



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDĚM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Bi9040 - Biologie kvasinek



doc. Jan Paleček, prof. Augustin Svoboda, prof. Marie Kopecká

Přednášky – časy, na IS

Cvičení – blokově (2 skupiny po 10-12)

3 termíny zkoušení (3 skupiny po 6-ti)

- Přednáška cca 15minut + 5 minut diskuse
- Dobrý úvod k tématu, výsledky a závěry (použitá literatura)
- Odborné články (z mezinárodních časopisů tj. anglické) zabývající se výzkumem kvasinek a jejich aplikací, ne starší než 5let
- Tématicky blízké diplomové práci (nikoli referát o diplomce!)
- Diskuse – vysvětlení detailů, otázky z přednášek

20.9.2012	9-10.50hod	Doc. Paleček	Úvod –historie, význam
27.9.2012	9-10.50hod	Doc. Paleček	Metody kultivace, detekce, způsoby analýzy
4.10.2012	9-10.50hod	Doc. Paleček	Genetické a molekulárně biologické metody
11.10.2012	9-10.50hod	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
18.10.2012	9-10.50hod	Doc. Paleček	Regulace transkripce, lokalizovaná exprese , hybridní systémy
25.10.2012	9-10.50hod	Doc. Paleček	Organizace chromatinu a oprava DNA
1.11.2012	9-10.50hod	prof. Svoboda	Sekreční dráhy a endocytóza
8.11.2012	9-10.50hod	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
15.11.2012	9-10.50hod	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
22.11.2012	8-12hod A7	prof. Svoboda+Doc.Paleček - Cvičení k přednášce	
29.11.2012	8-12hod A7	prof. Svoboda+Doc.Paleček - Cvičení k přednášce	
6.12.2012	10-11.50hod A7	prof. Kopecká	O podstatě buněčných stěn kvasinek
13.12.2012	8-12hod	Doc. Paleček	Zkouška

Doladit program, otázky?

Osnova přednášek

- Význam - výzkum, využití ... výskyt
- Mikrobiologie - základní charakteristiky
- Metodologie – identifikace
- Genetika
- Buněčná biologie – sekrece, buněčná stěna
- Molekulární biologie – buněčný cyklus, chromosomy
- Klinické aspekty – patogenní kmeny

Kvasinkáři

- Brno – prof. Svoboda, Dr. Krejčí, Doc. Vaňáčová ...
- Praha – Doc. Pálková, Dr. Hašek, Dr. Valášek ...
- Bratislava – prof. Tomáška, prof. Nosek, Dr. Chovanec ...
- Vídeň – Biocentrum ...
- UK – Sussex university ... prof. Nurse
- USA – prof. Botstein, Dr. Forsburg ...

Informační zdroje

Janderová & Bendová: Úvod do biologie kvasinek, nakladatelství Karolinum (1999)
... nejnovější články z časopisů Cell, Nature, Science, PNAS ... vždy uvedeny na slide

F. Sherman, Getting started with yeast, *Methods Enzymol.* **350**, 3-41 (2002):
http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/StartedYeast.html

SGD databáze: <http://www.yeastgenome.org/>

http://wiki.yeastgenome.org/index.php/Commonly_used_strains

The screenshot displays the SGD website interface. The browser window shows the URL <http://browse.yeastgenome.org/fgb2/gbrowse/scgenome/>. The main page features a search bar and navigation links. The 'Community Info' section includes links to 'Search SGD Colleagues', 'Yeast Laboratories', 'Colleague Submission/Update', 'Biosci Yeast Archives', 'Community wiki', and 'Career Resources'. A genomic browser window on the right shows a 37 kbp region with genes CEN1, ADE1, and PHO11, and a gene model below it.

Laboratoř S. Forsburg

Pombe Technology - Windows Internet Explorer

http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/plasmids.html#972

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené položky Nástroje Nápověda

pdfforge explore with YAHOO! SEARCH Search PDFCreator eBay Amazon Options

Pombe Technology - Windows Internet Explorer

http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/plasmids.html#972

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené položky Nástroje Nápověda

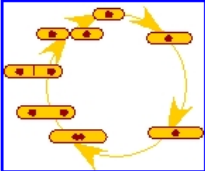
pdfforge explore with YAHOO! SEARCH Search PDFCreator eBay Amazon Options

Oblíbené položky Navrhované weby Acer Home desktop.ini Free Hotmail Galerie oblasti Web Slice Lenovo _eská republika Novorozenecká _loutenka ... Navrhované weby

Pombe Technology Macrogen Online Sequencing... I-TASSER results

Stránka Zabezpečení Nástroje

The Forsburg Lab *pombe* Pages: Working with fission yeast



This part of the Forsburg Lab website contains technical information of use to people who study *S. pombe*. Visit our [home page](#) for a directory to this pombe site, or the [list of frequently asked questions](#) for fast answers to common questions. If you want to browse practical information about working with fission yeast, you're in the right place.

Page contents

On this page:

- Commonly used selectable [markers](#).
- A note about [nomenclature](#).
- A [summary](#) of promoter activity and expression systems
- Info on [primer design](#) for amplification of open reading frames.
- How to construct plasmids for [cross-complementation](#) experiments
- [The almanac](#) of useful constants and numerical values for pombe
- [ade6 mutant alleles](#) that may be hanging out in your strains
- The "wildtype" 972: where did it come from?
- [Restriction site usage in *S. pombe* genome](#). **NEW!**
- [Protocols](#) for pombe, including flow cytometry, colony PCR, working with diploids, disruptions and integrations, DAPI staining, and plasmid shuffle. Also includes links to other protocol pages.

Other pages on our site: follow these links to find

- [Frequently asked questions](#) about working with pombe
- [PombeWeb](#), including fission yeast lab home pages, faculty listings, meetings, genomics, and all the pombe-related links we can find.
- [Community news](#), including newsbites, committee info, and postdoc ads
- An index of fission yeast [plasmids](#), including general plasmid information, sequences, and maps (the vector database).
- A list of useful [technical references](#) for fission yeast molecular genetics.
- [Genome project information](#) for fission yeast
- [Sequence analysis sites](#) including Sanger, the Blast servers and analysis tools
- [Recipes](#) for fission yeast media
- [Drugs](#) for fission yeast, including selection/counterselection and DNA damaging agents
- Want to know the equivalent *S. cerevisiae* genes for *S. pombe* cell cycle genes? Visit our new [gene conversion table](#).
- [Where to get strains and plasmids](#)

Internet 100% 9:35

- savci pili alkoholický nektar miliony let (PNAS, 2008)



- *Tana pestroocasá* pije fermentovaný nektar z květu Bertramovy palmy
- dlouhodobá konzumace fermentovaných šťáv vedla k evoluční adaptaci tohoto savce – zvýšená exprese alkoholdehydrogenázy
- autoři spekulují o vlivu takovýchto přírodních alkoholických nápojů na evoluci ... nastavení hladiny ADH u člověka ;-)

- kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* aj. rostou na substrátech bohatých na cukr
- kvasinky fermentují sladký nektar z Bertramovy palmy



... trochu historie

- přirozeně v prostředí mohou fermentovat sladké šťávy (např. nektar ...)
- lidé vyráběli nápoje podobné dnešnímu pivu a vínu již před ~9000 lety (chleba před ~4000 lety)

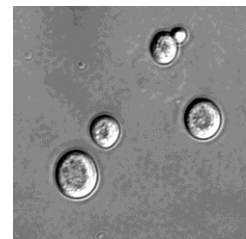


- poprvé kvasinky pozoroval A. van Leeuwenhoek v roce 1680
- název Zuckerpilz („cukerná houba“) tj. *Saccharomyces* od roku 1837 (T. Schwann)
- L. Pasteur prokázal aktivní účast při kvašení (publikoval 1866, 1876)
- první čisté kultury *S. cerevisiae* izolovány z piva (E.Ch.Hansen) a z vína (Muller-Thorgau) v 80.letech 19. století (*cerevisiae* = pivo v latině, *pombe* = pivo ve swahili) ...
- M. Rees popsal a pojmenoval *S. ellipsoideus* (fermentuje ovocné šťávy)

-první systém pro klasifikaci (patogenních) kvasinek, založený na morfologii buněk a několika fyziologických testech (fermentace monosacharidů...) vytvořil A. Guilliermond v roce 1912

- v Československu prof. Kratochvilová ...

- nejintenzivněji studovaná eukaryotní buňka (buněčný cyklus ...)
- *S. cerevisiae* první kompletně osekvenovaný eukaryotní genom (1996) (*S. pombe*, 2002; v současnosti osekvenovaných >35 druhů kvasinek)
- Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu (2001 – Nurse, Hartwell, Hunt)



Přirozený výskyt

- **ve vodě** (dle čistoty – moře 10/l, jezera 100/l, odpadní až 10^8 /l; v arktických vodách *Leucosporidium*, v odpadních vodách *Candida parapsilosis*, *S. exiguus*, fekální znečištění indikuje *Hansenula anomala*, *C. albicans*, v olejem znečištěných vodách *Candida (Yarrowia) lipolytica*, *C. tropicalis*, v planktonu v závislosti na řasách např. *Rhodotorula*)
- **v půdě** (mnohem méně než bakterií, do 15cm hloubky – *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*, schopny hydrolyticky štěpit cellobiosu, lignin nebo produkty bakteriálního metabolismu)

- naproti tomu v Antarktidě jsou dominantní (méně bakterií)
- výzkum v letech 2003-4: Izolovány 2x asco- a 16x basidiomyceta (7x nové druhy)

Conell et al., Microb Ecol 56 (2008)

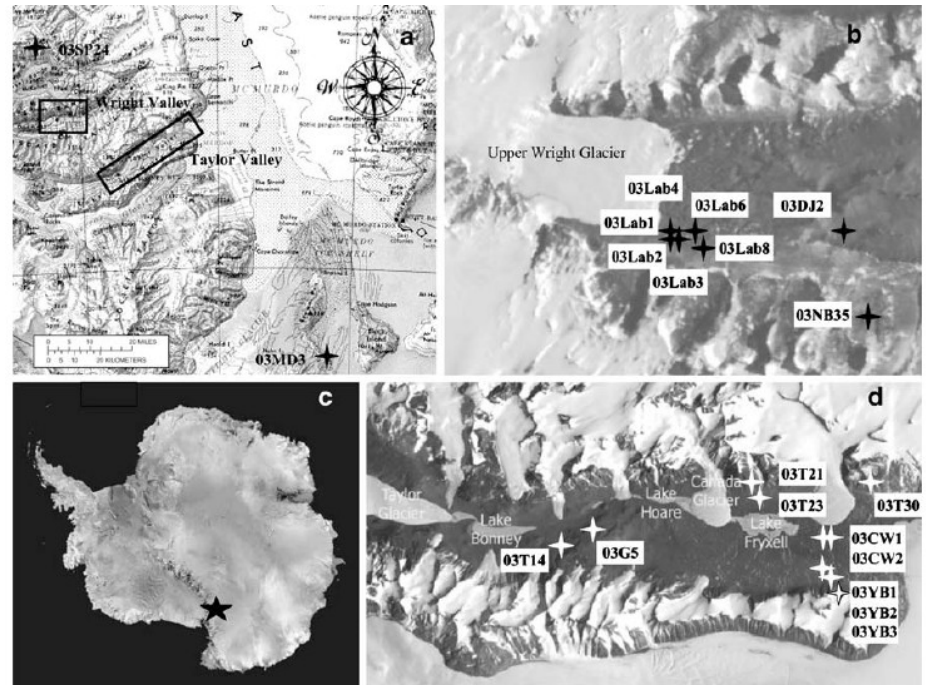


Figure 1 Sample site locations in South Victoria Land, Antarctica (2003–2004). Sites are identified by stars and labels. The entire study area with specific sites 03SP24 and 03MD3 is shown in (a). Sites in Wright

Valley are shown in (b) and Taylor Valley in (d). The location of the study area on the Antarctic continent is indicated with a star in (c)

Table 2 Species isolated from Southern Victoria Land soil

Species	Site isolated	Isolate number	GenBank accession	Closest match	Percent match
<i>Clavispora lusitaniae</i> ^a	03YB2	CBS 10625	EU149777	AY321475	99
<i>Cryptococcus nyarrowii</i>	03T21	CBS 10614	EU149778	AF400697	100
	03T23	CBS 10632	EU149780		
	03YB2	CBS 10740	DQ402536		
	03YB2	ANT 03-028	EU149779		
<i>Cryptococcus saitoi</i>	03DJ1	CBS 10631	EU149783	AF444372	99
	03Lab1	CBS 10628	EU149782		
	03Lab2	CBS 10630	DQ402537		
	03Lab6	CBS 10618	EU149781		
* <i>Cryptococcus</i> sp 1	03YB1	ANT 03-149	EU149784	AB035045	94
<i>Cryptococcus carnescens</i>	03 G5	CBS 10755	EU149786	AB035050	99
	03CW1	CBS 10634	EU149785		
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	03Lab8	CBS 10619	EU149787	AF145325	100
<i>Cryptococcus vishniacii</i>	03Lab3	CBS 10616	EU149788	AF145320	100
<i>Debaryomyces hansenii</i> ^a	03Lab1	CBS 10629	EU149790	EF222227	100
	03Lab4	CBS 10751	EU149791		
	03T23	CBS 10686	EU149789		
* <i>Dioszegia</i> sp 1	03CW2	CBS 10623	EU149792	AB049613	95
	03YB1	ANT 03-101	EU149793		
* <i>Dioszegia</i> sp	2 03CW2	CBS 10637	EU149798	AF444379	91
* <i>Leucosporidium</i> sp 1	03MD3	CBS 10633	EU149802	AF444529	87
	03T14	CBS 10684	EU149803		
	03T30	CBS 10641	EU149804		
* <i>Leucosporidium</i> sp 2	03MD3	CBS 10638	EU149805	AF444529	96
	03CW1	CBs 10639	EU149806		
* <i>Leucosporidium</i> sp 3	03MD3	CBS 10620	EU149807	AF444529	85
* <i>Leucosporidium</i> sp 4	03MD3	CBS 10636	EU149808	AF444529	97
	03YB2	CBS 10640	EU149809		
<i>Mrakia stokesii</i>	03T30	CBS 10622	EU149810	AF144486	100
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i>	03Lab6	CBS 10617	DQ402534	AF444520	100
<i>Rhodotorula laryngis</i>	03T23	CBS 10621	EU149811	AF444617	98
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	03NB35	CBS 10685	DQ402533	AF444635	99
	03SP24	CBS 10752	EU149812		

Representative isolates with ITS GenBank accession numbers are listed. Isolates currently in the CBS collection are noted using the CBS accession number. The accession number of the closest match to described species listed in GenBank are shown

^aMembers of Ascomycota

Přirozený výskyt

- **na kazících se plodech** (na spadlých plodech ... schopny hydrolyticky štěpit cellobiosu, lignin nebo produkty bakteriálního metabolismu - zahnívajcí kaktusy => pektolytické bakterie => kvasinky *Pichia cactophila*, *P. opuntiae* => přenos a výživa drosofila)
- **na listech rostlin, květech** (nektar palmy Bertramové ... červené kvasinky rodu *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces*, černá *Aureobasidium pullulans*,)
- **přenášeny hmyzem** (v zažívacím traktu mušek *Drosophila* z potravy, izolována *Metschnikowia orientalis* nalezena v květech a přenášena čmeláky na Cookových ostrovech, Int J Syst and Evol Microbiology, 2006)



- Kvasinky nalezeny ve střevě mouchy *Drosophila*
- Askus chrání spory během průchodu trávicím traktem, ale zároveň dochází k částečnému natrávení enzymy, čímž se usnadňuje kontakt mezi nepříbuznými gametami
- Bylo zjištěno, že průchod trávicím traktem 10x zvyšuje frekvenci sexuálního rozmnožování s nepříbuznými gametami
- Hypotéza, že hmyz slouží jako vektor umožňující kvasinkám osidlovat nová prostředí, přičemž zvýšená rekombinace zvyšuje šance na přežití a adaptaci na ně

Kvasinky a savci

- *Tana pestroocasá* pije fermentovaný nektar z květu Bertramovy palmy ... i člověku se dostávají kvasinky do trávicího traktu např. při konzumaci burčáku ;-))
- kvasinky tvoří jen malou část stálé mikroflóry ve střevě - méně než 0,1 % mikroflóry

- nejčastěji je z gastrointestinálního traktu izolována *C. albicans* (*C. dubliensis*)
- kůže, ústní dutina, sputum, vaginální sekrety, výtěry zvukodů, moč, stolice ...



Patogenní kvasinky

-15 druhů je potenciálními lidskými patogeny (vyvolávají onemocnění u oslabeného organismu – imunosupresiva, cukrovka ... významným faktorem virulence je schopnost tvorby biofilmu - antibiotika na eukaryota nezabírají) – více prof. Svoboda

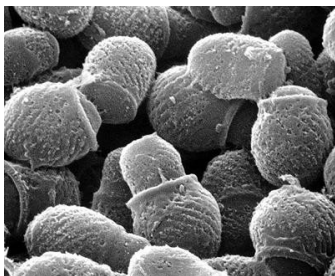
-**Kandidózy** (*C. albicans*, *dubliniensis*, *krusei*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *glabrata*, *utilis*, *lipolytica*)

-*Candida albicans* – urogenitální a krevní infekce (vyskytuje se u člověka přirozeně)

-*Cryptococcus neoformans* – 8% AIDS pacientů – plicní onemocnění až do mozku - (přenáší švábi a holubi – kreatinin z trusu používají jako zdroj dusíku)

-*Malassezia* – poruchy pigmentace kůže a lupy tzv. **pityriázy** (*M. furfur*, *globosa*, *japonica*, *obtusa*, *restricta*, *yamatoensis*, *dermatis*, *slooffiae*, *sympodialis*, *nana*, *pachydermatis*)

-3 druhy *Trichosporon* (kůže)



Malassezia furfur
pityriasis versicolor



Význam pro zdraví člověka

- exprese proteinů - příprava „hepatitis B core“ antigenu, anti-thrombin proti srážení krve (*Pichia pastoris*)
- Pangamin – kvasinkové lyzáty – vitaminy, nenasycené mastné kyseliny, minerály ...
- ImmiFlex – obsahuje beta 1-3,1-6 glukany z buněčných stěn kvasinek *S.c.* – aktivují imunitní systém (neutrofily) a zvyšují tak obranyschopnost organismu



- *Saccharomyces boulardii* – izolován z čínské švesticky Lyči (1920, Henri Boulard) - používán jako probiotikum při střevních potížích (Enterol, Salutil) - ochrana proti patogenům (*Salmonella typhimurium*, *C. albicans*) – modulují imunitní systém, inhibují účinky bakteriálních toxinů a růst hyf ...

Průmyslový význam



- výroba piva, vína, etanolu a pekařského droždí (*S.c.*), různé kmeny pro spodní (*S. bayanus*) a svrchní kvašení, vinařské a lihovarské (hybridní kmeny např. *S.c.* + *S.kudriavzevii*)

- krmná biomasa (*Candida utilis*), příprava mléčných výrobků (*Candida kefir*, *Klyuveromyces lactis*), získávání ergosterolu (prekurzor vitamínu D), zdroj komplexu vitamínů skupiny B ...

- štěpení škrobu amylytickými enzymy (*Saccharmycopsis fibuligera*, *Schwanniomyces occidentalis*)

- štěpení dřevní hmoty – štěpí xylozu přímo na etanol za aerobních podmínek (*Aureobasidium*, *Candida utilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* a *Pichia stipitis*)

- odbourávání ropných produktů (*Yarrowia lipolytica*),

- sorpce těžkých kovů (odstranění znečištění)



Kov	Biosorpční kapacita (mg kovu/g suché hmotnosti biomasy)
Zn ²⁺	<i>A.nodosum</i> (25.6)> <i>P. chrysogenum</i> > (19.2)> <i>F. vesiculosus</i> (17.3)> aktivovaný kal(9,7)> <i>S. rimosus</i> (6.63)> <i>S. cerevisiae</i> (3.45)
Cu ²⁺	<i>S. rimosus</i> (9.07)> <i>P. chrysogenum</i> (8.62)> <i>F. vesiculosus</i> (7.37)> Aktivní sluge (5.54)> <i>S. cerevisiae</i> (4.93)> <i>A. nodosum</i> (4.89)
Ni ²⁺	<i>F. vesiculosus</i> (2.85)> <i>S. rimosus</i> (1.63)> <i>S. cerevisiae</i> (1.47)> <i>A. nodosum</i> (1.11)
Pb ²⁺	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (419,4)> <i>R. nigricans</i> (403,2)> <i>M. purpurea</i> (279,5)> <i>S. cerevisiae</i> (211,2)> <i>A. terreus</i> (201,1)> <i>M. inyoensis</i> (159,2)> <i>Streptomyces clavulgerus</i> (140.2)
Cd ²⁺	Protonované biomasy: <i>Bacillus lentus</i> (≈ 30)> <i>Aspergillus oryzae</i> > <i>S. cerevisiae</i> (<5)
Cu ²⁺	Rostoucí buňky: <i>S. cerevisiae</i> (7.11)> <i>K. Marxianus</i> (6.44)> <i>Candida</i> sp. (4.80)> <i>S. pombe</i> (1.27).

- GMO např. příprava bioplastů (Lu et al. JACS, 2010)

Příprava monomerů pro výrobu plastů – využití *Candida tropicalis*

- *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- mutantní kmen (Δ POX4, Δ POX5) není schopen β -oxidace a přeměňuje je oxidací na di-karboxylové kyseliny (Picataggio et al, Biotechnology, 1992)
- další mutagenézí (pomocí flp rekombinasy – viz genetika) odstranili geny dalších oxidás (4 alkohol oxidázy) a dehydrogenás (6 alkohol dehydrogenás) aby eliminovali ω -oxidaci
- nový kmen je schopen produkovat ω -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenům, bio-odbouratelné na bio-palivo)
- další modifikace kmene (integrace genů pro lipázy) by umožnilo přímé odbourávání odpadních olejů ...

