

مقاله آموزشی

اساس و کاربرد سیستم دوگانه در مخمر

ایرج نحوی، کامران قانّدی*، مریم عباسی دینانی

چکیده

واکنش‌های پروتئین-پروتئین برای بیشتر فرایندهای سلولی، مانند همانندسازی DNA، رونویسی، پردازش، ترجمه، ترشح، تنظیم چرخه سلولی، سوخت و ساز، تشکیل ساختارهای سلولی و مجموعه‌های آنزیمی ضروری است. به علاوه امروزه یکی از برنامه‌های اصلی زیست‌شناسان تفسیر داده‌های توالی ژنوم است که برای موجودات زنده زیادی تعیین شده است. به خصوص تلاش‌ها روی ارزیابی عملکرد بیشتر ژن‌های ناشناخته و پروتئین‌هایی که آنها رمزگذاری می‌کنند، متمرکز شده است. چون واکنش پروتئین-پروتئین برای همه فرایندهای سلولی ضروری است، گاهی ممکن است عمل یک پروتئین ناشناخته به وسیله تعیین پروتئین‌هایی که با آن واکنش می‌دهند، شناسایی شود. سیستم دوگانه سیستمی است که واکنش بین دو پروتئین را به وسیله ساخت مجدد یک عامل رونویسی فعال در شرایط آزمایشگاهی تعیین می‌کند. بیشتر عوامل رونویسی یوکاریوتی منطقه‌های عملکردی فعال‌کننده رونویسی و اتصال به DNA دارند. فعال کردن رونویسی ممکن است به وسیله بیان مستقل دو زنجیره، به صورت ترکیبات کیمیری با پروتئین‌هایی که با همدیگر داخل بدن واکنش می‌دهند، صورت گیرد. یک کیمیر دارای زنجیره اتصال به DNA ترکیب شده با اولین پروتئین مورد نظر (DB-X یا طعمه) و دیگری یک زنجیره فعال‌کننده در ترکیب با پروتئین دوم (AD-Y یا صید یا پروتئین هدف) است. واکنش بین DB-X و AD-Y به ساخت عامل رونویسی و در نهایت فعال شدن ژن گزارشگر می‌شود. وقتی یک شاخص قابل انتخاب، مثل *HIS3*، به عنوان ژن گزارشگر، استفاده شود، فعالیت رونویسی وابسته به دوگانه به وسیله رشد سلول‌ها روی پلیت فاقد هیستیدین مشخص می‌شود. امروزه سیستم دوگانه را به عنوان یک ابزار مناسب برای تعیین نقشه واکنش‌های پروتئینی سلول، در نظر گرفته‌اند. این نقشه ممکن است شامل واکنش‌های پروتئینی باشد که در طول زندگی یک موجود زنده روی می‌دهد. در این گزارش، به طور مختصر با اصول و روش‌های این سیستم‌ها آشنا می‌شویم. واژه‌های کلیدی: سیستم دوگانه در مخمر؛ واکنش‌های پروتئین-پروتئین؛ نقشه واکنش‌های پروتئینی.

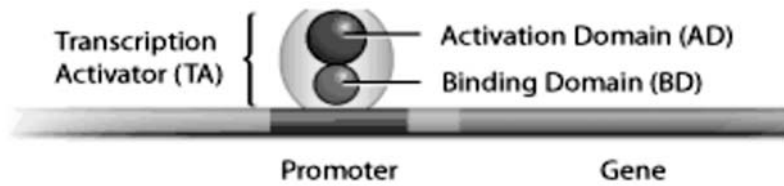
مقدمه

وابسته‌اند. در فرایندهای سلولی، مانند رشد سلول، چرخه سلولی، مسیرهای متابولیک و انتقال پیام نیز واکنش‌های پروتئین-پروتئین نقش کلیدی دارند. بررسی واکنش‌های بین پروتئین‌ها به زیست‌شناسان اجازه می‌دهد که عمل پروتئین‌های ناشناخته و ژن‌هایی که آنها را رمزگذاری می‌کنند، را تعیین کنند (۱و۲). به علاوه، امروزه یکی از برنامه‌های اصلی زیست‌شناسان تفسیر داده‌های توالی ژنوم است که در موجودات زنده زیادی تعیین شده است. به ویژه تلاش‌ها روی ارزیابی بیشتر عملکرد ژن‌های ناشناخته و پروتئین‌هایی که آنها کد می‌کنند، متمرکز شده است.

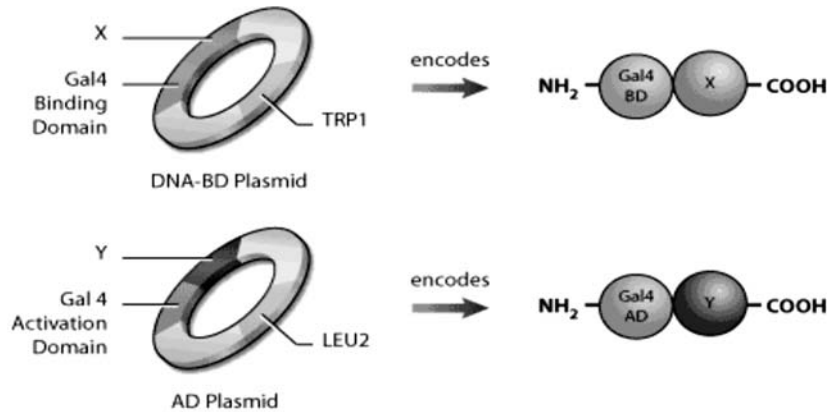
واکنش‌های پروتئین-پروتئین برای بیشتر فرایندهای سلولی، شامل همانندسازی DNA، رونویسی، پردازش، ترجمه تا ترشح، تنظیم چرخه سلولی، سوخت و ساز، تشکیل ساختارهای سلولی و مجموعه‌های آنزیمی، ضروری است. تشکیل ساختارهای سلولی بزرگ، از قبیل اسکلت سلولی، اسکلت هسته‌ای و دوک‌های میتوزی نیز نتیجه واکنش‌های پیچیده بین پروتئین‌ها است. خصوصیات ساختارهای کوچک‌تر، از قبیل منافذ هسته^۱، سانتروزوم‌ها و کینتوکورها هم به واکنش‌های پروتئین-پروتئین

*کامران قانّدی، Ph.D.

اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک
Email: kamranghaedi@yahoo.com / تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۷۹



شکل ۱: برخی عوامل رونویسی زنجیره‌های اتصال به DNA و فعال کننده رونویسی مجزا دارند (۹).



شکل ۲: پروتئین X همراه با زنجیره اتصال وارد یک پلاسمید و پروتئین Y همراه با زنجیره فعال کننده دیگر وارد پلاسمید دیگر می‌شوند (۹).

که بیشتر عوامل رونویسی یوکاریوتی زنجیره‌های فعال کننده رونویسی و اتصال به DNA قابل جدا کردن دارند، توصیف کردند (شکل ۱). آنها نشان دادند که فعال کردن رونویسی ممکن است با بیان مستقل دو زنجیره، به شکل ترکیبات کیمیری^۹ با پروتئین‌هایی که با همدیگر در محیط داخل بدن ترکیب می‌شوند، انجام گیرد (۳ تا ۸). یک پلاسمید حاوی زنجیره اتصال به DNA است که با اولین پروتئین مورد نظر (پلاسمید طعمه یا DB-X پلاسمید^{۱۰}) ترکیب شده است. پلاسمید دوم یک زنجیره فعال کننده دارد که با پروتئین دوم (پلاسمید صید یا AD-Y پلاسمید^{۱۱}) ترکیب می‌شود. وقتی که مخمر با هر دو پلاسمید هم‌زمان تراریخت^{۱۲} شود، هر دو پروتئین در مخمر بیان می‌شوند و در نتیجه، یک پروتئین همراه با زنجیره اتصال عامل رونویسی و دیگری همراه با زنجیره فعال کننده عامل رونویسی خواهد بود (شکل ۲).

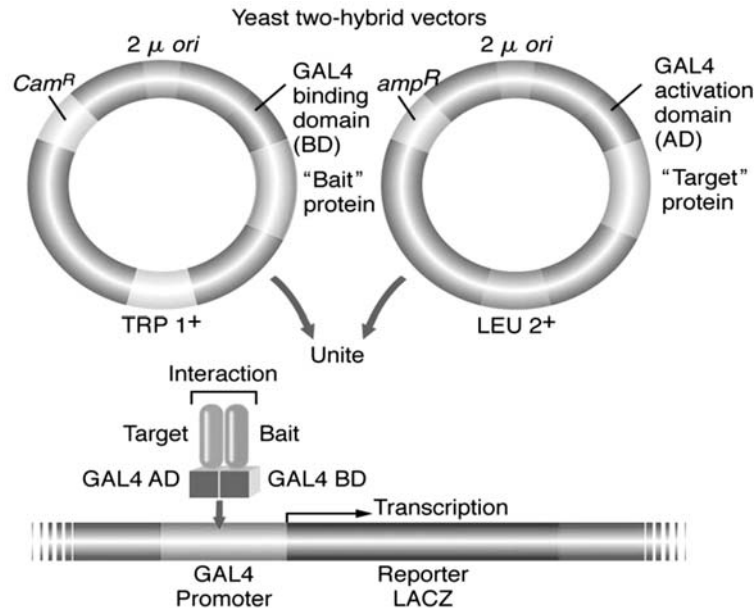
واکنش بین AD-Y و DB-X به ساخت عامل رونویسی و در نهایت، فعال شدن ژن گزارشگر^{۱۳} می‌شود. وقتی یک شاخص قابل انتخاب، مثل *HIS3*، به‌عنوان ژن گزارشگر، استفاده شود، فعالیت رونویسی

چون واکنش‌های پروتئین-پروتئین برای همه فرایندهای سلولی ضروری است، گاهی فعالیت یک پروتئین ناشناخته از روی تعیین پروتئین‌هایی که با آن واکنش می‌دهند، شناسایی می‌شود (۳ و ۴). فنون زیادی برای مطالعه واکنش‌های پروتئین-پروتئین وجود دارد که شامل روش‌های زیست‌شناختی، مانند ایمونوپرسیپیتیشن هم‌زمان^۲ و کروماتوگرافی میل ترکیبی^۳، یا روش‌های ژنتیک مولکولی، مانند سیستم دوگانه در مخمر^۴، می‌شود. به‌طور کلی، دو روش مؤثر بر مطالعه واکنش‌های پروتئین-پروتئین وجود دارد. اول، خالص‌سازی مجموعه‌های پروتئین همراه با اسپکترومتری جرمی^۵ و دوم، سیستم دوگانه در مخمر است که یک روش حساس برای بررسی واکنش‌ها در محیط داخل بدن است. این سیستم چهارده سال پیش شناخته شد و اکنون از یک آزمایش ساده برای بررسی واکنش بین پروتئین‌های شناخته‌شده به یک سیستم متداول برای تعیین واکنش‌های جدید از کتابخانه‌های ژنی^۶ پیچیده توسعه یافته است. قابلیت تغییر و حساسیت روش‌های دوگانه و اسپکترومتری جرمی به استفاده از آنها در فناوری در حال رشد پروتئومیک^۷ منجر شده است (۵).

اساس سیستم دوگانه در مخمر

ابتدا فیلد و سونگ^۸، در سال ۱۹۸۹، این سیستم را بر اساس این حقیقت

- | | |
|---------------------------|---------------------------|
| 2- Coimmunoprecipitation | 3-Affinity Chromatography |
| 4-Yeast Two-Hybrid System | 5-Mass Spectrometry |
| 6-Gene Library | 7-Proteomic |
| 8-Fields & Song | 9-Chimeric |
| 10-Bait Plasmid | 11-Pery Plasmid |
| 12-Cotransformation | 13-Reporter Gene |



شکل ۳: بیان پلاسمیدهای حاوی AD-Y و DB-X به طور هم‌زمان در مخمر. در صورتی که پروتئین‌ها با همدیگر واکنش دهند، یک عامل رونویسی کامل تشکیل و ژن گزارشگر بیان می‌شود (۱۴).

۳. دارای توانایی تعیین واکنش‌های گذرا و ضعیف است.
۴. برای غربال مجموعه‌های پروتئینی دوتایی و سه‌تایی به طور مستقیم به کار می‌رود.
۵. انجام واکنش نسبت به روش‌های دیگر آسان‌تر و سریع‌تر است.
۶. اندازه‌گیری واکنش‌ها به صورت نیمه کمی است. نیمه کمی بودن واکنش نسبت به شاهد بررسی و نتیجه به صورت واکنش ضعیف، متوسط و قوی بیان می‌شود.

کاربردهای سیستم دوگانه در مخمر

مهم‌ترین کاربردهای این سیستم عبارتند از (۱۲، ۲۶):

۱. تعیین واکنش بین دو پروتئین شناخته شده
۲. تحقیق روی شبکه واکنش‌های انجام شده بین پروتئین‌ها
۳. تعیین پروتئین‌هایی که در روند تکامل بین گونه‌ها حفظ شده‌اند
۴. تعیین حوزه‌های ۱۵ و باقیمانده‌های ۱۶ لازم برای واکنش فیزیکی بین یک جفت پروتئین
۵. تعیین واکنش بین پروتئین‌های رمزگذاری شده به وسیله ژن‌های جدید با یک پروتئین شناخته شده انتخابی
۶. تعیین واکنش‌هایی که با واسطه لیگاندهای خارجی انجام می‌گیرد یا به وسیله آنها از بین می‌رود
۷. تعیین نقشه واکنش‌های پروتئین-پروتئین در یک مقیاس وسیع.

14-Target Protein
16-Residues

15-Domains

وابسته به دوهیبریدممکن است به وسیله رشد سلول‌ها روی پلیت فاقد هیستیدین مشخص شود (شکل‌های ۳ و ۴). بنابراین سیستم دوگانه مخمر سیستمی است که واکنش بین دو پروتئین را به وسیله ساخت مجدد یک عامل رونویسی فعال در محیط داخل بدن تعیین می‌کند (۱۰ تا ۱۳).

خصوصیات پروتئین‌های ترکیبی

وقتی که پلاسمیدها در سلول مخمر بیان می‌شوند، پروتئین‌های ترکیبی تولیدشده باید خصوصیاتی داشته باشند تا سیستم به درستی عمل کند (۱ و ۵):

۱. ثبات پروتئین در مخمر
۲. توانایی ورود به هسته
۳. عدم توانایی فعال کردن رونویسی به تنهایی
۴. توانایی اتصال به نواحی اپراتور برای پروتئین طعمه^{۱۴}
۵. پیچش صحیح پروتئین

مزایای سیستم دوگانه در مخمر

این سیستم نسبت به روش‌های دیگری که برای تعیین واکنش بین پروتئین‌ها استفاده می‌شود، دارای مزایای زیر است (۱۰، ۳، ۴، ۶، ۱۰):

۱. تکنیک در محیط داخل بدن انجام می‌شود.
۲. به مقدار زیاد پروتئین یا آنتی‌بادی خالص شده نیاز ندارد و در نتیجه، نسبت به روش‌های دیگر ارزان‌تر است.

(۱) *Sc-Leu-Trp-Ura*
 (۲) *-0.2% 5FOASc-Leu-Trp*
 (۳) *3ATSc-Leu-Trp-His +*

در نهایت، واکنش‌ها به‌وسیله روش‌های مستقل و زیستی تأیید می‌شود (شکل ۵) (۱۰، ۵، ۳).

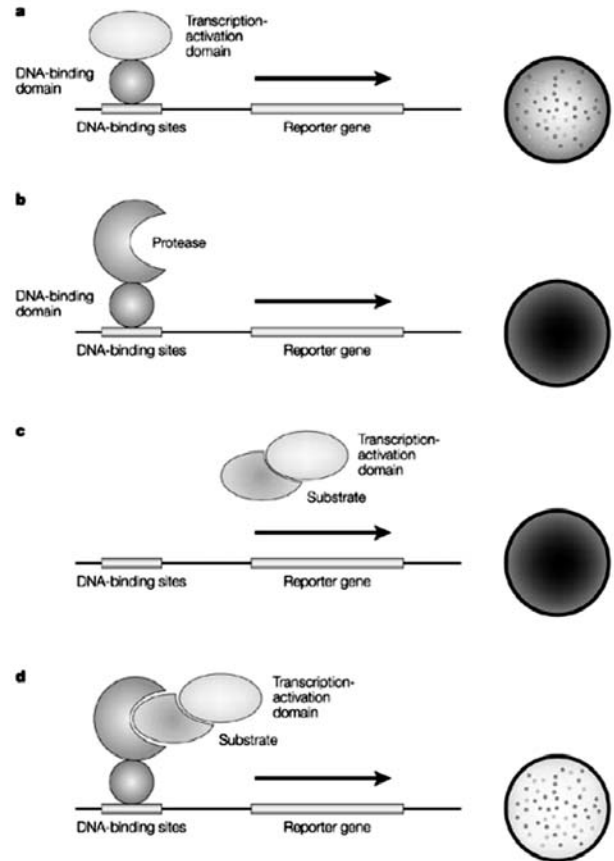
آزمایش خود فعال‌کنندگی

سلول‌های مخمر دارای DB-X یا AD-Y از نظر فعال کردن خودبه‌خودی با تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد ۳- آمینو ۱، ۲ و ۴ تریازول (3AT) ۲۲ آزمایش می‌شوند. ژن *HIS3*، ایمیدازول گلیسرول فسفات دهیدراتاز ۲۳ را رمزگذاری می‌کند. این آنزیم می‌تواند به‌طور اختصاصی در یک روش وابسته به غلظت ۲۴، به‌وسیله تعیین آستانه مقاومت به 3AT و تعیین غلظت 3AT در پلیت فاقد هیستیدین، حتی افزایش جزئی در بیان ژن گزارشگر *HIS3* را تعیین کند. این روش امکان تعیین واکنش‌های ضعیف پروتئین-پروتئین را نیز تسهیل می‌کند. بهتر است که DB-X در حضور وکتور AD آزمایش شود. چون ممکن است یک مجموعه DB-X/AD تشکیل شود و رونویسی را فعال کند. کمترین غلظت 3AT که مانع رشد سلول‌های ترانسفورماسیون شود، غلظت پایه 3AT است. اگر سلول‌های حاصل از ترانسفورماسیون حتی در حضور غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار 3AT رشد کنند، DB-X (یا AD-Y) احتمالاً پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم دارای فعالیت خود فعال‌کنندگی ژن گزارشگر است. این پلاسمیدها برای استفاده در غربال دوهیبرید مناسب نیستند (۱۰، ۶، ۳).

موارد مثبت کاذب

این سیستم مزایای زیادی دارد، اما در برخی موارد ممکن است نتایج مثبت کاذب ایجاد کند و در نتیجه، گاه به بیان ژن گزارشگر در مواردی که پروتئین‌های مورد نظر هیچ‌گونه واکنشی با همدیگر ندارند، منجر می‌شود (۱۶، ۱۳، ۱۰، ۶، ۴، ۳). موارد زیر نمونه این حالت هستند:

۱. پروتئین‌های دارای نواحی با سطوح با تمایل ۲۵ پایین برای پروتئین‌های متفاوت (مثل سطوح وسیع هیدروفوبیک)
۲. پروتئین‌هایی که به‌طور طبیعی با تعداد زیادی از پروتئین‌ها واکنش می‌دهند (مثل پروتئین‌های شوک حرارتی ۲۶)

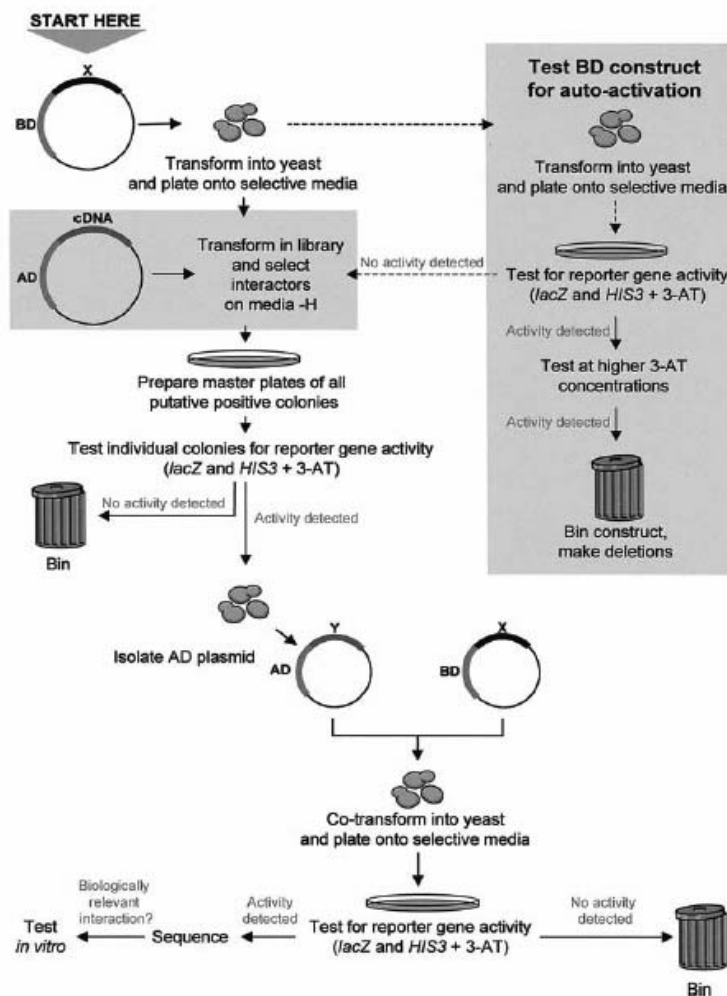


شکل ۴: عامل رونویسی کامل باعث بیان ژن گزارشگر و رشد سلول می‌شود (a). زنجیره اتصال و زنجیره فعال‌کننده به‌تنهایی نمی‌توانند ژن گزارشگر را فعال کنند (b و c). در صورتی که این زنجیره‌ها با پروتئین‌هایی ترکیب شوند که قادرند با هم واکنش دهند، یک عامل رونویسی کامل تشکیل و ژن بیان می‌شود. در نتیجه، سلول بر روی محیط انتخابی رشد می‌کند (d) (۱۵).

روش انجام آزمایش

ابتدا ژن‌های X و Y با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر می‌شوند. سپس به پلاسمیدهای دارای زنجیره اتصال DNA و زنجیره فعال‌کننده DNA، با استفاده از نوترکیبی، توالی ویژه هضم اندونوکلاز محدودکننده ۱۷ و اتصال ۱۸ منتقل و در نتیجه، پلاسمیدهای AD-Y و DB-X تولید می‌شوند. این پلاسمیدها به‌طور جداگانه به سویه‌های مخمر منتقل می‌شوند و سلول‌های مخمر دارای DB-X یا AD-Y برای فعال کردن خودبه‌خودی آزمایش می‌شوند. در صورتی که این سلول‌ها اثر خود فعال‌کنندگی ۱۹ نداشته باشند، هم‌زمان بر روی پلیت مادر ۲۰ کشت داده می‌شوند تا ترانسفورماسیون هم‌زمان سلول‌های مخمر انجام شود. در این مرحله فقط سلول‌هایی زنده می‌مانند که حاوی هر دو پلاسمید باشند. سپس سلول‌ها به‌وسیله انتقال پلیت ۲۱ روی محیط‌های زیر برای القاء ژن‌های گزارشگر کشت داده می‌شوند:

17-Restriction Enzymes	18-Ligation
19-Self Activation	20-Master Plate
21-Replica Plating	22- 3-Amino,1-2-4 triazol
23-Imidazol Glycerol Phosphate Dehydratase	24-Dose
25-Affinity	26-Heat Shock Proteins



شکل ۵: این نمودار مراحل انجام واکنش را توصیف می‌کند. در این سیستم، از پروتئین GAL4 و ژن‌های گزارشگر HIS3 و LacZ استفاده می‌شود. اولین مرحله ترانسفورم سویه مخمر با ساختار رمزگذار پروتئین X با زنجیره اتصال GAL4 است. کلنی‌های مخمر ترانسفورمانت باید از نظر خود فعال‌کنندگی ژن‌های گزارشگر آزمایش شوند. اگر ساختار DB-X اثر خود فعال‌کنندگی نداشته باشد، می‌تواند با کتابخانه ترکیبی GAL4 AD-cDNA ترانسفورم شود. ترانسفورمانت‌ها روی محیط فاقد هیستیدین (و دارای ۳-آمینوتریازول، در صورت لزوم) انتخاب می‌شوند. کلنی‌هایی که در مقایسه با زمینه رشد مخمر، با سرعت بالاتر رشد می‌کنند، عوامل مناسبی برای واکنش پروتئین-پروتئین هستند و به یک پلیت تازه فاقد هیستیدین منتقل می‌شوند. از این مخمرها می‌توان برای فعالیت β -گالاکتوزیداز و محیط فاقد هیستیدین و دارای ۳-آمینوتریازول، برای تأیید فعالیت ژن گزارشگر، استفاده کرد. پلاسمید دارای زنجیره فعال‌کننده می‌تواند از سلول‌هایی که فعالیت ژن گزارشگر آنها ثابت شده استخراج شود. پلاسمید AD می‌تواند دوباره به سلول‌ها DB-X ترانسفورم شود و برای فعالیت ژن گزارشگر مجدداً آزمایش شود. اگر واکنش آشکار شود، cDNA کلون و توالی آن تعیین می‌شود (۶).

۲. وکتورهای با تعداد نسخه‌های کم
۳. سه ژن گزارشگر با پروموتورهای مستقل
۴. ژن گزارشگر انتخابی مثبت / منفی
۵. گروه (پانل) گسترده از سویه‌های مخمر

فناوری Gateway

سیستم همانندسازی Gateway (راه‌گاه) نوترکیبی، از توالی ویژه بر اساس فاز لامبدا به‌جای اندونوکلیئاز محدودکننده و لیگاز استفاده می‌کند.

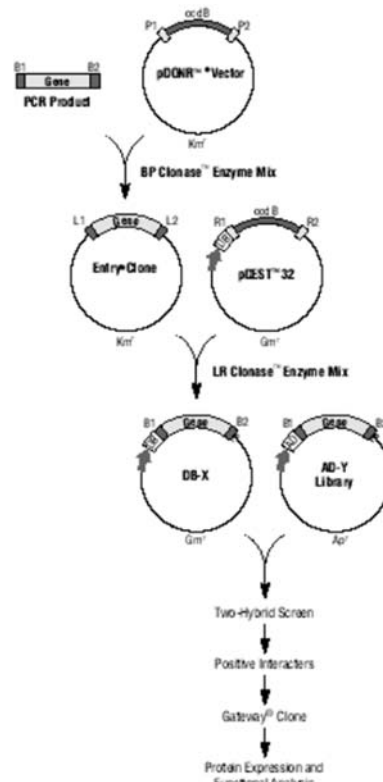
۳. پروتئین‌هایی که دارای برخی نواحی هستند که به‌عنوان زنجیره فعال‌کننده عمل می‌کنند؛ مانند پروتئین‌هایی که ساختار کروماتین را تحت تأثیر قرار می‌دهند و پروتئین‌های دارای تمایل پایین یا غیراختصاصی برای نواحی پروموتور (یا پروتئین‌هایی که به آن ناحیه متصل می‌شوند).

به همین دلیل تغییراتی بر روی سیستم اعمال شده تا موارد مثبت کاذب کاهش یابد (۲، ۶، ۱۰، ۱۱). این اقدامات عبارتند از:

۱. فناوری Gateway

می شود (DB-X را تولید می کند) (۱۰).

وکتور $pDEST^{TM}_{32}$: این وکتور یک وکتور هدف Gateway دارای زنجیره فعال کننده است که برای کلون ژن شناخته شده دوم مورد نظر، در قالب توالی رمزگذار زنجیره فعال کننده رونویسی پروتئین GAL4 استفاده می شود (تولیدکننده AD-Y) (۱۰).



شکل ۶: واکنش های LR و BP در فناوری Gateway (به متن مراجعه شود)

وکتورهای AD و DB با تعداد نسخه های کم (ARS/CEN)
 بیان زیاد پروتئین های هیبرید AD-Y و DB-X ممکن است واکنش غیراختصاصی بین پروتئین های ترکیبی را به علت تعداد زیاد آنها، افزایش دهد و در نتیجه، به افزایش موارد مثبت کاذب بیانجامد. به علاوه بیشتر پروتئین ها وقتی که به مقدار زیاد بیان شوند، سمی هستند و بالقوه پروتئین های واکنش دهنده مورد نظر ممکن است تعیین نشود. این مورد به نتایج منفی کاذب می انجامد. در مخمر ممکن است بیان پروتئین در سطحی نسبتاً پایین و با استفاده از وکتورهای بیان با تعداد نسخه های پایین ARS/CEN حفظ شود. وکتورهای بر اساس ARS/CEN، تعداد نسخه های پلاسمید را به طور ثابت حفظ می کنند. این موضوع به افزایش توانایی بیان ژن گزارشگر منجر می شود. بیان ثابت پروتئین های ترکیبی در سطوح نزدیک به وضعیت های فیزیولوژیکی، زمانی ارزشمند است که خصوصیات جهش ها، پپتیدها و پروتئین های دیگر یا ترکیبات دیگری که واکنش های پروتئین-پروتئین شناخته شده را تغییر یا تخریب می کنند، تعیین شود (۱۰ و ۶).

سه ژن گزارشگر با پروموتورهای مستقل

یک تک نسخه از سه ژن گزارشگر به طور ثابت در لکوس های متفاوت در ژنوم مخمر وارد می شود. نواحی پروموتور $URA3$ ، $LacZ$ ، $URA3$ جز برای نواحی اتصال $GAL4$ ، مستقل هستند. چون سه واقعه رونویسی مستقل (از پروموتورهای مجزا) اغلب در لکوس کروموزومی مستقل روی می دهد، موارد مثبت کاذب کاهش می یابد. القاء ژن های گزارشگر $URA3$ و $HIS3$ بسته به واکنش دوهیبرید، به وسیله رشد سلول، به ترتیب روی پلیت فاقد هیستیدین یا اوراسیل مشخص می شود. القاء ژن $LacZ$ وقتی با محیطی $X-gal$ آزمایش شود (۵- برومو-۴-کلرو-۳-اندولیل -D-β-گالاکتوپیرانوزید^{۲۷}) یک رنگ آبی ایجاد می کند (۱۱، ۱۰، ۶، ۲).

ژن گزارشگر انتخابی مثبت / منفی

القاء مستقل از واکنش دو هیبرید ژن $URA3$ به تبدیل ترکیب ۵فلوراوروتیک اسید (5FOA)^{۲۸} به ۵- فلوراوراسیل^{۲۹} منجر می شود

توالی های نوترکیبی DNA کلیدی که واکنش های نوترکیبی را وساطت می کنند، اساس فناوری Gateway هستند. دو واکنش فناوری Gateway را تشکیل می دهند: واکنش LR یک واکنش نوترکیبی بین پلاسمید ورود و یک وکتور هدف است که به وسیله مخلوط پروتئین های نوترکیب، یک کلون بیان را ایجاد می کند. این واکنش برای انتقال توالی مورد نظر به یک یا چند وکتور هدف در واکنش های موازی استفاده می شود. واکنش BP یک واکنش نوترکیب بین یک پلاسمید بیان (یا یک محصول PCR محدود شده به attB) و یک وکتور دهنده برای ایجاد یک پلاسمید ورود است. در این سیستم، ژن های مورد نظر با PCR تکثیر و از راه واکنش های نوترکیبی ژن های مورد نظر یا به وکتور DB-X یا AD-Y منتقل می شود و غربالگری دوهیبرید انجام می گیرد (شکل ۶). پس از اینکه غربال دوگانه کامل شد، ژن های مورد نظر به وکتورهای متعدد برای آزمایش یا مرحله بعدی منتقل می شوند. واکنش های نوترکیبی برای تولید یک وکتور طعمه (DB-X) با ژن مورد نظر در غالب زنجیره اتصال DNA 4 GAL استفاده می شود (۱۰).

وکتور $pDEST^{TM}_{32}$: یک وکتور هدف Gateway دارای زنجیره اتصال DNA (DB) است. این وکتور برای کلون ژن شناخته شده در قالب توالی رمزگذار زنجیره اتصال DNA پروتئین GAL4 استفاده

27-5-Bromo,4chloro,3-endolin,B-D-Galactopyranoside
 28-5-Flourouracic Acid 29-5-Flourouracyl

دارای هر دو پلاسمید DB-X و AD-Y هستند و اغلب برای جدا کردن پلاسمیدهای حاوی DB-X و AD-Y، به طور جداگانه، برای تأیید واکنش و تعیین خصوصیت بعدی کلون‌های نماینده سلول اشرشیا کلی مناسب هستند. برای تسهیل جداسازی در اشرشیا کلی، وکتور pDESTTM₃₂ مقاومت به جنتامایسین و وکتور pDESTTM₂₂ مقاومت به آمپی‌سیلین را رمزگذاری می‌کند. به وسیله الکتروپوریشن، DNA پلاسمید جدا شده از سلول‌های مخمر دارای DB-X و AD-Y به اشرشیا-کلی معرفی می‌شوند و ترانسفورمانت‌های دارای AD-Y با آمپی‌سیلین و انواع DB-X با جنتامایسین انتخاب می‌شوند. DNA پلاسمید از این سلول‌های اشرشیا کلی به MaV203 همراه با پلاسمید pDBLeu یا DB-X (یا AD-Y) ترانسفورم می‌شود و برای القاء ژن‌های گزارشگر pDB-X آزمایش می‌شوند. موارد مثبت واقعی ژن‌های گزارشگر را با pDB-X القاء می‌کنند، اما با وکتور pDBLeu به تنهایی القاء نمی‌کنند (۱۰).

موارد منفی کاذب

این سیستم هم‌چنین در مواردی واکنش منفی کاذب ایجاد می‌کند. در نتیجه، با وجود واکنش بین پروتئین‌ها، ژن‌های گزارشگر القاء نمی‌شوند. این موارد عبارتند از (۱۶، ۱۳، ۱۲، ۱۱، ۶، ۲):

۱. عدم ورود پروتئین DB-X یا AD-Y به هسته
۲. ضعیف بودن واکنش بین دو پروتئین، به طوری که توسط این سیستم آشکار نشود
۳. عدم واکنش پروتئین‌های X و Y به صورت ترکیب با DB و AD
۴. وابستگی واکنش بین پروتئین‌های X و Y به تغییرات پس از ترجمه که در هسته سلول مخمر وجود ندارد
۵. بروز واکنش پروتئین-پروتئین تنها وقتی که یا پروتئین X و یا پروتئین Y پس از ترجمه قسمتی از ساختار خود را از دست بدهد.

سیستم‌های دوگانه مخمر کلاسیک

یکی از سیستم‌هایی که به طور رایج استفاده شده، سیستم GAL4 است که از زنجیره اتصال DNA و زنجیره فعال‌کننده پروتئین GAL4 مخمر استفاده می‌کند. عیب این سیستم این است که باید در مخمرهای gal4⁻ انجام شود که ترانسفورم آنها مشکل است. سوبه‌های مخمر استفاده شده برای آزمایش‌های دوهیبرید شامل جهش‌هایی در تعدادی از ژن‌های مورد نیاز برای ساخت اسیدهای آمینه، مانند *URA3*، *HIS3*، *LEU2*، *TRP1* هستند. اگر این اسیدهای آمینه از محیط رشد حذف شوند، سوبه مخمر رشد نمی‌کند. بیشتر پلاسمیدهای دوهیبرید ژن‌هایی دارند که این جهش‌ها

که سمی است. بنابراین سلول‌های دارای پروتئین‌های واکنش‌دهنده وقتی روی پلیت فاقد اوراسیل کشت داده می‌شوند، رشد می‌کنند؛ اما وقتی روی محیط دارای 5FOA کشت داده می‌شوند، رشد آنها متوقف می‌شود. *URA3* روی محیط دارای 5FOA هم یک روش برای تعیین خصوصیت سریع واکنش‌دهنده‌های پروتئین-پروتئین است. جهش‌ها، پپتیدها و پروتئین‌ها یا موادی که مانع واکنش پروتئین-پروتئین می‌شوند یا آن را تعدیل می‌کنند، می‌توانند با تعیین سلول‌هایی که بتوانند روی پلیت انتخابی دارای 5FOA رشد کنند (Sc-Leu-Trp+5FOA)، انتخاب شوند.

شاهد‌های مخمر

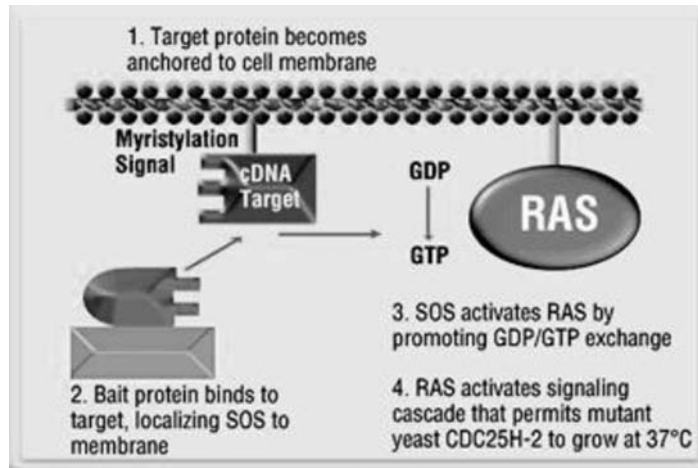
سطح بیان ژن گزارشگر از یک غربال دو هیبرید ممکن است از قوی تا ضعیف متفاوت باشد؛ اگرچه این سطح ممکن است تمایل واکنش‌های پروتئین-پروتئین مشاهده شده در محیط اصلی را منعکس نکند. برای کمک به تعیین اینکه کلون‌های نماینده به طور مشابه واکنش‌دهنده‌های مثبت را نشان می‌دهند، یک مجموعه از سوبه‌های شاهد (مشتق از MaV103) ایجاد شده است که دارای جفت پلاسمیدهای بیان‌کننده پروتئین‌های ترکیبی، با طیفی از قدرت واکنش‌دهنده‌ها است و از آن برای کاهش موارد مثبت کاذب استفاده می‌شود (۱۰).

تحقیق کلون‌های نماینده

پروتئین‌های ترکیبی (AD-Y) تعیین شده در یک غربال دو هیبرید باید بتوانند ژن‌های گزارشگر را زمانی که با پروتئین آزمون اصلی (DB-X) دوباره آزمایش می‌شوند، القاء کنند. این ارزیابی مجدد، موارد مثبت کاذب را که به وسیله فعال‌سازی خودبه‌خود AD-Y یا جهش یافته‌های DB-X ایجاد می‌شود، حذف می‌کند. برای این بررسی‌ها Plasmid Shuffling یا یک آزمایش ترانسفورماسیون مجدد^{۳۰} استفاده می‌شود.

Plasmid Shuffling: سلول‌های مخمر جدا شده از یک غربال دو هیبرید دارای پلاسمیدهای DB-X و AD-Y هستند. در این روش سلول‌هایی که به طور خودبه‌خودی فاقد پلاسمید DB-X شده‌اند، اما پلاسمید AD-Y را حفظ کرده‌اند، انتخاب می‌شوند. سلول‌های دارای AD-Y به دست آمده، آماده و مجدداً با سلول حاوی DB-X ترانسفورم می‌شوند. سپس ترانسفورمانت‌ها انتخاب و برای واکنش X و Y دوباره آزمایش می‌شوند. کلون‌هایی که ژن‌های گزارشگر را القاء می‌کنند، احتمالاً دارای پروتئین‌های ترکیبی واکنش‌دهنده هستند.

آزمایش ترانسفورماسیون مجدد: سلول‌های مخمر بالقوه واکنش‌دهنده



شکل ۷: سیستم بازیابی hSOS: یک پلاسمید حاوی یک سیگنال ورود به غشاء myristylation همراه با یک پروتئین و پلاسمید دوم حاوی hSOS به همراه پروتئین دوم است. پلاسمیدها هم‌زمان به سلول مخمر ترانسفورم می‌شوند. در صورت واکنش بین پروتئین‌ها سیستم Ras بازیابی می‌شود و سلول قادر است در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد کند (۱۷).

است. اما این سیستم مشکلاتی هم دارد: اول اینکه سویه مخمر *cdc25* برگشت‌پذیر است و به‌طور مثال می‌تواند در دمای محدودکننده، بدون توجه به پلاسمیدی که آن را حمل می‌کند، رشد کند. یعنی سویه مخمر باید پیش از هر آزمایش برای واکنش پروتئین-پروتئین، برای حساسیت به درجه حرارت، هم پیش و هم پس از ترانسفورماسیون، آزمایش شود. دوم اینکه تعیین واکنش‌های پروتئین-پروتئین منحصراً بر اساس رشد مخمر در دمای محدودکننده است و هیچ شاخص دیگری برای تأیید واکنش وجود ندارد.

مشکل بازگشت سویه مخمر و فقدان شاخص‌های اضافی برای تعیین واکنش پروتئین-پروتئین پیشنهاد می‌کند که سیستم بازیابی hSOS/Ras ممکن است برای غربالگری کتابخانه ژن مناسب نباشد. با وجود این، سیستم ممکن است در تأیید واکنش پروتئین-پروتئین تعیین شده به‌وسیله روش‌های دیگر نقش داشته باشد (۶ و ۲).

سیستم شکست یوبی کوئیتین^{۳۴}

یوبی کوئیتین یک پلی‌پپتید کوچک است که با پروتئین‌ها همراه می‌شود و آنها را برای تجزیه شدن هدف قرار می‌دهد. این مولکول به پروتئین‌ها متصل می‌شود و آنها را به پروتئوزوم 26S منتقل می‌کند. سپس یوبی کوئیتین به‌وسیله پروتئازهای اختصاصی یوبی کوئیتین رها می‌شود و دوباره به سیستم بر می‌گردد. جانسون و ورشاوسکی^{۳۵} مزیت طبیعت اختصاصی UBPs را برای توسعه سیستم شکست یوبی کوئیتین در

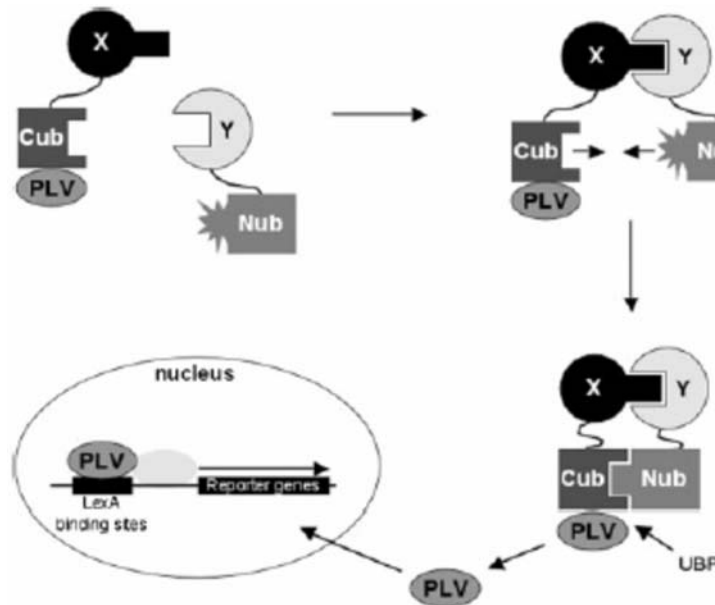
را کامل می‌کنند و باعث انتخاب مخمر ترانسفورمانت می‌شوند (۱۱ و ۵).

سیستم دوگانه سیتوپلاسمی (سیستم بازیابی hSOS/Ras)^{۳۱}

این سیستم از یک جهش‌یافته حساس به درجه حرارت سویه *cdc25* مخمر ساکارومایسس سرویزیه^{۳۲} استفاده می‌کند که دارای یک جهش نقطه‌ای در اسید آمینه ۱۳۲۸ ژن *cdc25* است. این ژن هومولوگ ژن *SOS* انسانی است که عامل تعویض نوکلئوتید گوانیل را رمزگذاری می‌کند و با اتصال به Ras آن را فعال می‌کند و به رشد سلول منجر می‌شود. جهش در ژن *cdc25* از رشد میزبان در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جلوگیری می‌کند، اما رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد طبیعی است. سیستم بر اساس توانایی hSOS برای کامل کردن نقص *cdc25* و فعال کردن مسیر پیام Ras مخمر است. یک پروتئین مورد نظر به‌صورت ترکیب با hSOS بیان می‌شود و پروتئین هدف دیگر با پیام‌های جایگزینی در غشاء، با استفاده از افزودن گروه مرستل^{۳۳}، ترکیب می‌شود. سپس سلول‌های مخمر در وضعیت محدودکننده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده می‌شوند. اگر پروتئین‌های طعمه و صید واکنش دهند، پروتئین hSOS به غشاء وارد می‌شود و مسیر پیام Ras را از راه تبدیل GDP به GTP فعال می‌کند و به سویه مخمر *cdc25* اجازه می‌دهد در این دما رشد کند (شکل ۷).

تعیین واکنش‌ها در سیتوپلاسم دو مزیت دارد. این سیستم‌ها ممکن است برای پروتئین‌هایی که به‌آسانی وارد هسته نمی‌شوند، مناسب‌تر باشند. در سیتوپلاسم، برخلاف هسته، ممکن است آزمون پروتئین‌ها تحت تغییرات پس از ترجمه باشد که برای برخی واکنش‌ها ضروری

31-Cyto Trap Two- Hybrid System (hSOS/Ras recruitment System)
 32- *Sacharomyces Cerevisiae*
 33-Myristylation Membrane-Localization Signal
 34-Split-Ubiquitin System 35-Johnsson & Varshavsky



شکل ۸: یک پروتئین با ناحیه N-انتهایی یوبی کوئیتین و پروتئین دوم با ناحیه C-انتهایی آن همراه با یک مولکول گزارشگر متصل می‌شود. در صورتی که پروتئین‌ها واکنش دهند، مولکول یوبی کوئیتین کامل شده توسط UBp شناسایی می‌شود. در نتیجه، مولکول گزارشگر آزاد و ژن بیان می‌شود (۲).

می‌کند. به بیان دقیق، نسخه‌های متعدد از توالی طعمه به بالادست ژن‌های گزارشگر مخمر، مانند *LacZ* یا *HIS3*، وارد می‌شود. پروتئین‌هایی که به طعمه متصل می‌شوند، از یک کتابخانه صید با استفاده از روش‌های غربال که مشابه روش‌های استفاده‌شده در غربالگری دوهیبرید است، جداسازی شده است. اغلب کتابخانه‌های استفاده‌شده برای غربالگری دوگانه مخمر برای غربال تک‌گانه نیز استفاده می‌شود (۱۶، ۲۰۴). در مسیر تکاملی دیگر، سیستم مخمر دوگانه بر اساس *LexA*، ابزاری را فراهم می‌کند که محققان بتوانند واکنش پروتئین-RNA را در داخل بدن مطالعه کنند. این سیستم با عنوان سیستم سه‌گانه RNA در مخمر^{۳۷} شناخته شده است و در آن از پروتئین‌های جداشده‌ای که به یک مولکول طعمه RNA از یک کتابخانه -AD VP16 صید متصل می‌شوند، استفاده شده است. در اینجا نیز از کتابخانه‌های یکسان با سیستم دوگانه استفاده می‌شود. مولکول طعمه RNA یک هیبرید بین RNA مورد نظر است و به پروتئین پوشش MS2 متصل است. با ترکیب پروتئین پوشش MS2 و *LexA*-BD، مولکول طعمه RNA برای پروموتورهای ژن‌های گزارشگر مخمر به کار گرفته می‌شود. پروتئین‌هایی که با RNA مورد نظر واکنش می‌دهند، می‌توانند به‌آسانی از کتابخانه‌های صید، به وسیله آزمایش برای فعالیت ژن گزارشگر، تعیین شوند (شکل ۹) (۱۹، ۲۰۱۶).

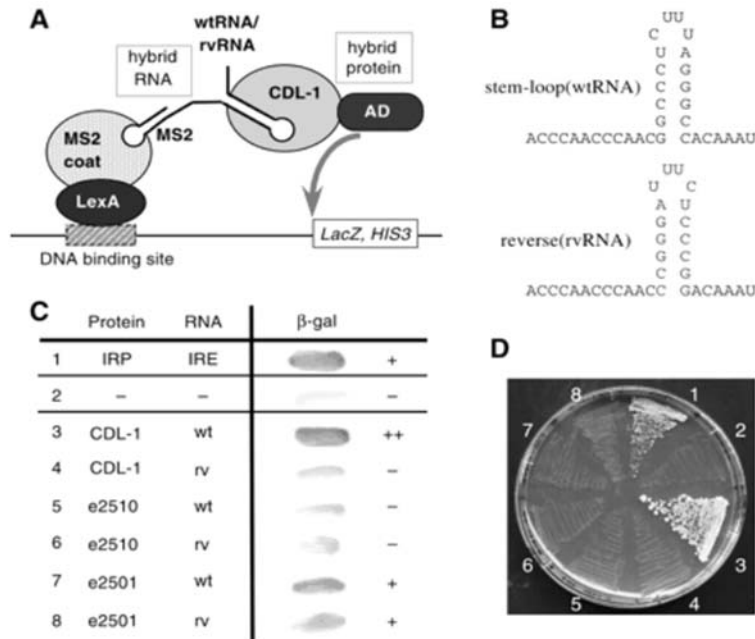
از کاربردهای عملی روش دوگانه در مخمر در ایران، می‌توان به تعیین

بررسی واکنش‌های پروتئین-پروتئین-پروتئین تبیین کردند. یک پروتئین آزمایش به‌عنوان یک ترکیب با یک پلی‌پپتید C-انتهایی یوبی کوئیتین بیان می‌شود که به یک پروتئین گزارشگر نیز متصل شده است. پروتئین آزمایش دوم با یک ناحیه N-انتهایی تغییر یافته از یوبی کوئیتین ترکیب می‌شود. این تغییر از پیچش صحیح N-انتهایی یوبی کوئیتین جلوگیری می‌کند و بنابراین با C-انتهایی یوبی کوئیتین همراه می‌شود. با وجود این، اگر X و Y واکنش دهند، یک مولکول یوبی کوئیتین فعال دوباره ساخته می‌شود. سیستم شکست یوبی کوئیتین به‌وسیله UBp شناسایی و پروتئین گزارشگر رها می‌شود و ژن گزارشگر بیان می‌شود (شکل ۸) (۶، ۳، ۲).

کاربردهای دیگر

سیستم مخمر دوگانه روشی بررسی واکنش‌های پروتئین-پروتئین را تغییر داده است. پژوهشگران در حال پیگیری روش‌های استفاده از این فناوری برای مطالعه واکنش‌های پروتئین‌ها با مولکول‌های دیگر، مانند اسیدهای نوکلئیک، و نیز مطالعه واکنش‌هایی بین بیش از دو پروتئین هستند. یک مسیر تکاملی، فناوری سیستم تک‌گانه در مخمر^{۳۶} است که برای بررسی واکنش‌های پروتئین-DNA طراحی شده است. اساس سیستم تک‌گانه مشابه با سیستم دوگانه است که واکنش بین یک طعمه و صید در محیط داخل بدن تعیین می‌شود. اما در مورد سیستم تک‌گانه طعمه یک توالی DNA شناخته‌شده است که پروتئین‌های اتصال را تعیین

36-Yeast One-Hybrid System 37-RNA Yeast Three-Hybrid System



شکل ۹: روش سیستم سه گانه RNA مخمر: RNA همراه با MS2RNA به ناحیه اتصال به DNA و پروتئین موردنظر به ناحیه فعال کننده عامل رونویسی متصل می‌شود. در صورت واکنش، ژن بیان می‌شود (A). ساختار دو ساقه RNA (Stem-loop) استفاده شده در آزمایش (B)؛ واکنش پروتئین و RNA با استفاده از فعالیت β-گالاکتوزیداز مشخص شده است (C)؛ تعیین واکنش با استفاده از رشد روی محیط فاقد هیستیدین (D) (۱۸).

۳. تعیین اهداف دارویی جدید

۴. درک بیشتر پیچیدگی یک فرایند زیست‌شناختی

تا امروز با استفاده از آزمایش دوهیبرید، PIMها در مقیاس ژنوم، برای ویروس T7، اشرشیا کلی، واکسینیا ویروس^{۴۰}، مخمر جوانه‌زننده ساکارومایسس سروزیه، هلیکوباکتر پیلوری^{۴۱} و کائوره‌بادیتیس الگانس^{۴۲} به دست آمده است. اولین ژنوم یوکاریوتی که توالی آن به طور کامل تعیین شد، ساکارومایسس سروزیه بود و به دنبال آن اولین بررسی جامع واکنش‌دهنده‌ها در یک سلول انجام شد (۲).

سیستم‌های دوگانه دیگر

امروزه تعدادی از سیستم‌های دوگانه بر اساس سلول‌های باکتری‌ها و پستانداران طراحی شده است. اصول این سیستم‌ها با آنچه در سیستم مخمر استفاده می‌شود، یکسان است (۴ و ۶). در سیستم‌های بر اساس سلول باکتری، یک پروتئین با پروتئین C1 باکتریوفاژ لامبدا و دیگری با ناحیه آمین انتهایی زیرواحد آلفا RNA پلیمرز ترکیب می‌شود. واکنش بین دو پروتئین باعث اتصال RNA پلیمرز به پروموتور و بیان ژن‌های مقاومت به آمپی‌سیلین و LacZ می‌شود. مزیت اصلی سیستم باکتریایی

نقش PEX19P در پراکسیزوم، به‌عنوان شریک اتصال به PEX3P توسط قاندهی و همکاران یاد کرد. PEX16 و PEX19 در مراحل اولیه تجمع غشاء پروکسیزوم دخیلند (۲۰). در سال ۲۰۰۰، قاندهی و همکاران و نیز شیموزاوا و همکاران نشان دادند که پروکسین Pex3p هم در دخول پروتئین‌های ماتریکس و هم در مراحل اولیه تجمع غشاء پروکسیزوم نقش دارند (۲۱ و ۲۰).

نقشه واکنش‌های پروتئین در مقیاس ژنوم

با تکامل تکنیک دوگانه، کاربردهای متنوعی مانند تحلیل مولکولی واکنش‌های پروتئین-پروتئین شناخته و شرکای واکنش‌دهنده جدید شناسایی شده است. اما با در دسترس بودن توالی‌های DNA کامل برای بیشتر ژنوم‌های یوکاریوتی و پروکاریوتی، باید برای درک بهتر از عمل پروتئین‌ها، روش‌هایی مطمئن در مقیاس ژنوم^{۳۸} ایجاد شود. برای رفع این نیاز در مقیاس بزرگ، از سیستم دوگانه یک موجود زنده برای تثبیت نقشه واکنش‌های پروتئین (PIMs)^{۳۹} استفاده شده است. این نقشه‌ها ممکن است شامل بیشتر واکنش‌های پروتئینی باشد که در خلال دوره زندگی کامل یک سلول روی می‌دهد. از این PIMها اطلاعات متعددی به دست می‌آید (۲۲، ۱۳، ۷، ۳، ۱):

۱. آشکار کردن اعمال پروتئین‌های تعیین شده جدید

۲. تعیین خصوصیت مسیرهای متفاوت انتقال پیام و مسیرهای سوخت و ساز

38-Genome-Wide
40- Vaccinia virus
42-Caenorhabditis elegans

39-Protein Interaction Maps
41-Helicobacter pylori

نتیجه گیری

سیستم دوهیبرید ابزاری مناسب برای تعیین واکنش‌های بین پروتئین‌هاست. با این روش می‌توان توالی واکنش‌های پروتئین‌های دخیل در یک فرایند را، هرچند پیچیده باشد، تعیین کرد. مطالعات انجام‌شده نشان داده با تغییرات انجام‌شده بر روی سیستم، به طوری که موارد مثبت کاذب حذف شود، شبکه واکنش‌های پروتئین-پروتئین که در خلال زندگی یک سلول روی می‌دهد و نقشه واکنش‌های پروتئینی سلول تعیین خواهد شد و در نهایت می‌توان پروتئین‌های کلیدی مسؤوول برای تنظیم رشد سلول را تعیین کرد. همچنین می‌توان فعالیت ژن‌های ناشناخته را به‌وسیله تعیین پروتئین‌هایی که توسط آنها رمزگذاری می‌شوند، مشخص کرد. امروزه علاوه بر سیستم دوگانه بر اساس مخمر، سیستم‌هایی بر اساس باکتری و سلول پستانداران نیز در حال گسترش است.

References

1. Mukherjee S, Bal S, Saha P. Protein interaction maps using yeast two – hybrid assay. *Current Science*. 2001;81: 458-64.
2. Causier B Studying the interactome with the yeast two – hybrid system and mass spectrometry. *Mass Spect Rev* 2004;23:350-67.
3. Sobhanifar S. Yeast two – hybrid assay: A fishing tale. *BioTech Journal* 2003;1: 81-8.
4. Knudsen CA, Jadidi M, Friis I, Mansilla F. Application of yeast two hybrid system in molecular gerontology. *Biogerontology* 2002;3: 243-56.
5. Golemis EA, Serebriiskii I, Gyuris J, Brent R. Unit 17.3 interaction trap/ two – hybrid system to identify interaction proteins. *current protocols in molecular biology* [serial on the internet]. 2001. DOI: 10.1002/04711430 30. cb1703508. 20.1.1-20.1.35.
6. Causier B, Davise B. Analysing protein – protein interaction with the yeast two – hybrid system. *Plant Mol Biol* 2002; 50: 855-70.
7. Angelista C, Lochshon D, Fields S. The yeast two – hybrid system: prospects for protein linkage maps. *Trends in Cell Biology* 1996;6:196-99.
8. Uets PH, Hughets RE. The two – hybrid system: finding likely partners for lonely proteins. *Focus* 1998;20:62-4.
9. Sobhanifar S. The Yeast two – hybrid assay: an exercise in experimental eloquence. [monograph on the Internet].

43-Chloramphenicil Acetyl Transferase

44-Luciferase

نسبت به سیستم مخمر، سرعت و توان غربالگری کتابخانه‌های ژنی بزرگ‌تر است. اما چون سیستم بر اساس سلول‌های پروکاریوتی است، ممکن است سبب مشکلاتی در تغییرات پس از ترجمه شود که در برخی واکنش‌های پروتئین-پروتئین مهم است (۶). در این مورد ممکن است استفاده از سیستم دوگانه پستانداران سودمند باشد. این سیستم در سلول‌های پستانداران و با استفاده از پلاسمیدهایی که با روند همانندسازی پستانداران تکثیر می‌شوند، طراحی شده است. رایج‌ترین ژن گزارشگر استفاده‌شده در این سیستم کلرامفینیکل استیل ترانسفراز ۴۳ یا لوسیفراز ۴۴ است. عیب این سیستم فقدان توان غربالگری مقدار زیاد ترانسفکتانت‌ها است. در واقع سیستم برای تأیید واکنش‌های مشاهده‌شده در سیستم مخمر استفاده می‌شود (۴).

The Science Creative Quarterly;2003. Available from <http://www.scq.ubc.ca>

10. ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway Technology. Invitrogen corporation. C 2008. [cited 2005 Oct 24]. Available from <http://www.invitrogen.com>
11. Henn LM, Gibson N, Panisko E. Application of the Yeast Two – Hybrid System. *Methods* 1999;19:330-7.
12. Allen JB, Walberg MW, Edwards MC, Elledge SJ. Finding prospective partners in the library: the two – hybrid system and phage display find a match. *TIBS* 1995;20: 511-6.
13. Walhout AJM, Boulton SJ, Vidal M. Yeast two – hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yesat* 2000;17:88-94.
14. Dufar Y. System-Level analysis identify extensive coupling among gene expression machines. [monoyaphon the internet]. Wisconsin the aniversity of Wisconsin-madison; 2006 [cited 2006 March 10]. Available from <http://bacter.wisc.edu/Journal club.html>
15. Horizon symposia [Website on the internet]. London: Nature publishing Group. C 2004. Available from :http://www.nature.com/horizon/proteases/background/figs/searching_fl.html
16. Coates PJ, Hall PA. The yeast two – hybrid system for identifying protein – protein interaction. *J pathol* 2003; 199:4-7.
17. Kodama Y, Rothman JH, Sugimoto A, Yamamoto A.

The stem loop binding protein CDL-1 is required for chromosome condensation, progression of cell death and morphogenesis in *Caenorhabditis Elegans*. *Development* 2002;129: 187- 96.

18. Ghaedi K, Tamura S, Okumoto K, Matsuzono Y, Fujiki Y. The peroxin Pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell* 2000;11: 2085-102.

19. Sengupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S. A three – hybrid system to detect RNA – Protein interaction in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:8496-501.

20. Shimozawa N, Suzuki Y, Zhang Z, Imamura A, Ghaedi K, Fujiki Y, et al. Identification of PEX3 as the gene

mutated in a Zellweger syndrome patient lacking peroxisomal remnant structures. *Hum mol genet* 2000; 9: 1995-9.

21. Ghaedi K, Honsho M, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N, Fujiki Y. PEX3 is the causal gene responsible for peroxisome membrane assembly–defective zellweger Syndrome of complementation group G. *Am J Hum Genet* 2000;67:976-81.

22. Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y. A comprehensive two – hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *PNAS* 2001;98:4569-74.