblioteke sekvenčnih

Pri pretraživanju je preporučljivo koristiti unaprijed pripremljenu biblioteku cDNA sekvenčnih tkiva u kojem je naš protein od interesa biološki značajan. Pretraživanje itave cDNA biblioteke sisavaca zahtjevalo bi pripremu ak. 10^7 transformanata kvasca. Parametri pomoću kojih možemo procijeniti kvalitetu pripremljene biblioteke sekvenčnih su broj neovisnih klonova prije i nakon umnažanja plazmida, broj klonova koji sadrže insert i srednja duljina inserta (Auerbach i Stagljar 2005).

Najčešće korišten plazmid je plazmid GAL4 sustava, sa kojeg se fuzijski proteini konstitutivno ali slabo eksprimiraju. U alternativnom LexA sustavu, geni koji kodiraju za fuzijske proteine nalaze se pod mnogo jačim, ali inducibilnim promotorom, koji zahtjeva zasebnu aktivaciju. U sustavu koji koristi inducibilnu ekspresiju fuzijski proteini sa aktivacijskom domenom imaju manji potencijal postati toksični za domaćinu, te stoga ne bivaju eliminirani prikazujući se kao lažni negativi. Ipak, korištenje inducibilnog promotora

produžuje eksperimentalni postupak budu i da efikasnost transformacije drastično pada ako se transformanti direktno selektiraju na svim auksotrofnim biljezima i na izvoru ugljika koji inducira ekspresiju fuzijskih proteina. Stoga se provjera uspješnosti transformacije uglavnom vrši prije same indukcije (Causier 2003).



Slika 3. Općeniti dijagram postavljanja hipotetskog sustava dvostrukog kvaš evog hibrida. Isprekidane strelice označavaju korake koji se primjenjuju u slučaju negativnih rezultata. (Izvor: Van Criekinge i Beyaert 1999)

6.3. Odabir domaćina

Kako bi se izbjeglo uplitanje prirodno prisutnih endogenih Gal4 i Gal80 proteina, linije kvasaca koje se koriste kao domaćini za GAL4 sustav dvostrukog kvaš evog hibrida moraju nositi delecije gena *gal4* i *gal80*. Uslijed takve delecije stanice kvasca rastu sporije u

usporedbi s divljim tipom kvasca. Ovaj problem se može zaobići i korištenjem sustava temeljenog na bakterijskom proteinu LexA (Van Crieging i Béaert 1999).

Gen izvjestitelj može biti inkorporiran u genom kvasca ili obitavati odvojeno na plazmidu. U potonjem slučaju, nepraktičnost unošenja dodatnog plazmida i selekcije na temelju zasebnog autotrofnog biljega je nadoknada pojava anomalskog osjetljivošću pretraživanja. Ukoliko koristimo LexA sustav, tada se gen izvjestitelj *lacZ* nalazi na plazmidu koji postoji u velikom broju kopija, sa lakoćom možemo detektirati i vrlo slabe signale provjeravajući aktivnost β-galaktozidaze pomoću X-gal (5-bromo-4-kloro-indolil-β-D-galactopiranozida) koji se nalazi u samom mediju. Takođe, treba osigurati da svim plazmidima nedostaje *gal1* UAS_G sekvenca, kako ekspresija gena izvjestitelja ne bi ovisila o razini glukoze ili galaktoze (Gietz i sur. 1997). Osjetljivost samog gena izvjestitelja korištenog u GAL4 sustavu ovisi isključivo o vrsti promotora pod kojim se on nalazi. Osim toga, ako usporedimo gene izvjestitelje *lacZ* i *his3*, *lacZ* je manje fleksibilan ali i manje sklon davati lažne pozitive (Serebriiskii i sur. 2000).

7. MODIFIKACIJE METODE

7.1. Unaprjeđenja sustava dvostrukog kvaševog hibrida

Jedno od postojećih unaprjeđenja sustava dvostrukog kvaševog hibrida uključuje uspostavu linije domaćeg iznimno osjetljive na slabe interakcije, a koja istovremeno značajno reducira nastanak lažnih pozitiva korištenjem jednostavne selekcije temeljene na sastavu hranidbenih podloga. Spomenuta linija sadrži tri gena izvjestitelja (*his3*, *ade2* i *lacZ*) od kojih svaki posjeduje vlastiti promotor pod utjecajem Gal4-ovisnog aktivatora.

Druga pak modifikacija sustava koristi protein mamac fuzioniran s DNA vezujući domenom ljudskog estrogenskog receptora. Gen izvjestitelj je *ura3*, pod kontrolom tri elementa estrogenskog receptora. Prednost ovog sustava je ta da omogućuje kvantitativnu analizu rezultata, mjerenjem aktivnosti orotoidin-5-monofosfat dekarboksilaze (enzima produkta gena izvjestitelja) (Van Crieging i Béaert 1999). Osim toga, korištenje različitih kombinacija promotora i gena izvjestitelja dobra je strategija za izbjegavanje lažnih pozitiva.

7.2. Reverzni sustav

Sustav dvostrukog kvaševog hibrida ne ostavlja prostora za genetičku selekciju slučaju u kojima izostaje proteinska interakcija između proučavanih proteinova, pa je stoga i

njegova primjena u karakterizaciji i manipulaciji proteinskih interakcija ograni ena. Kako bi se dosko ilo ovom problemu razvijeni su reverzni sustavi koji koriste linije kvasaca u kojima proteinska interakcija hibrida rezultira pove anom ekspresijom gena iji je produkt toksi an za doma ina. U takvim uvjetima nedostatak interakcije pruža selektivnu prednost i može se otkriti; što nam omogu uje istovremeno pretraživanje milijuna kolonija iji proteinski produkti stupaju u interakciju u potrazi za nekolicinom kolonija unutar kojih ne dolazi do interakcije. Jedna od ina ica takvog sustava koristi ranije spomenuti gen *cyh2* koji osigurava otpornost stanica na toksin cikloheksimid. U drugom slu aju reverzni hibridni sustav koristi gen izvjestitelj *ura3*, koji kodira za orotidin-5-fosfat dekarboksilazu. Spomenuti enzim, osim što prirodno sudjeluje u biosintezi uracila, tako er katalizira pretvorbu 5-fluorooroti ne kiseline u toksi ni produkt 5-fluorouracil. Ukoliko uzgajamo kolonije na podlozi koja sadrži 5-fluorooroti nu kiselinu preživjet e samo one u kojima ne dolazi do interakcije proteinskih hibrida (White 1996).

Jedna od prednosti reverznog sustava je ta da omogu uje selekciju mutacija iz nasumi no generirane biblioteke gena koje utje u na proteinsku interakciju. Tako er, pruža nam mogu nost pretraživanja velike biblioteke peptida u potrazi za malim konstruktima koji spre avaju interakciju.

7.3. SRS sustav

SRS sustav (*Sos-recruitment system*) temelji se na injenici da je hSos (protein odgovoran za izmjenu GDP-a i GTP-a u sisavaca) sposoban aktivirati protein Ras jedino kada je lokaliziran na stani noj membrani. Kvemu *Saccharomyces cerevisiae* za rast i vijabilnost stanica potreban je funkcionalan Ras signalni put, pa tako linija kvasca koja sadrži to kastu mutaciju unutar proteina koji prirodno vrši izmjenu GDP-a i GTP-a pokazuje temperaturno osjetljiv rast. Ekspresija proteina hSos umjetno usmjereno prema membrani može ponovo uspostaviti rast kolonija na nepovoljnoj temperaturi. SRS sustav tako koristi uspješnost lokalizacije proteina hSos na membrani kao metodu detekcije interakcije - protein mamac se fuzionira s hSos proteinom, a protein lovac sa signalom odgovornim za lokalizaciju hSos. Ukoliko fuzijski proteini stupaju u interakciju, hSos biva lokaliziran na stani noj membrani te kao rezultat uspješne uspostave Ras signalnog puta mutirane kolonije kvasaca preživljavaju nepovoljnu temperaturu (Brückner i sur. 2009).

Ovaj sustav pruža zna ajnu prednost pri prouavanju interakcija koje uklju uju transkripcijiske aktivatore ili represore, budu i da se ne temelji na o itavanju transkripcijiske aktivnosti. Jednako tako, omogu uje ispitivanje proteinskih interakcija u citosolnom

okruženju koje je brojnim proteinima prirodnije od uvjeta stani ne jezgre. SRS sustav se stoga uglavnom koristi pri karakterizaciji interakcija membranskih i citosolnih proteina.

7.4. USPS sustav

USPS sustav (*ubiquitin-based split-protein system*) temelji se na injenici da u eukariota novouspostavljeni kompleks ubikvitina i njegovog proteinskog partnera neminovno biva razgranat u proteazama specifičnim za ubikvitin. Protein mamac u ovom je sustavu fuzioniran s C-terminalnim fragmentom ubikvitina, a protein lovac s N-terminalnim fragmentom ubikvitina. Uspostava nativnog ubikvitina putem proteinske interakcije hibridnih proteina tako rezultira *in vivo* razgradnjom kompleksa specifičnim proteazama, koja se može pratiti kinetički (Causier 2003).

7.5. Sustav trostrukog kvaševog hibrida

7.5.1. Sustav trostrukog hibrida koji uključuje kinazu

Sustav trostrukog kvaševog hibrida koji uključuje kinazu pruža nam mogunost detekcije proteinskih interakcija ovisnih o posttranslacijskim modifikacijama. Fosforilacija tirozina je najzastupljenija modifikacija korištena u signalnim putevima stanica viših eukariota. Odabirom kinaza koje vežu dva proteina istog signalnog puta i njihovim uključivanjem u hibridni sustav omogućimo selekciju proteinskih interakcija koje zahtijevaju prethodnu fosforilaciju proteina (Kochan i sur. 2000).

7.5.2. Proteinski sustav trostrukog hibrida

Proteinski sustav trostrukog kvaševog hibrida unaprjeđuje sustav dvostrukog kvaševog hibrida time što uvodi treći protein koji je jednako odgovoran za stabilnu proteinsku interakciju i aktivaciju gena izvjestitelja. Utjecaj trećeg uvedenog proteina može se temeljiti na posredovanju interakcije drugih dvaju proteina ili indukciji konformacijske promjene jednog od njih.

Istraživanja vanstanih domena transmembranskih receptora dovele su do razvoja trostrukog hibridnog sustava koji uključuje peptidni ligand. U tom je sustavu vanstani na domena transmembranskog receptora posebno vezana za DNA vezuju u domenu i aktivacijsku domenu Gal4 proteina. Peptid ili drugi ligand koji proučava domena prirodno veže sposoban je posredovati u njezinoj dimerizaciji. Prisutnost takvog liganda stoga rezultira transkripcijском aktivacijom gena izvjestitelja. Mnogi se temeljni fiziološki procesi baziraju

na receptorima malih liganada, što ih postavlja u središte pozornosti istraživanja koja nastoje razviti metode ciljanih farmakoloških intervencija. U tom kontekstu ovaj sustav ima potencijal za stjecanje popularnosti. Ipak, trostruki hibridni sustav susreće se s istim ogranicima enjima kao standardni hibridni sustav, te je upitno koliko ekspresija unutar stanica kvasca utječe na transmembranske receptore viših eukariota. Budući da ovaj sustav uključuje difuziju potencijalnog liganda u stanicu kvasca, problem permeabilnosti membrane za ispitivane ligande takođe može ograniciti primjenjivost metode (Licitra i Liu 1996).

7.5.3. Sustav koji uključuje RNA

RNA sustav trostrukog hibrida koristi dva hibridna proteina i jednu hibridnu RNA molekulu. Jedan dio RNA molekule stupa u poznatu interakciju, dok drugi dio može biti iskorišten za pretraživanje biblioteke proteina koji vežu RNA. U ovom su sustavu DNA vezujući i aktivacijska domena Gal4 proteina dovedene u blizinu putem interakcije rekombinantnog fizijskog proteina s rekombinantnom RNA. Metoda nam pruža mogućnost proučavanja interakcije RNA i proteina *in vivo*, detekciju proteina koji vežu RNA molekule ili analizu njihove strukturalne specifičnosti, uz korištenje ostalih prednosti sustava dvostrukog kvašenog hibrida (Sengupta i sur. 1996).

8. NOVE PRIMJENE METODE

8.1. Supresija interakcije

Supresija interakcije jedna je od malobrojnih tehniki koja omogućuje procjenu biološke značnosti interakcije između dvaju proteina. Ova metoda primjenjuje sustav dvostrukog kvašenog hibrida na vrlo originalan način. U prvom koraku koristi se reverzni sustav kako bi se pretražile mutacije koje utječu na vezanje proteina mamca i njegovih partnera. Kada se jednom pronađe odgovarajuća mutirana ina ica mamca, imamo mogućnost proučavanja utjecaja pronađene mutacije na fenotip. Ipak, ovime ne možemo isključiti opciju da je promjena fenotipa zapravo posljedica nedostatka interakcije s nekim trećim, nepoznatim proteinom, a ne sa ranije identificiranim proteinskim partnerom. Stoga je u drugom koraku potrebno pronađi i odgovarajuću mutiranu inu icu proteina lovca koji je sposoban stupiti u interakciju s mutiranom inu icom proteina mamca, i time ponovo uspostaviti izvorni fenotip (Van Criekinge i Beyaert 1999, Sobhanifar 2003).

8.2. Zamka za proteazu

Sustav zamke za proteazu temelji svoj princip na uspješnosti lokalizacije fuzijskih proteina u stani noj jezgri. Funkcionalan transkripcijski faktor fuzioniran je s domenom koja ga sprejava da dospije u jezgru stanice. Ukoliko se između transkripcijskog faktora i domene uklonira peptidna sekvenca koju potencijalno cijepa nepoznata proteaza, u mogućnosti smo napraviti pretraživanje s ciljem identifikacije takve proteaze. Odgovarajuća proteaza sposobna je pocijepati uklonirano proteazno mjesto te tako oslobođiti transkripcijski faktor koji zatim otputuje u jezgru i ondje aktivira transkripciju gena izvjestitelja. Ovaj postupak se takođe može iskoristiti za određivanje sekvence koju cijepa poznata proteaza, generiranjem nasumičnih peptidnih sekvenci između transkripcijskog faktora i fuzionirane domene (Van Crieplingen i sur. 1999).

8.3. Analiza itavog genoma

Jedna od najambicioznijih primjena metode dvostrukog kvazi-evogenog hibrida je uspostava takozvanih mapa proteinskih veza (*protein linkage maps*). Takve mape opisuju sve proteinske interakcije koje se odvijaju tijekom razvoja životnog vijeka stanice. Istraživanja ove vrste mogu već dobro proučiti proteinima pridružiti nove funkcije identifikacijom neovisnih interakcija i otkrivanjem veza između metabolika puteva, te tako doprinijeti stjecanju boljeg uvida u cjelokupnu kompleksnost stanice (Evangelista i sur. 1996, Causier 2003).

U početku su nasumične biblioteke cDNA fuzionirane na DNA vezuju u domenu, te su nasumični hibridi aktivacijske domene korišteni kako bi se pretražile sve moguće interakcije. Taj je postupak korišten kod istraživanja proteoma bakteriofaga T7 (Grigoriev 2001). Kasnije je metoda primjenjena na složenije organizme. Iako je genom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u potpunosti sekvenciran i proučavan dugo vremena, još uvek 60% genoma ima nepoznatu ulogu, a polovica spomenutih gena kodira za proteine koji nisu homologni poznatim proteinima. Mapa proteinskih veza za kvasac još je uvek u procesu izrade, pomoći u metode dvostrukog kvazi-evogenog hibrida. Za svaki je mamac odabran set lovaca raspoređenih u kategorije prema građi i funkciji. Pomoći u te se klasifikacije odabiru proteini za drugi niz testiranja i time sužava izbor interakcijskih partnera. Opetovano ponavljanje ovog postupka dovodi do karakterizacije mreže interakcija (Ito i sur. 2001). Prilikom primjene ranije spomenutog postupka na bakteriofagu T7 pokazalo se da je 4% konstrukata sposobno

za auto-aktivaciju. Ako primijenimo isti postupak na organizam kao što je kvasac, koji posjeduje oko 7000 proteina, lažni pozitivi i negativi mogu predstavljati znatan problem i uvelike utjecati na ishod istraživanja. Tako se u ovom sluaju umjesto nasumi nih biblioteki cDNA sekvenci koristi takozvano „dvostruko-PCR-in vivo-kloniranje“, metoda koja osigurava da se u svaki plazmid ugradi konstrukt u pravilnom okviru itanja. Automatizacijom postupka moguće je pretražiti i do 50 milijuna uzoraka. Određivanje biološke značnosti dobivenih rezultata sljedeći je korak u istraživanju, te je ujedno i postupak koji oduzima najviše vremena pri određivanju molekularnih mehanizama bioloških reakcija (Van Crielinge i Beyaert 1999).

9. LITERATURA

1. **Auerbach D, Stagljar I** (2005). Yeast Two-Hybrid Protein-Protein Interaction Networks. *Proteomics and Protein-Protein Interactions: Biology, Chemistry, Bioinformatics and Drug Design*, Springer, New York, 19-31
2. **Brückner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U** (2009). Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2763-2788
3. **Causier B** (2004). Studying the interactome with the yeast two-hybrid system and mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 23, 350-367
4. **Chien C, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S** (1991). The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Biochemistry*, 88, 9576-9582.
5. **Evangelista C, Lockshon D, Fields S** (1996). The yeast two-hybrid system: prospects for protein linkage maps. *Trends in Cell Biology*, 6, 196-199
6. **Finley R** (1997). Examining the function of proteins and protein networks with the yeast two-hybrid system. *Finley Lab Protocols*, <http://proteome.wayne.edu/Update.html>
7. **Gietz RD, Triggs-Raine B, Robbins A, Graham KC, Woods RA** (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: Applications of the yeast two-hybrid system. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 172, 67-79
8. **Grigoriev A** (2001). A relationship between gene expression and protein interactions on the proteome scale: analysis of the bacteriophage T7 and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 29, 3513-3519

9. **Guo D, Hazbun TR, Xu XJ, Ng SL, Fields S, Kuo MH** (2004). A tethered catalysis, two-hybrid system to identify protein-protein interactions requiring post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, 22, 888-892.
10. **Hamilton SR, Gerngross TU** (2007). Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 387-392
11. **Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y** (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4569–4574
12. **Kajkowski EM, Price LA, Pausch MH, Young KH, Ozenberger BA** (1997). Investigation of growth hormone releasing hormone receptor structure and activity using yeast expression technologies. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 17, 293-303
13. **Kochan JP, Volpers C, Osborne MA** (2000). The Yeast Tribrid System: cDNA Expression Cloning of Protein Interactions Dependent on Posttranslational Modifications. *Methods in Enzymology*, 328, 111-127
14. **Legrain P, Jestin JL, Schächter V** (2000). From the analysis of protein complexes to proteome-wide linkage maps. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 402–407
15. **Licitra EJ, Liu JO** (1996). A three-hybrid system for detecting small ligand–protein receptor interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 12817-12821
16. **Luban J, Goff SP** (1995). The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(1), 59-64
17. **Nelson DL, Cox MM** (2008). Lehninger Principles of Biochemistry (Fifth Edition). *W. H. Freeman and company, New York*
18. **Pandey A, Mann M** (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405, 837-46
19. **Phyzicki EM, Fields S** (1995). Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 94-123
20. **Piehler J** (2005). New methodologies for measuring protein interactions in vivo and in vitro. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 4-14
21. **Puthalakath H, Strasser A, Huang DC** (2001). Rapid selection against truncation mutants in yeast reverse two-hybrid screens. *Biotechniques*, 30(5), 984-8
22. **Ratshni V, Golemis EA** (2008). Resolving the network of cell signaling pathways using the evolving yeast two-hybrid system. *Biotechniques*, 44(5), 655-662

23. **Sengupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M** (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 8496-8501
24. **Serebriiskii I, Estojak J, Berman M, Golemis EA** (2000). Approaches to Detecting False Positives in Yeast Two -Hybrid Systems. *Biotechniques*, 28, 328-336
25. **Sobhanifar S** (2003). Yeast Two Hybrid Assay: A Fishing Tale. *BioTeach Journal*, 1, 81-87
26. **Timson DJ** (2007). Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 1(1), 63-73
27. **Van Criekinge W, Beyaert R** (1999). Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological Procedures Online*, 2, 1-38
28. **Van Criekinge W, Cornelis S, Van de Craen M, Vandenabeele P, Fiers W, Beyaert R** (1999). GAL4 Is a Substrate for Caspases: Implications for Two-Hybrid Screening and Other GAL4-Based Assays. *Molecular Cell Biology Research Communications*, 1, 158–161
29. **White MA** (1996). The yeast two-hybrid system: Forward and reverse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 10001-10003
30. **Yang M, Wu Z, Fields S** (1995). Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Research*, 23, 1152-1156
31. **Young KH** (1998). Yeast Two-Hybrid: So Many Interactions, (in) So Little Time... *Biology of Reproduction*, *Biology of Reproduction*, 58, 302-311