

IBV Instituto de Biomedicina de Valencia
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CSIC


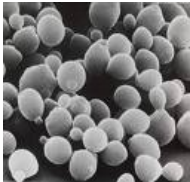
La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo y herramienta para el estudio de enfermedades genéticas humanas






Dr. Pascual Sanz

ciberer
Centro de Investigación Biomédica En Red de **Enfermedades Raras**

3º Curso de Genética Humana,
Valencia, Enero 2008

Saccharomyces cerevisiae

  4-6 μm

Saccharomyces cerevisiae: bases de datos



Mayo-1997



www.yeastgenome.org



European Yeast Functional Analysis Network

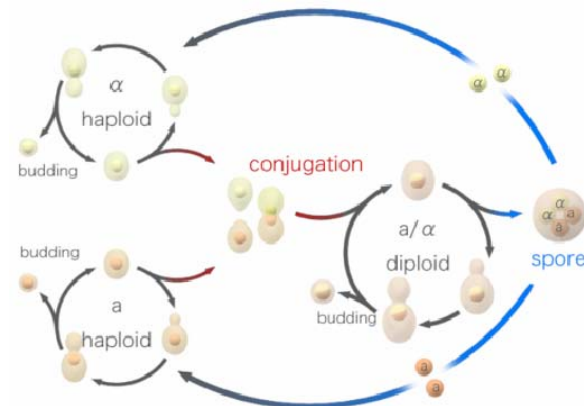
Network of about 100 laboratories throughout Europe to undertake the systematic analysis of the function of most yeast genes.

Yeast Genome Arrays are being distributed within the network.
A database for transcriptional analysis data is being developed at DNFZ and MIPS.

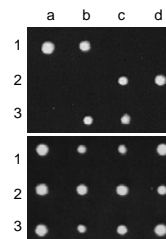


European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional analysis

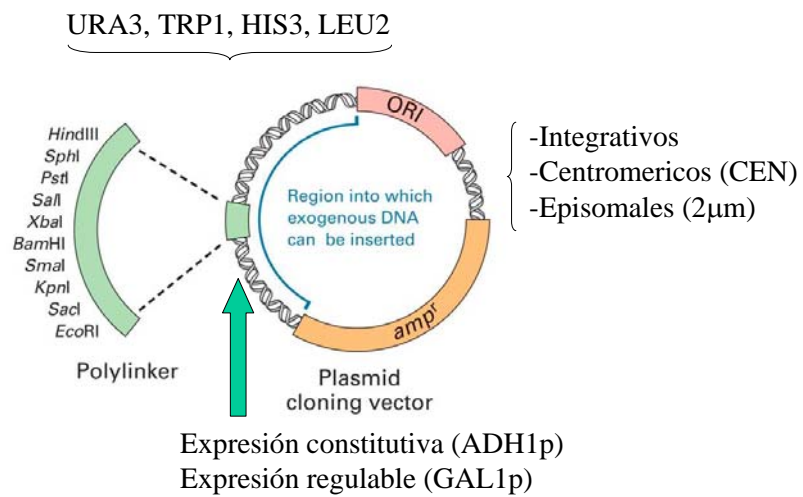
Saccharomyces cerevisiae: genética



Segregación mendeliana de caracteres



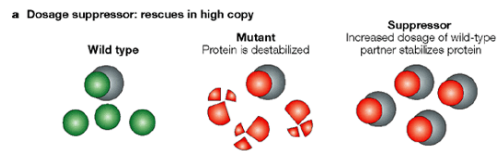
**Facilidad de introducción de plásmidos
y de expresión de proteínas heterólogas**



Métodos genéticos

- Supresión por sobreexpresión
- Supresores extragénicos.
- Letales sintéticos.

3.1.- Supresión por sobreexpresión



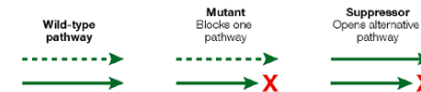
- Transformación con librería.
- Selección de transformantes. Rescate del plasmido.
- Comprobación de supresión.
- Identificación de gen supresor en multicopia. En el caso de fragmentos grandes, acotar el gen responsable de la supresión.

3.2.- Supresores extragénicos

b Interaction suppressor: allele specific, gene specific

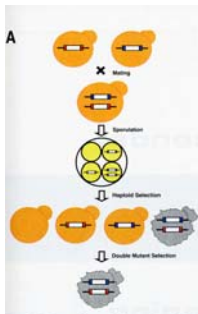


c Bypass suppressor: pathway specific, rescues null allele



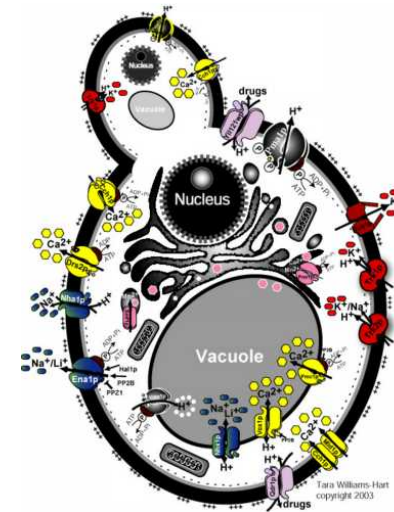
3.3.- Synthetic letal effects

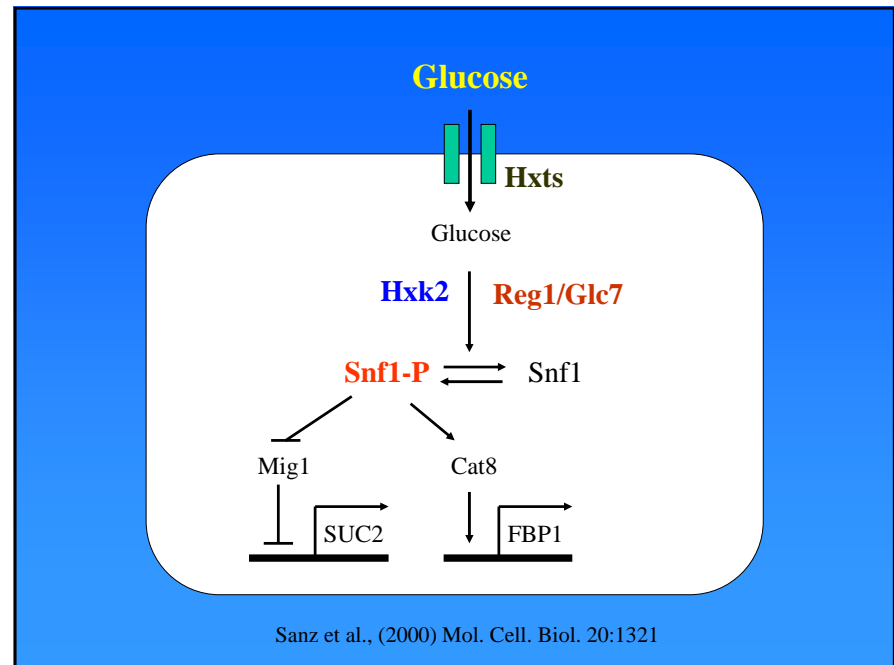
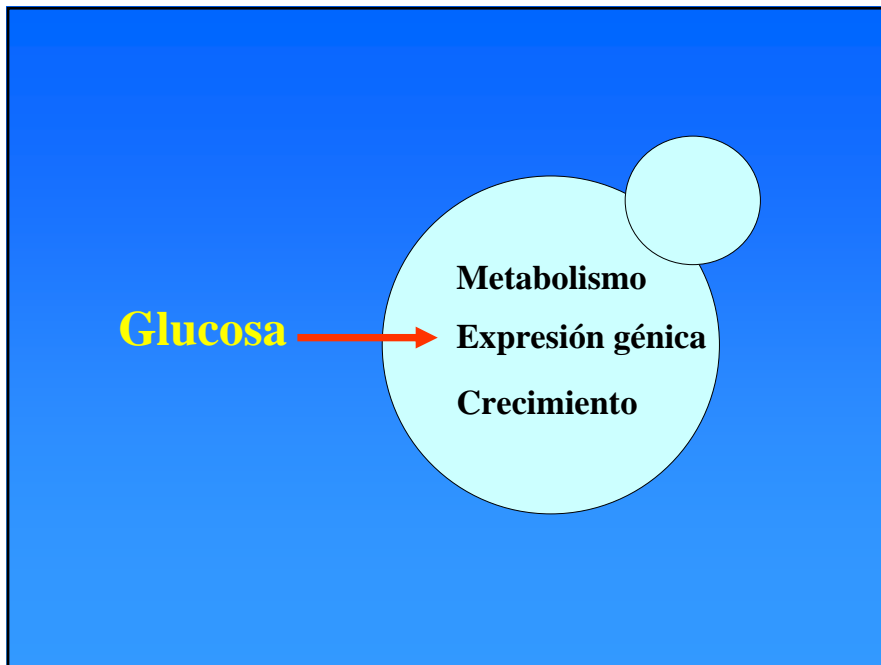
La combinación de dos mutaciones, viables cada una de ellas por separado, conduce a una pérdida de la viabilidad.



Cruce con colección de mutantes

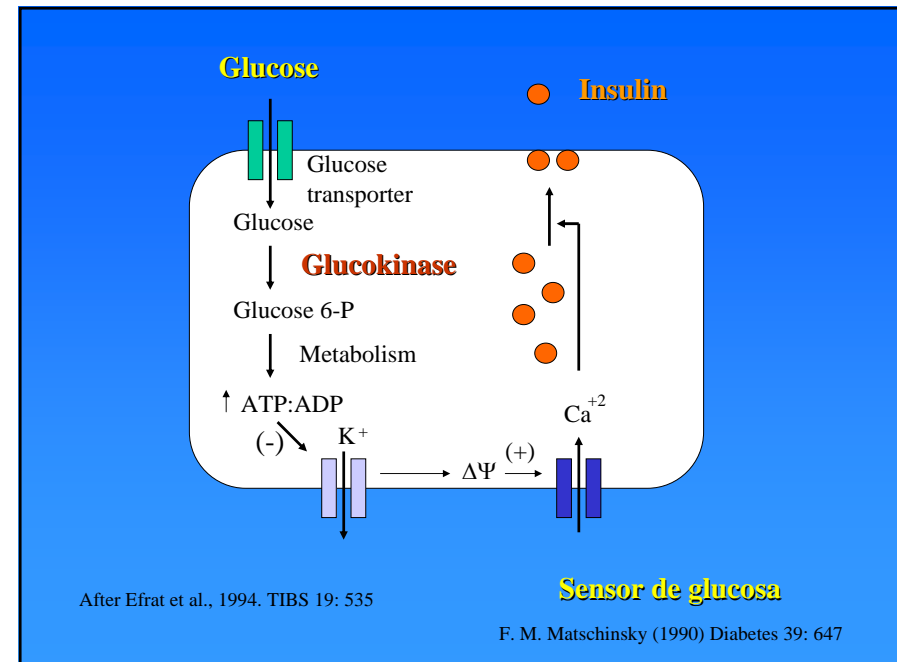
Saccharomyces cerevisiae: modelo estudio de rutas de señalización





Elements involved in glucose repression

Component	Yeast	Pancreatic β -cell
Low-affinity glucose transporter	Hxt1	Glut2
Glucose phosphorylating enzyme (sensor)	Hxk2	GlkB
Protein kinase	Snf1	AMPK
Protein phosphatase	Reg1/Glc7	PP1?



```

Hug1kb .....MLDDNARMEAAKEKEVQLAEFLQQLQSEDLKVKVRRKQKEMDRGLKLT 49
Schk1 NVHLGPKFKQAKGSHADVPKELRDEHQLHEDFTVDSLEKRVVHFIDRLMGL... 57
Schk2 NVHLGPKFKQAKGSHADVPKELMQIENFKIFVPTTGLQAVTKHFISELEKGL... 57
      : : : * * * : : : * : : : * : : : * : : : :
      : : : * * * : : : * : : : * : : : * : : : :

Phosphate 1
Hug1kb HREASVVELLPTVRSPTRESVDGDFLLDLGDTAFRFLVWVVDGREGQMVKVTRHGMTS 109
Schk1 KKGNIIMIPGWVKEPFTKREKGNFLADLGGTNRVVLVLEL...GNHTFDITQKRYE 113
Schk2 KKGNIIMIPGWVNDPFTKREKGNDFLADLGGTNRVVLVLEL...GDRFTDITQKRYE 113
      : : : * * * : : : * : : : * : : : * : : : :
      : : : * * * : : : * : : : * : : : * : : : :

Sugar binding
Hug1kb IPEDAMTQYARELFDYIIEKLEIDFLERQNE...KKELLOFTFPFVRREDIDKOLLM 166
Schk1 LDRMSTTQSELEWSPFADLEKAFIDKQFPQKISEPILOGTFFPFAQKINRGLQK 173
Schk2 LVDAMSTTQNDHELEWSPFADLEKAFIDKQFPQKISEPILOGTFFPFAQKINRGLQK 173
      : *      : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :
      : *      : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :

Connect 1
Hug1kb WTKGIEASGASGHNHVLLERDAIKERGDPEHNDVAMVNDVATMISCTYEDHQCEVGHIV 226
Schk1 WTKGFDFPVYEGHNVPLLDHREIER...ELPTEIIVALINDTGLASTYDPTKEMVIF 232
Schk2 WTKGFDFPVYEGHNVPLLDHREIER...NIPTEIIVALINDTGLASTYDPTKEMVIF 232
      * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :
      * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :

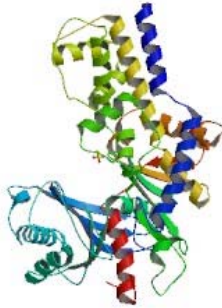
Phosphate 2
Hug1kb GTCCNACVMEHQVVELVEG...DEGR...MVCVTEWGAFGDSGELDFLEVLVDLVDK 279
Schk1 GTGVNAGFVYVDVIEDLEKGLDADIPNSPMACNCEYGSFN...EHLVLPKEDVAVDDE 291
Schk2 GTGVNAGFVYVDVIEDLEKGLDADIPNSPMACNCEYGSFN...EHLVLPKEDVAVDDE 291
      * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :
      * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :

Hug1kb SSANVQQLVKELEIGQYMGELVLLVLLVLDENLFRGASRQLRTRGAFETSPVQVRE 339
Schk1 GSPFPGQAFERSTQYIIGLELVLLEHREKLELDELQELRGLQPIINDTPFARIE 351
Schk2 HSPFPGQAFERSTQYIIGLELVLLEHREKLELDELQELRGLQPIINDTPFARIE 351
      : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :
      : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :

Hug1kb SDGDRKQIVN...ILSTGLRSPFTTDCDLYRACEVSTRANHCAGLAGVYINRMRER 397
Schk1 SDPFVFEIDYDQKQDQVETLREKLELRELCETUARAALVCCGIAAICQKRG... 411
Schk2 EDFFNLELTDLDLQNFQINTVQKLELRELCETUARAALVCCGIAAICQKRG... 411
      : *      : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :
      : *      : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :

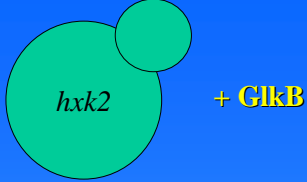
Adenosine          Connect 2
Hug1kb SEDVMRITVVGDGQVYKLPKRFKRFASVRLTPE...CEITFISEHESGSGAA 450
Schk1 ...YKTOHIAADQSVYKLPKRFKRFASVRLTPE...PIIVFARHESGSGAA 464
Schk2 ...YKTOHIAADQSVYKLPKRFKRFASVRLTPE...PIIVFARHESGSGAA 465
      : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :
      : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :

Hug1kb LVSAVACKACHLQ... 465
Schk1 VIALSERKIRAKREVLQIDA 485
Schk2 VIALSERKIRAKREVLQIDA 486
      : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :
      : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : : * * * : : :
  
```



Hxk2 (PDB: 2nzt); Kuser et al (2000)

Hxk2 **GlkB**
Identities **33%**
Similarities **54%**

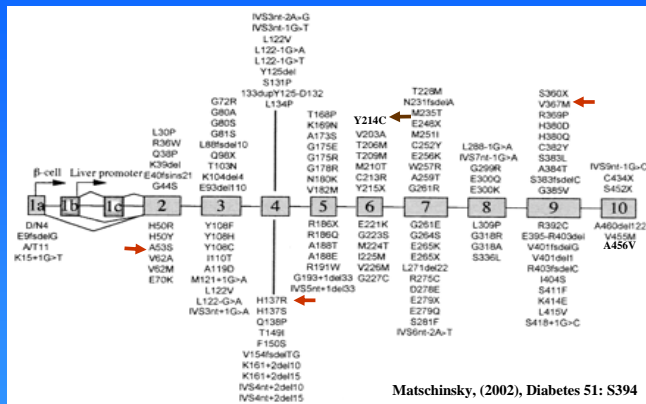


- La glucokinasa pancreática humana complementa la función fosforiladora de glucosa

- La glucokinasa pancreática humana complementa la función reguladora de Hxk2

(Mayordomo et al., 2001)

GlkB mutations isolated in MODY2 and hyperinsulinemic patients

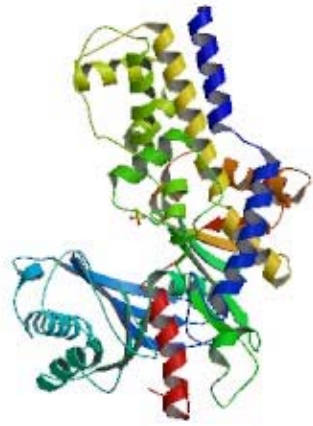


- 1.- No glucokinase is present in cells or if present is inactive (MODY2).
- 2.- Glucokinase is present and it is as active as regular enzyme (MODY2).
- 3.- Glucokinase is present and it is hyperactive (hyperinsulinism).

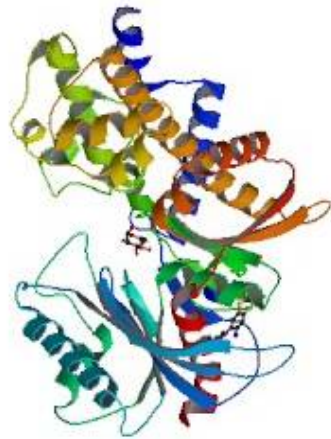
T168P: Formas mutantes de GKB aisladas de pacientes con MODY2 identificadas como pérdida de actividad, no muestran ni actividad catalítica ni funcionalidad en el proceso de señalización por glucosa en levaduras.

A53S y V367M: Formas mutantes aisladas de pacientes con MODY2 con propiedades cinéticas similares a la silvestre, muestran buena funcionalidad en el proceso de señalización por glucosa en levaduras.

Y214C y V455M: Formas mutantes aisladas de pacientes con hiperinsulinismo, muestran una mayor afinidad por la glucosa y una buena funcionalidad en el proceso de señalización por glucosa en levaduras.



Hxk2 (PDB: 2nzt); Kuser et al (2000)



GlkB (PDB: 1v4s); Kamata et al (2004)

Elements involved in glucose signaling

<u>Component</u>	<u>Yeast</u>	<u>Pancreatic β-cell</u>
Low-affinity glucose transporter	Hxt1	Glut2
Glucose phosphorylating enzyme (sensor)	Hxk2	GlkB
Protein kinase	Snf1	↔ AMPK
Protein phosphatase	Reg1/Glc7	PP1?

AMP-activated protein kinase, AMPK

↑ [AMP]:[ATP]
e.g. anoxia

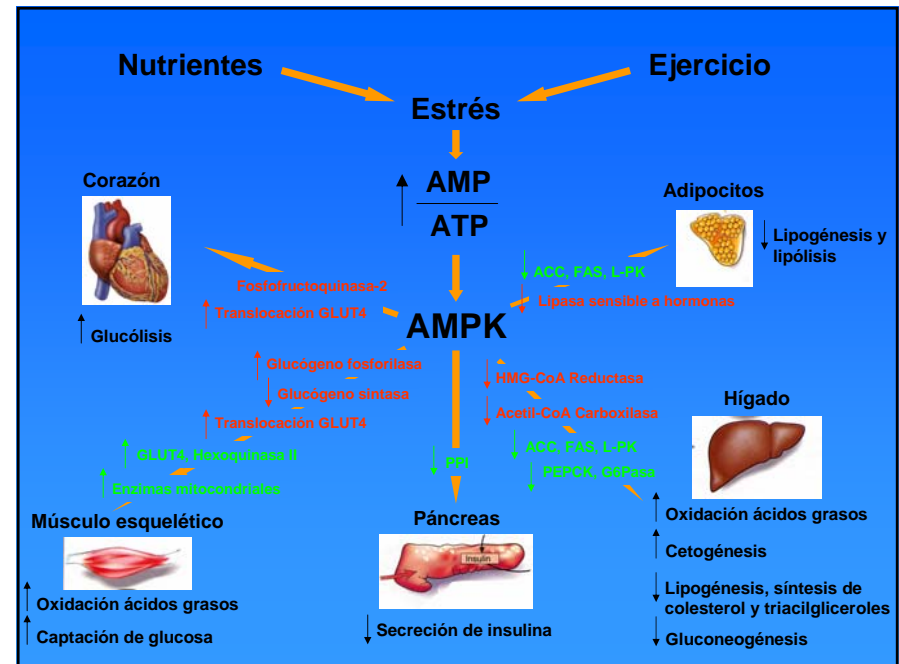
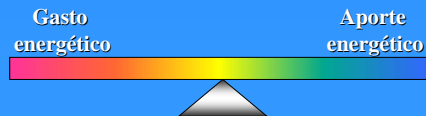
Otras señales
e.g. estrés hiperosmótico

AMPK-P

↓ Anabolismo

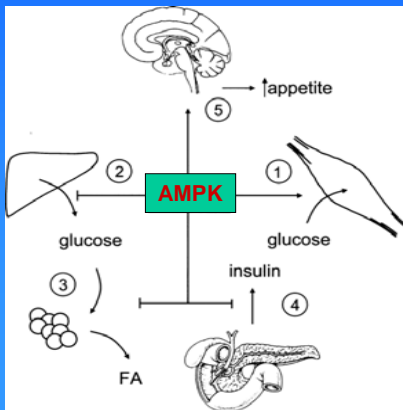
↑ Catabolismo

Efectos a largo plazo:
Regulación de la expresión génica



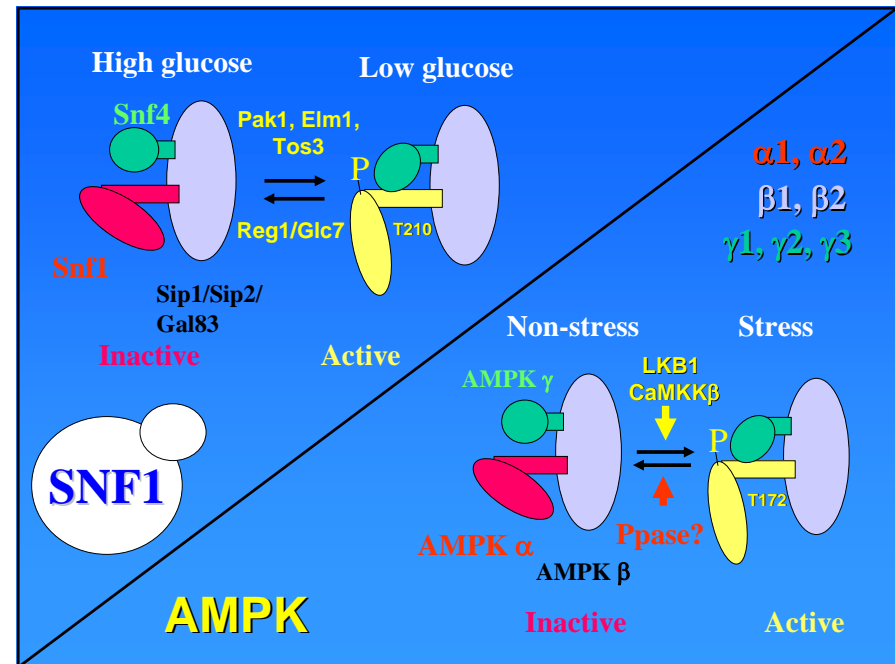
AMPK, diabetes y obesidad

1) El efecto neto de la activación de AMPK por ejercicio o mediante activadores farmacológicos podría ser efectiva para corregir la resistencia a insulina en pacientes con alteraciones de la tolerancia a glucosa y diabetes tipo 2.



2) La metformina y la rosiglitazona (antidiabéticos orales) son capaces de activar AMPK *in vivo*.

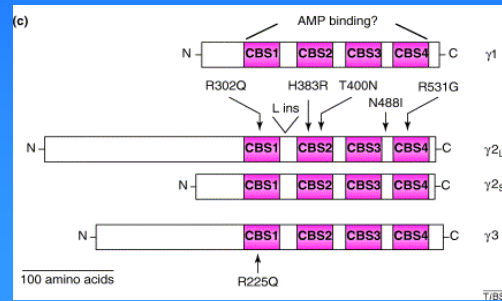
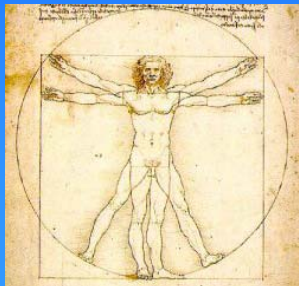
3) AMPK juega un papel en la regulación de la toma de alimentos, por acción sobre las neuronas del hipotálamo.



AMPK e Hipertrofia del músculo esquelético y cardíaco. Glucogenosis.



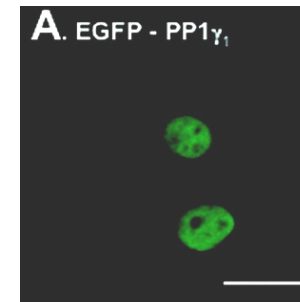
En 2000, se describe en cerdos una mutación en la subunidad AMPK γ_3 (R200Q) como la responsable de elevados contenidos en glucógeno en músculo esquelético (Milan et al., 2000).



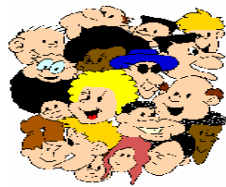
Introducción de formas AMPK γ en *snf4*, actividad constitutiva

La función nuclear de la protein fosfatasa de tipo 1 (PP1)

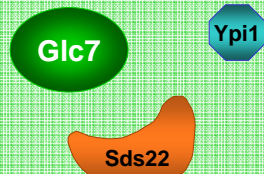
- PP1 es esencial para una correcta progresión del ciclo celular
- PP1 no tiene NLS, pero alcanza el núcleo por unión a proteínas reguladoras



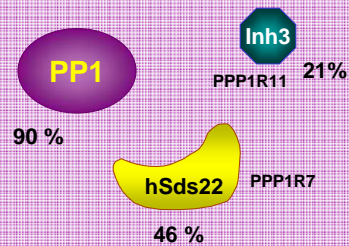
Yeast vs Humans



Yeast



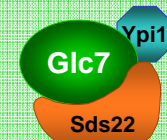
Humans



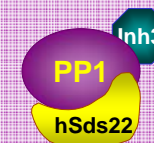
Yeast Sds22-Glc7-Ypi1 form a ternary complex



Yeast



Humans



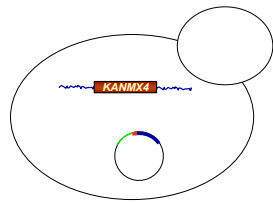
In humans hSds22-PP1-Inh3 also form a heterotrimeric complex

No direct interaction between Inh3 and hSds22

Lesage et al. *Biochem* (2007)

Construction of a *ypl1* conditional mutant

W303 *ypl1* $\Delta::KANMX4$ (pGAL1- HA-Ypl1)

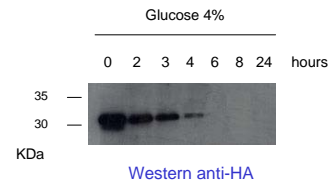
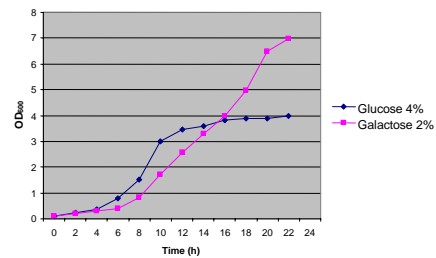


GALACTOSE GLUCOSE

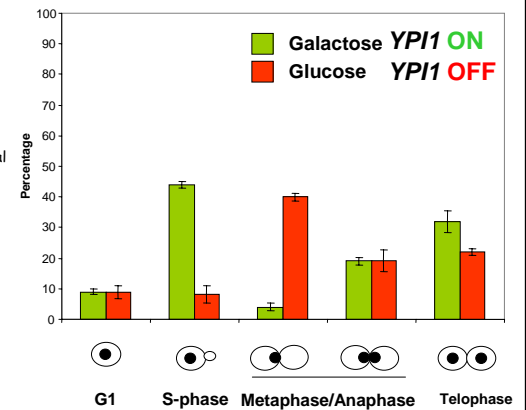
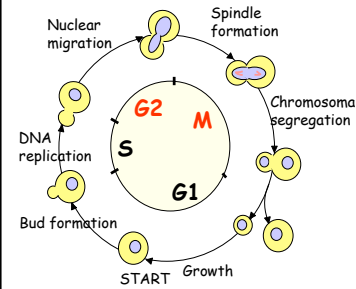
YPL1 ON OFF



Depletion of *Ypl1* causes cell growth arrest



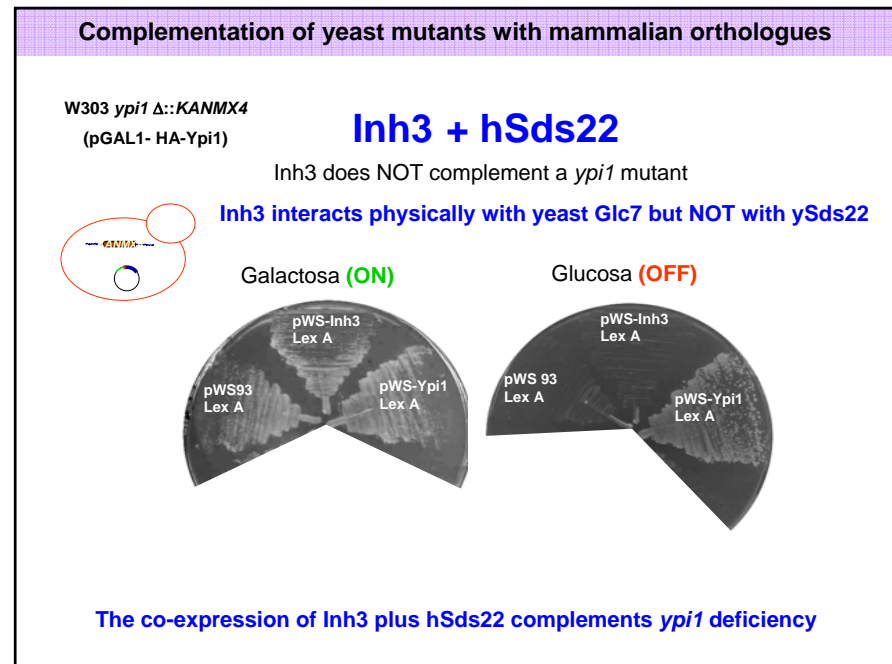
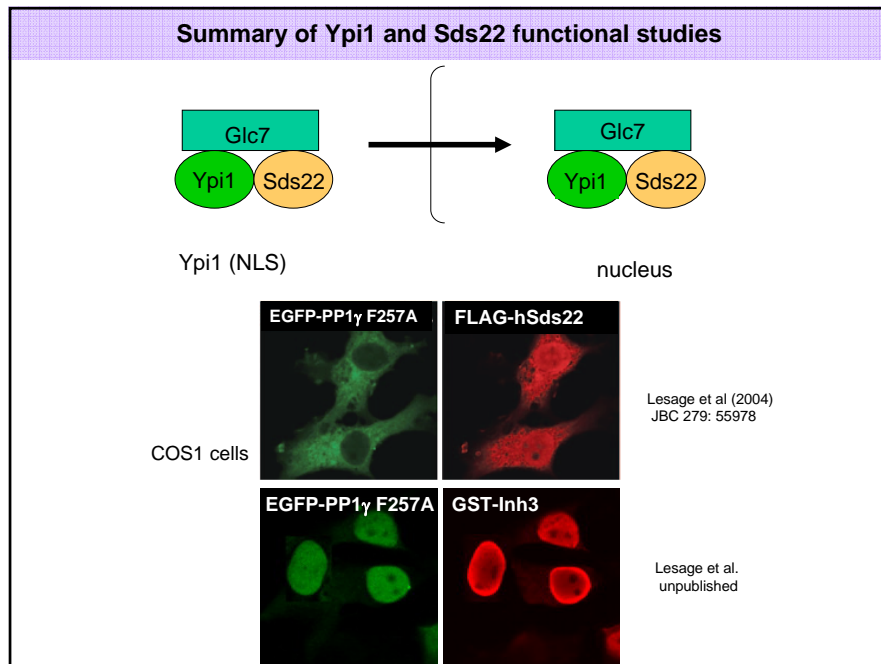
Ypl1 functional studies



Ypl1 is necessary for the progression from metaphase to anaphase

Similar results have been reported in a *sds22* mutant

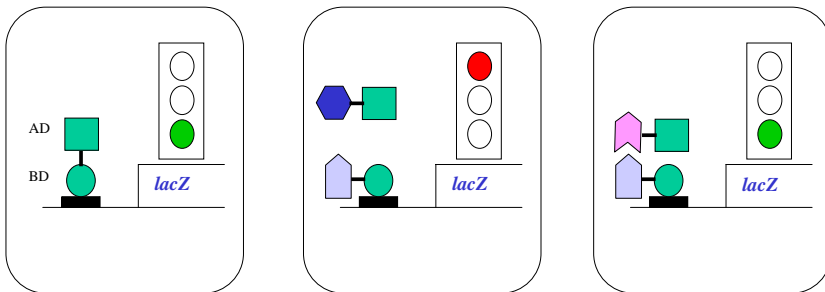
MacKelvie et al., (1995) Mol. Cell. Biol. 15: 3777-3785



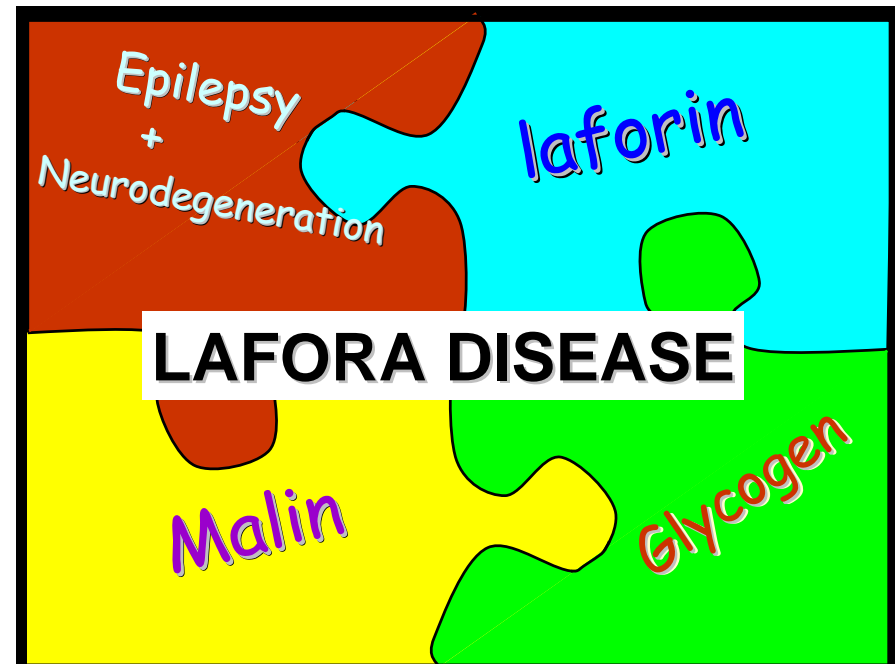
Saccharomyces cerevisiae: herramienta de estudio

Sistema de doble híbrido

(Fields and Song, 1989. Nature 340: 245)

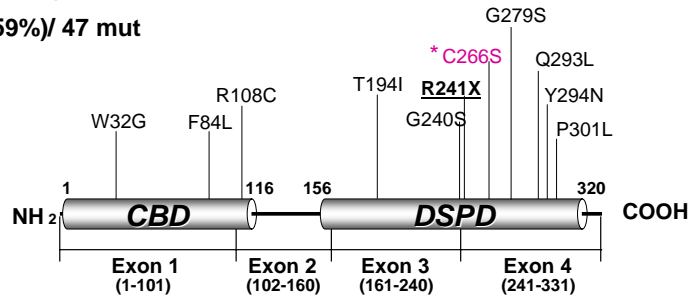


- Interacción in vivo.
- Deben de alcanzar el núcleo
- Proteínas solubles, estables



EPM2A, 6q24: **LAFORIN**

53/90 (59%)/ 47 mut



Consensus PTPase

I T
VHC-AG--RSG

Laforin	EKGHIVVHCNAGVGRSTAAVCGWLQ
DUS5 (<i>H. sapiens</i>)	EKGGKVLVHCEAGISRSPTICMAYLM
F28C6.8 (<i>C. elegans</i>)	SKGKTVVVHCCKAGRTSRATVATCYLM
YVH1 (<i>S. pombe</i>)	SKNAKVLVHCFAGISRSVTLVAAYLM
PTP3 (<i>C. eugametos</i>)	ASGGVCLVHCLAGISRSASVVIAYLM

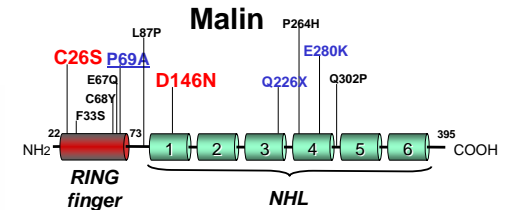
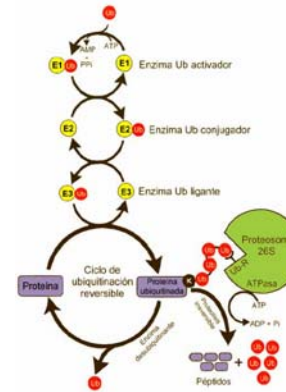
↑
C266S

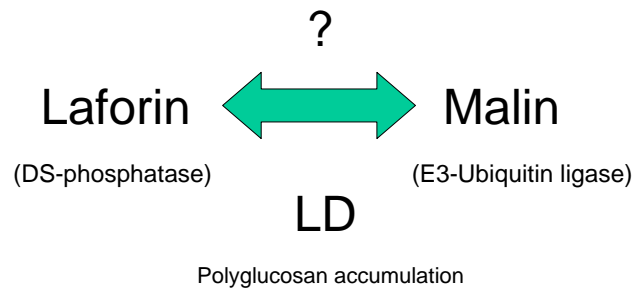
SECOND GENE RELATED TO LAFORA DISEASE

EPM2B, 6p22.3: **MALIN**

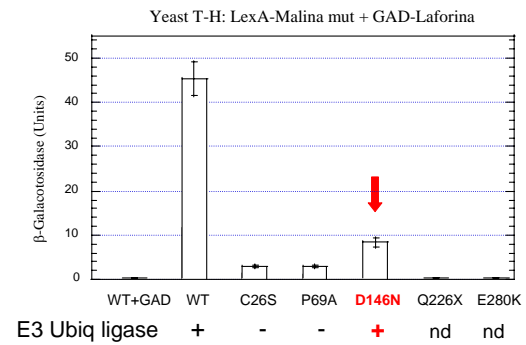
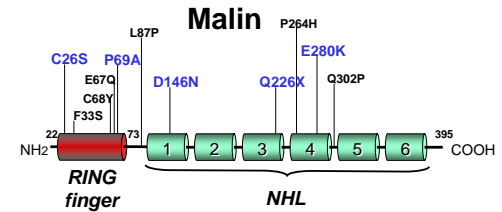
17/90 (19%)/ 51 mut

Malin has E3-Ubiquitin
ligase activity

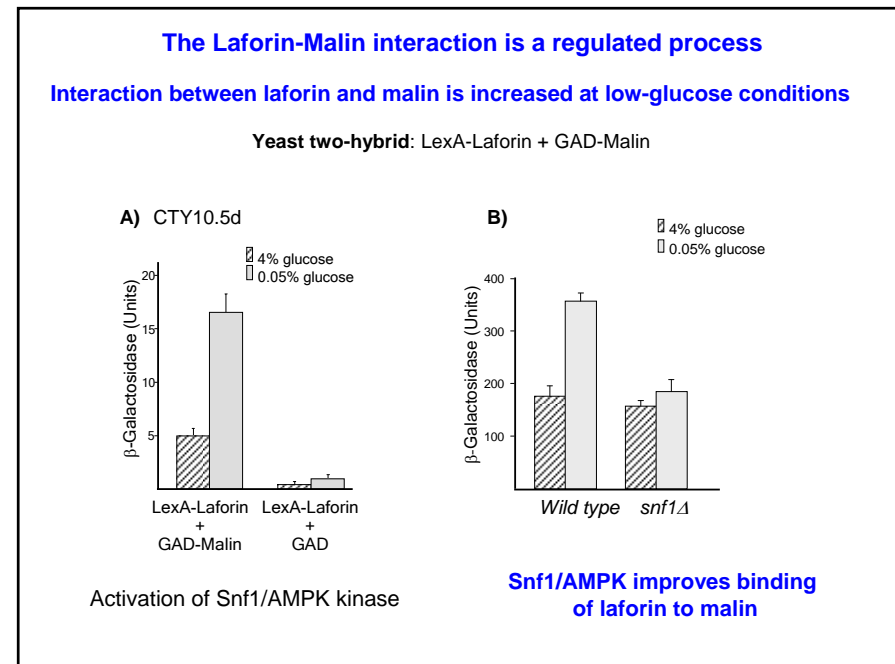
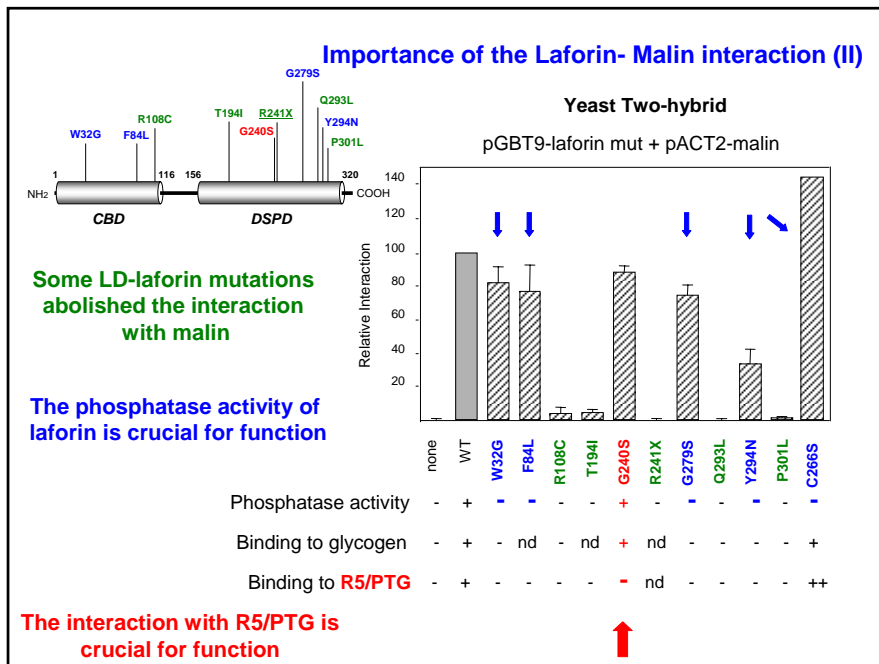




Importance of the Laforin- Malin interaction (I)



Interaction of malin with laforin is crucial for function



Conclusiones



Unidad de Señalización por Nutrientes



Miguel, Leda, MC, Tere, Dani, Santi, Ada, Luisa y Elena



SAF2005-00852



LSHM-CT-2004-005272



Exp. 061932



INTRA/07/738.1



ciberer

CIBERER U-742
Centro de Investigación Biomédica En Red
de Enfermedades Raras



Colaboraciones

- GlkB

- Alberto Marina, IBV.
- Antonio Cuesta Muñoz, Hospital Carlos Haya, Málaga.
- Luis Castaño, Hospital de Cruces, Barakaldo.

- AMPK

- Grahame Hardie, Wellcome Trust Biocentre, Dundee Univ. Dundee.
- David Carling, MRC Clinical Sciences Centre, London.

- Glc7/PP1, Ypi1, Sds22

- Joaquín Ariño, Dept. Bioquímica y Biología Molecular, UAB, Barcelona.
- Mathieu Bollen, Dept. Mol. Cell Biol. KULeuven.

- Laforina-malina

- Santiago Rodríguez de Córdoba, CIB-CSIC, Madrid.
- Joan Guinovart, Parc Científic de Barcelona.
- Erwin Knecht, Centro Invest. Príncipe Felipe, Valencia.
- Jose Maria Serratosa, Fundación Jimenez Diaz, Madrid.



IBV Instituto de Biomedicina de Valencia
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo y herramienta para el estudio de enfermedades genéticas humanas

Dr. Pascual Sanz

ciberer
Centro de Investigación Biomédica En Red de **Enfermedades Raras**

3º Curso de Genética Humana, Valencia, Enero 2008