

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

PRINCIP I RAZVOJ METODE
DVOSTRUKOG KVAŠEVOG 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 Ivančić Baće

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 dvostrukog kvaš evog hibrida	11
6.1. Konstrukcija fuzijskih proteina	11
6.2. Odabir biblioteke sekvenci	13
6.3. Odabir domaćina	14
7. Modifikacije metode	15
7.1. Unaprjeđena 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 uključuje kinazu	17
7.5.2. Proteinski sustav trostrukog hibrida.....	17
7.5.3. Sustav koji uključuje RNA.....	18
8. Nove primjene metode	18
8.1. Supresija interakcije	18
8.2. Zamka za proteazu	19
8.3. Analiza čitavog genoma	19
10. Literatura	20

1. UVOD

Me uproteinske interakcije predstavljaju osnovu brojnih, ako ne i svih stani nih mehanizama, pa je njihova karakterizacija ključna za razumijevanje biologije stanice. Proces 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 tih interakcije omogućuje 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 novih genomskih sekvenci brojnih prokariotnih organizama inicirala je razvoj novih pristupa u biološkim istraživanjima i postavila biologe pred izazov interpretacije velike količine podataka. Istraživanja se uglavnom usredotočuju na karakterizaciju brojnih nepoznatih gena i njihovih transkriptata. Karakterizacija nepoznatog proteina i definiranje njegove uloge u stani nom metabolizmu može se postići indirektno, odnosno identifikacijom njegovih proteinskih partnera. Procijenjeno je da prosječan protein stupa u interakciju s barem pet proteinskih partnera, što tvori kompleksnu mrežu interakcija koja nadilazi složenost genoma (Legrain i sur. 2000). Za proučavanje takve složene mreže interakcija potrebna je metoda koja omogućuje pretraživanje velikog broja proteina istovremeno, kako bi karakterizacija genskih produkata uhvatila korak sa sekvenciranjem i identifikacijom gena (Causier 2003). Također, kako bi se steklo detaljno razumijevanje proteinskih interakcija na molekularnoj razini, potrebno je uzeti u obzir stani no okruženje u kojem se proučavane interakcije odvijaju. Stoga metode koje proučavaju proteinske interakcije *in vivo* imaju značajnu prednost nad metodama koje ne proučavaju proteine u njihovim prirodnim uvjetima.

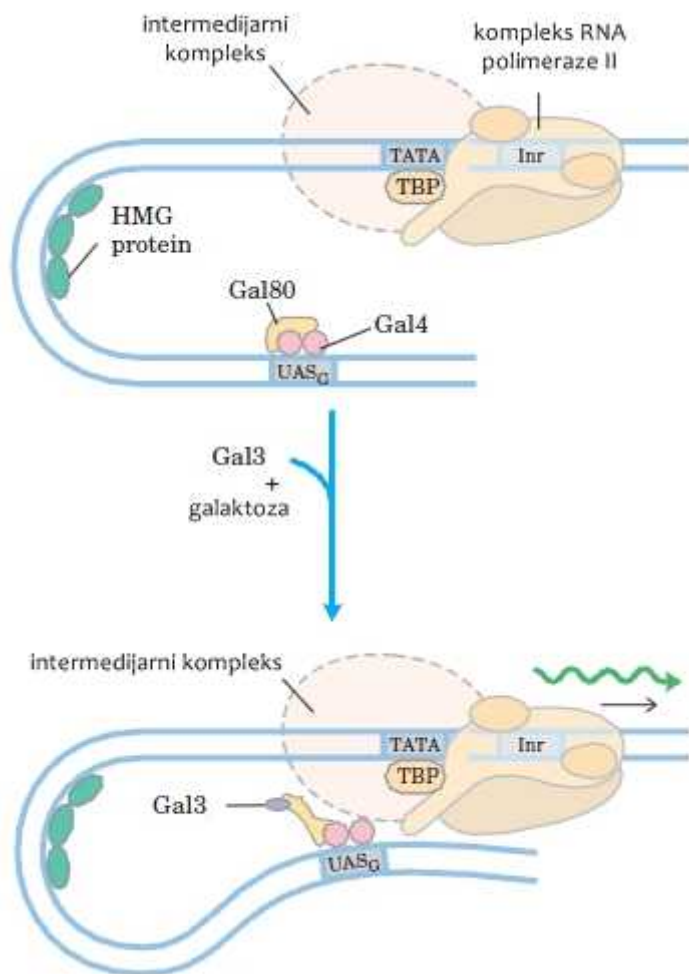
Metoda dvostrukog kvantitativnog hibrida, koju su razvili Fields i Song 1989., jednostavan je genetički sustav koji detektira interakciju između dva proteina *in vivo*. Detekcija interakcije postiže se kreiranjem proteinskih fuzija proteina od interesa s domenama transkripcijskog faktora koji regulira metabolizam galaktoze u kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Ukoliko dolazi do interakcije nastali proteinski kompleks aktivira gen koji je produkt lako detektirati (Chien i sur. 1991). Spomenuta metoda je zbog činjenice da proučava proteinske interakcije *in vivo* te zbog mogućnosti brzog ispitivanja velikog broja proteina stekla značajnu popularnost i do danas omogućuje identifikaciju brojnih proteinskih partnera. Od svog nastanka metoda je doživjela mnoge promjene i modifikacije kako bi zadovoljila potrebe pojedinačnih istraživanja, te je dugo vremena predstavljala temeljnu metodu

sistemske biologije. Razvojem novih tehnologija njezina uloga postaje manje značajna, 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 kvasca (Gal1, Gal2, Pgm2, Gal7, Gal10, Mel1) kodirani su genima raspoređenim na više različitih kromosoma. Inicijacija genske transkripcije kod kvasca se, kao i kod drugih organizama, postiže pomoću u više molekularnih mehanizama koji su međusobno usklađeni. Iako se geni *GAL* transkribiraju zasebno, istovremeno posjeduju slične promotore i koordinirano su transkripcijski regulirani zajedničkim setom proteina (Sobhanifar 2003). Promotori gena *GAL* sadrže *TATA box*, Inr sekvencu i uzvodnu aktivirajuću sekvencu (*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 omogućuje interakciju s Gal80, uslijed čega je onemogućena migracija Gal80 iz citoplazme u staničnu 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 glukozu kao izvor ugljika; ukoliko je glukoza dostupna većina *GAL* gena ostaje neaktivna, neovisno o dostupnosti galaktoze. Opisani regulacijski sustav stoga je pod dodatnom kontrolom kompleksnog sustava represije katabolitima koji uključuje više proteina (Nelson i Cox 2008).

Transkripcijski aktivator Gal4 veže DNA kao dimer, pri čemu svaki monomer sadrži dvije funkcionalno važne domene - DNA vezujuću domenu (*DNA-binding domain*, BD) i aktivacijsku domenu (*activation domain*, AD). DNA vezujuća domena prepoznaje i veže karakterističnu 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 fizički vezan za aktivacijsku domenu, no ta veza ne mora biti kovalentna. Upravo se ta karakteristika Gal4 pokazala ključnom 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 zajedničkog djelovanja tri proteina: Gal4, Gal80 i Gal3, pri čemu 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.

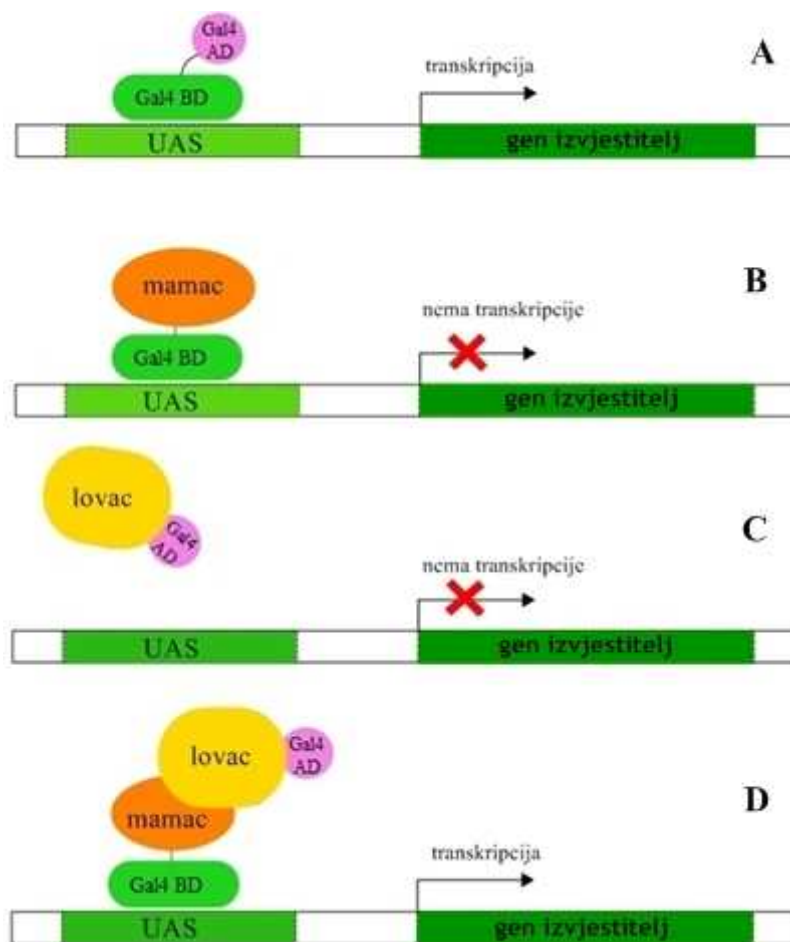
(Izvor: Nelson i Cox 2008)

3. OSNOVE METODE

Sustav dvostrukog kvašenog hibrida provodi se ekspresijom dvaju fuzijskih proteina u kvasca - takozvanog „lovca“ (*hunter*) i „mamca“ (*bait*). Fuzijski proteini su proteini nastali translacijom genske sekvence 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 vezujuća domena omogućuje 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 također 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 prepoznaje 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 mamcem 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 odre enom organizmu ili tkivu. Transformirane stani ne linije se zatim pretražuju u potrazi za aktivnoš u gena izvjestitelja te se na taj na in 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 ini itav bakterijski 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 kvaš evog hibrida, LexA se ponaša kao aktivator, prije svega zato što su operatori na koje se veže smješteni uzvodno od promotora i kodiraju e regije gena izvjestitelja (Luban i Goff 1995).

4. NEDOSTATCI METODE

Kao i svaka druga biološka metoda, sustav dvostrukog kvaš 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 nai i tijekom njezina provo enja. Treba, naime, imati na umu da sustav dvostrukog kvaš evog hibrida nije primjenjiv na sve vrste proteina i me uproteinskih interakcija.

Budu i da je aktivacija gena izvjestitelja klju na za donošenje zaklju aka o me uproteinskoj interakciji prou avanih fuzijskih 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 prona i na in sprje avanja takve auto-aktivacije, o emu e biti rije nešto kasnije.

Jedan od bitnijih nedostataka metode je neophodnost korištenja fuzijskih proteina. Oslanjanje na umjetno dizajnirane hibride uvijek sa sobom nosi odre eni rizik, budu i 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, omogući uju i tako istovremeno postojanje domena različitog porijekla unutar istog, hibridnog proteina. Najbolji način za provjeru ispravnosti konformacije proteina mamca je testiranje interakcije između u spomenutog proteina i fuzijskog proteina lovca za koji sa sigurnošću znamo da stupa u interakciju s našim ispitivanim proteinom. Dakako, i u ovom slučaju može se pojaviti problem ukoliko protein lovac zauzme pogrešnu konformaciju. Interakcija dvaju proteina često nije simetrična, što znači i da ovisi o tome koji je protein korišten kao lovac, a koji kao mamac. Stoga je jedno od rješenja za izbjegavanje pojave lažnih negativna recipročna zamjena uloga proteina lovca i mamca, odnosno fuzija Gal4 aktivacijske domene s proteinom koji je prethodno bio fuzioniran s Gal4 DNA vezujućom domenom, i obrnuto. Valja napomenuti da takva zamjena nije jednostavna, i za sobom povlači i mnogo dodatnih eksperimenata i provjera budući da njome ne izbjegavamo ranije opisane stereokemijske probleme (Van Criekinge i Beyaert 1999).

Potencijalno ograničavajuće metode dvostrukog kvaševog hibrida je korištenje kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) kao domaćina. 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 kvaševim stanicama. Kako bi se izbjegao ovaj problem potrebna je ko-ekspresija enzima odgovornih za posttranslacijske modifikacije, koji također 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 odgovarajućim 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 zaobići, a koji zahtijeva kreiranje posebno modificirane linije kvasca sposobne za proizvodnju ljudskih proteina (Hamilton i sur. 2007).

Metoda dvostrukog kvaševog hibrida nije jednako učinkovita za sve vrste proteina. Budući da se fuzijski proteini u interakciju testiramo moraju nalaziti unutar stanice jezgre, ispitivanje vanstaničnih ili membranskih proteina može predstavljati problem i općenito je manje uspješno (Sobhanifar, 2003).

Pri klasičnoj pripremi dvostrukih hibrida pomoću biblioteke cDNA svega je jedna od šest fuzioniranih DNA sekvenci u pravilnom okviru pitanja. Unatoč 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 zaobići tako da se prethodno naprave sažete biblioteke cDNA sekvenci relevantnih tkiva ili tipova stanica, ili korištenjem jednostavnijeg organizma u istraživanju (Van Criekinge 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 njih domena uslijed nedostatka steričkih ograničenja uzrokovanih karakteristikama smatanjem proteina (Auerbach i Stagljar 2005). Budući da pretraživanjem biblioteka odabiremo optimizirane reakcije, konstrukti koji ne predstavljaju itave proteine doprinose stvaranju pogrešne slike prilikom očitavanja rezultata. Najbolje rješenje za ovaj problem uključuje kloniranje isključivo cDNA sekvenci pune duljine i u ispravnom okviru pitanja, što zahtijeva puno vremena i napornog rada no daje odlične rezultate (Gietz i sur. 2007).

S obzirom na to da metoda dvostrukog kvašenja hibrida mjeri aktivnost isključivo gena izvjestitelja, mora se uzeti u obzir mogućnost postojanja trećeg proteina koji je potencijalno odgovoran za povezivanje lovca i mamca. Iako je ta mogućnost slabo vjerojatna, ne treba na nju zaboraviti, pogotovo zato što često predstavlja problem prilikom provedbe brojnih biokemijskih metoda i tehnika (Sobhanifar 2003).

Problem pretraživanja velikog broja proteina koje ne nalazimo prirodno u kvasca je izmeću ostalog taj što ne možemo znati na koji će 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 također postati toksični za svog domaćina. Velik broj proteina, kao što su ciklini ili *homeobox* genski produkti, zaista je toksičan u okruženju stanične jezgre, a neki od njih sposobni su razgraditi esencijalne proteine kvasca ili odcijepiti Gal4 domene fuzijskih proteina. Interakciju takvih proteina stoga nije moguće detektirati tijekom rasta, te se predstavljaju kao lažni negativni (Van Criekinge i Beyaert 1999, Ratushny i Golemis 2008).

Budući da se metodom dvostrukog kvašenja hibrida ispituju sve kombinacije interakcija proteina, postoji mogućnost detekcije umjetnih proteinskih partnera, što je tipičan nedostatak iscrpnih pretraživačkih 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 različitim tipovima stanica, lokalizirani u različitim staničnim odjeljcima, eksprimirani u različitim

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 nedostacima, 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* tehnicima, 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 ka 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 nedostacima 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 podvrgnuti posttranslacijskim

modifikacijama koje se ne odvijaju u jezgri stanica kvasca, što značajno utječe na uspješnost njihovog proučavanja ovom metodom (Sobhanifar 2003). Unatož tome zabilježene su brojne uspješne analize interakcija koje uključuju transmembranske receptore. Prikladne vanstani ne reakcije između receptora i liganda su demonstrirane za hormon rasta i prolaktin, te njihove odgovarajuće receptore (Kajkowski i sur. 1997). Ipak, metoda se do danas nije pokazala uspješnom pri identifikaciji interakcija s domenama koje se prirodno nalaze unutar same stanične membrane.

Pretraživanje metodom dvostrukog kvaševog hibrida (esto se naziva funkcionalnim pretraživanjem, budući da ukoliko barem jedan od proteinskih partnera ima dobro definiranu ulogu u određenom signalnom putu, možemo s lakoćom naslutiti i ulogu proteina koji s njime stupaju u interakciju. Pripisivanje funkcije nepoznatom proteinu mamcu uvijek je mnogo zahtjevnije, pa je u tom slučaju precizna identifikacija proteinskih partnera koji stupaju u interakciju od ključne važnosti (Causier 2003).

Iako već sam ishod pretraživanja (esto rezultira nastajanjem brojnih novih hipoteza, on još uvijek treba biti potvrđen drugim metodama. Postoji dovoljno razloga za oprez pri korištenju sustava dvostrukog kvaševog hibrida te za skeptičnost prema dobivenim rezultatima, no unatož svim nedostacima na ovaj su način velikom brzinom uspješno okarakterizirani brojni signalni putevi (Van Crielinge i Beyaert 1999).

6. POSTAVLJANJE SUSTAVA DVOSTRUKOG KVAŠEVOG HIBRIDA

6.1. Konstrukcija fuzijskih proteina

Postoji velik broj DNA vezujućih i aktivacijskih domena pomoću kojih se mogu konstruirati fuzijski proteini, no još uvijek su najzastupljenije one bazirane na proteinu Gal4, djelomično zato što su prve postale komercijalno dostupne. Alternativni sustavi koriste DNA vezujuću domenu bakterijskog proteina LexA i aktivacijsku domenu virusnog proteina VP16. Oba sustava imaju svoje prednosti i nedostatke, a preporuča se da se pretraživanje, ukoliko je to moguće, provede u više sustava budući da se neke interakcije drukčije 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 ih čini osjetljivijim ali manje preciznim (Young 1998).

Jedna od važnih stavki je i odabir promotora koji regulira razinu ekspresije ciljnog proteina. Najčešće 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 kraća, manje efektivna verzija ADH1 promotora (Sobhanifar 2003).

Ukupna razina ekspresije fuzijskih proteina ne ovisi samo o jačini promotora i korištenom izvoru ugljika, nego i o broju kopija plazmida. Izvorište replikacije koje se najčešće koristi (takozvano 2- μ m) inicira DNA replikaciju sličnu kromosomskoj, a održava plazmid u 50-100 kopija po stanici. Ukoliko koristimo reverzni hibridni sustav, o kojem će biti riječ nešto kasnije, ili ispitujemo proteinske toksine za stanice kvasca, poželjno je koristiti plazmide koji su održavani u malom broju kopija (Van Criekinge i Beyaert 1999).

Uvijek je korisno imati na in 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, često se koristi u te 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 konstrukta te provjeru ekspresije ciljnih proteina pomoću *Western blot*-a (Gietz i sur. 1997, Van Criekinge i Beyaert 1999).

Budući da se sustav dvostrukog kvaševog hibrida temelji na uspješnom uspostavljanju funkcionalnog transkripcijskog faktora, auto-aktivacijska sposobnost jednog od fuzijskih 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 vezujućom domenom rezultiralo bi pojavom velike količine lažnih pozitiva uslijed auto-aktivacije (Gietz i sur. 1997). Upravo zbog toga se s aktivacijskom domenom fuzioniraju isključivo biblioteke sekvenci. Ako transformiramo liniju kvasca samo

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

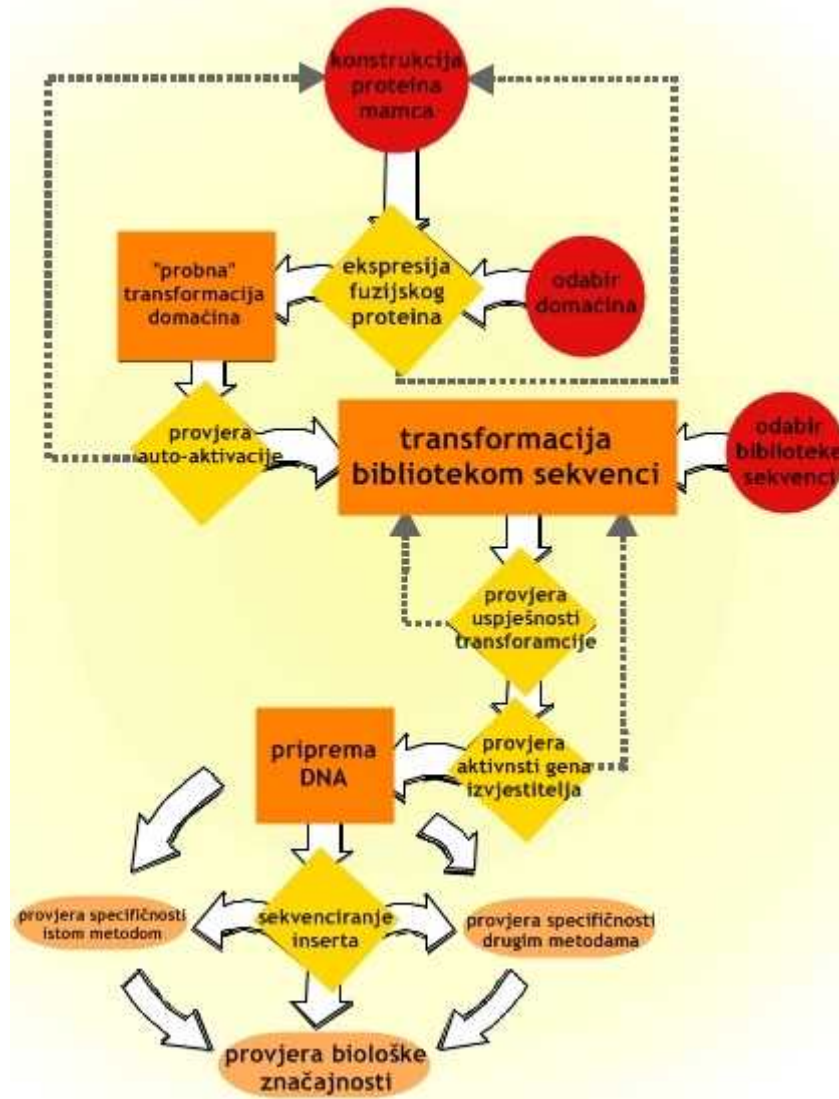
Konačno, od iznimne je važnosti da ispitivani proteini budu ispravno lokalizirani u staničnoj jezgri, budući da se ondje odvijaju najvažniji transkripcijski događaji. DNA vezujuća domena posjeduje vlastiti signal za lokalizaciju u jezgri, čija se ispravnost lako može provjeriti pozitivnom kontrolom.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

6.2. Odabir biblioteke sekvenci

Pri pretraživanju je preporučljivo koristiti unaprijed pripremljenu biblioteku cDNA sekvenci tkiva u kojem je naš protein od interesa biološki značajan. Pretraživanje itave cDNA biblioteke sisavaca zahtijevalo bi pripremu čak 10^7 transformanata kvasca. Parametri pomoću kojih možemo procijeniti kvalitetu pripremljene biblioteke sekvenci 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, s 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 zahtijeva zasebnu aktivaciju. U sustavu koji koristi inducibilnu ekspresiju fuzijski proteini s aktivacijskom domenom imaju manji potencijal postati toksični za domaćina, te stoga ne bivaju eliminirani prikazujući se kao lažni negativci. Ipak, korištenje inducibilnog promotora

produžuje eksperimentalni postupak budu i da efikasnost transformacije drasti no pada ako se transformanti direktno selektiraju na svim auktotrofnim biljezima i na izvoru ugljika koji inducira ekspresiju fuzijskih proteina. Stoga se provjera uspješnosti transformacije uglavnom vrši prije same indukcije (Causier 2003).



Slika 3. Op eniti 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 korištenjem sustava temeljenog na bakterijskom proteinu LexA (Van Crieke i Beyaert 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 auksotrofnog biljega je nadoknadena pojačanom osjetljivošću u pretraživanju. Ukoliko koristimo LexA sustav, gdje se gen izvjestitelj *lacZ* nalazi na plazmidu koji postoji u velikom broju kopija, s 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. Također, treba osigurati da svim plazmidima nedostaje *gall* 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. Općenito, ako usporedimo gene izvjestitelje *lacZ* i *his3*, *lacZ* je manje fleksibilan ali i manje sklon davati lažne pozitivne (Serebriiskii i sur. 2000).

7. MODIFIKACIJE METODE

7.1. Unaprjeđena sustava dvostrukog kvaševog hibrida

Jedno od postojećih unaprjeđena sustava dvostrukog kvaševog hibrida uključuje uspostavu linije domaćina 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 mamaca fuzioniran s DNA vezujućom 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 orotidin-5-monofosfat dekarboksilaze (enzima produkta gena izvjestitelja) (Van Crieke i Beyaert 1999). Općenito, 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 slučajeva u kojima izostaje proteinska interakcija između proučavanih proteina, pa je stoga i

njegova primjena u karakterizaciji i manipulaciji proteinskih interakcija ograničena. Kako bi se doskoro o ovom problemu razvijeni su reverzni sustavi koji koriste linije kvasaca u kojima proteinska interakcija hibrida rezultira povećanom ekspresijom gena čiji je produkt toksin za domaćina. U takvim uvjetima nedostatak interakcije pruža selektivnu prednost i može se otkriti; što nam omogućuje istovremeno pretraživanje milijuna kolonija čiji proteinski produkti stupaju u interakciju u potrazi za nekolicinom kolonija unutar kojih ne dolazi do interakcije. Jedna od inačica takvog sustava koristi ranije spomenuti gen *cyh2* koji osigurava otpornost stanica na toksin cikloheksimid. U drugom slučaju reverzni hibridni sustav koristi gen izvjestitelj *ura3*, koji kodira za orotidin-5-fosfat dekarboksilazu. Spomenuti enzim, osim što prirodno sudjeluje u biosintezi uracila, također katalizira pretvorbu 5-fluoroorotidne kiseline u toksični produkt 5-fluorouracil. Ukoliko uzgajamo kolonije na podlozi koja sadrži 5-fluoroorotidnu kiselinu preživjet će samo one u kojima ne dolazi do interakcije proteinskih hibrida (White 1996).

Jedna od prednosti reverznog sustava je ta da omogućuje selekciju mutacija iz nasumično generirane biblioteke gena koje utječu na proteinsku interakciju. Također, pruža nam mogućnost pretraživanja velike biblioteke peptida u potrazi za malim konstruktima koji sprečavaju interakciju.

7.3. SRS sustav

SRS sustav (*Sos-recruitment system*) temelji se na činjenici da je hSos (protein odgovoran za izmjenu GDP-a i GTP-a u sisavaca) sposoban aktivirati protein Ras jedino kada je lokaliziran na staničnoj membrani. Kvascu *Saccharomyces cerevisiae* za rast i vijabilnost stanica potreban je funkcionalan Ras signalni put, pa tako linija kvasca koja sadrži točnu mutaciju unutar proteina koji prirodno vrši izmjenu GDP-a i GTP-a pokazuje temperaturno osjetljiv rast. Ekspresija proteina hSos umjetno usmjerenog 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 staničnoj membrani te kao rezultat uspješne uspostave Ras signalnog puta mutirane kolonije kvasaca preživljavaju nepovoljnu temperaturu (Brückner i sur. 2009).

Ovaj sustav pruža značajnu prednost pri proučavanju interakcija koje uključuju transkripcijske aktivatore ili represore, budući da se ne temelji na očitavanju transkripcijske aktivnosti. Jednako tako, omogućuje 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 činjenici da u eukariota novouspostavljeni kompleks ubikvitina i njegovog proteinskog partnera neminovno biva razgrađen 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 kinetikom (Causier 2003).

7.5. Sustav trostrukog kvaš evog hibrida

7.5.1. Sustav trostrukog hibrida koji uključuje kinazu

Sustav trostrukog kvaš evog hibrida koji uključuje kinazu pruža nam mogućnost 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 omogućujemo selekciju proteinskih interakcija koje zahtijevaju prethodnu fosforilaciju proteina (Kochan i sur. 2000).

7.5.2. Proteinski sustav trostrukog hibrida

Proteinski sustav trostrukog kvaš evog hibrida unaprjeđuje sustav dvostrukog kvaš evog 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 vanstaničnih domena transmembranskih receptora dovele su do razvoja trostrukog hibridnog sustava koji uključuje peptidni ligand. U tom je sustavu vanstanična domena transmembranskog receptora posebno vezana za DNA vezuju u domenu i aktivacijsku domenu Gal4 proteina. Peptid ili drugi ligand koji prirodno veže sposoban je posredovati u njezinoj dimerizaciji. Prisutnost takvog liganda stoga rezultira transkripcijskom 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 ograničenjima 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 također može ograničiti 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 vezujuća i aktivacijska domena Gal4 proteina dovedene u blizinu putem interakcije rekombinantnog fuzijskog 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 kvaševog hibrida (Sengupta i sur. 1996).

8. NOVE PRIMJENE METODE

8.1. Supresija interakcije

Supresija interakcije jedna je od malobrojnih tehnika koja omogućuje procjenu biološke značajnosti interakcije između dvaju proteina. Ova metoda primjenjuje sustav dvostrukog kvaševog 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 inačica 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 s ranije identificiranim proteinskim partnerom. Stoga je u drugom koraku potrebno pronaći odgovarajuću mutiranu inačicu proteina lovca koji je sposoban stupiti u interakciju s mutiranom inačicom 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 spre ava da dospije u jezgru stanice. Ukoliko se izme u transkripcijskog faktora i domene uklonira peptidna sekvenca koju potencijalno cijepa nepoznata proteaza, u mogu nosti smo napraviti pretraživanje s ciljem identifikacije takve proteaze. Odgovaraju a proteaza sposobna je pocijepati uklonirano proteazno mjesto te tako osloboditi transkripcijski faktor koji zatim otputuje u jezgru i ondje aktivira transkripciju gena izvjestitelja. Ovaj postupak se tako er može iskoristiti za odre ivanje sekvence koju cijepa poznata proteaza, generiranjem nasumi nih peptidnih sekvenci izme u transkripcijskog faktora i fuzionirane domene (Van Crieke i sur. 1999).

8.3. Analiza itavog genoma

Jedna od najambicioznijih primjena metode dvostrukog kvaš evog hibrida je uspostava takozvanih mapa proteinskih veza (*protein linkage maps*). Takve mape opisuju sve proteinske interakcije koje se odvijaju tijekom itavog životnog vijeka stanice. Istraživanja ove vrste mogu ve dobro prou enim proteinima pridružiti nove funkcije identifikacijom neo ekivanih interakcija i otkrivanjem veza izme u metaboli kih puteva, te tako doprinijeti stjecanju boljeg uvida u cjelokupnu kompleksnost stanice (Evangelista i sur. 1996, Causier 2003).

U po etku su nasumi ne biblioteke cDNA fuzionirane na DNA vezuju u domenu, te su nasumi ni hibridi aktivacijske domene korišteni kako bi se pretražile sve mogu e interakcije. Taj je postupak korišten kod istraživanja proteoma bakteriofaga T7 (Grigoriev 2001). Kasnije je metoda primjenjena na složenije oranizme. Iako je genom kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u potpunosti sekvenciran i prou avan dugo vremena, još uvijek 60% genoma ima nepoznatu ulogu, a polovica spomenutih gena kodira za proteine koji nisu homologni poznatim proteinima. Mapa proteinskih veza za kvasac još je uvijek u procesu izrade, pomo u metode dvostrukog kvaš evog hibrida. Za svaki je mamac odabran set lovaca raspore enih u kategorije prema gra i i funkciji. Pomo 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 pozitivni i negativni mogu predstavljati znatan problem i uvelike utjecati na ishod istraživanja. Tako se u ovom slučaju umjesto nasumičnih biblioteki cDNA sekvenci koristi takozvano „dvostruko-PCR-*in vivo*-kloniranje“, metoda koja osigurava da se u svaki plazmid ugradi konstrukt u pravilnom okviruitanja. Automatizacijom postupka moguće je pretražiti i do 50 milijuna uzoraka. Određivanje biološke značajnosti dobivenih rezultata sljedeći je korak u istraživanju, te je ujedno i postupak koji oduzima najviše vremena pri određivanju molekularnih mehanizama bioloških reakcija (Van Criekinge 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 Tribid 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. **Ratushni 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