

Souhrn 2. přednášky

- Základní charakteristiky kvasinek
- Podmínky růstu
- Morfologie buněk a kolonií

Osnova 3. přednášky

- Diagnostické metody
- Analytické metody
- Kvasinkové modelové organismy

Určení (nových) kmenů v nových lokalitách



Určení kmene v klinických izolátech (odlišení patogenních kmenů *Candida*...)



Kontrola čistoty kmene pro biotechnologické procesy (*Saccharomyces cerevisiae* – pivo)

Zpracování vzorků

- zpracování vzorků:

→ z půdy: promývání v destilované vodě → homogenizace → třepačka ...

→ klinické vzorky stěrem nebo pomocí lepidivé pásky ...

a pak vyšetí na Sabouraudův agar nebo YPD médium → kultivace 3-7 dní při teplotách 22-25 °C

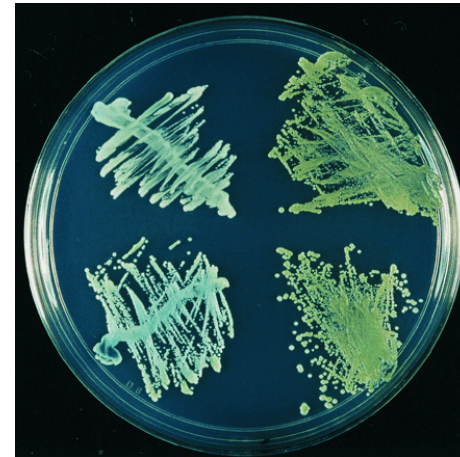


- identifikace/analýza:

fenotypové metody – morfologie kolonií, morfologie buněk, biochemické vlastnosti (fermentace cukrů, asimilace dusíkatých substrátů...), růst na chromogenních plotnách (*Candida zelená*)

- moderní metody

PCR (nested, multiple, RFLP),
sekvenační (454 technologie),
hmotnostní spektrometrie



V klinické praxi je důležitější rychlost než přesnost (při zachování správné léčby)

Tab. 1 – Nejčastěji používané metody pro identifikaci kvasinek

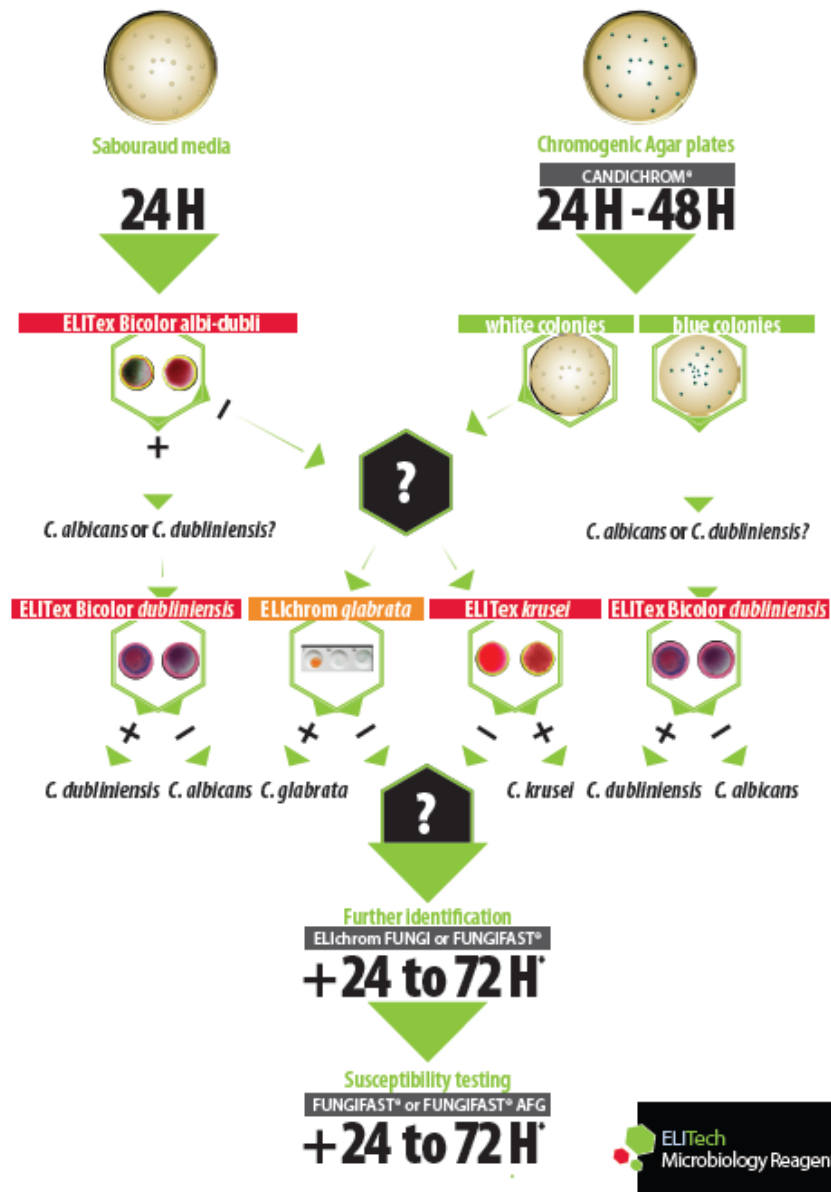
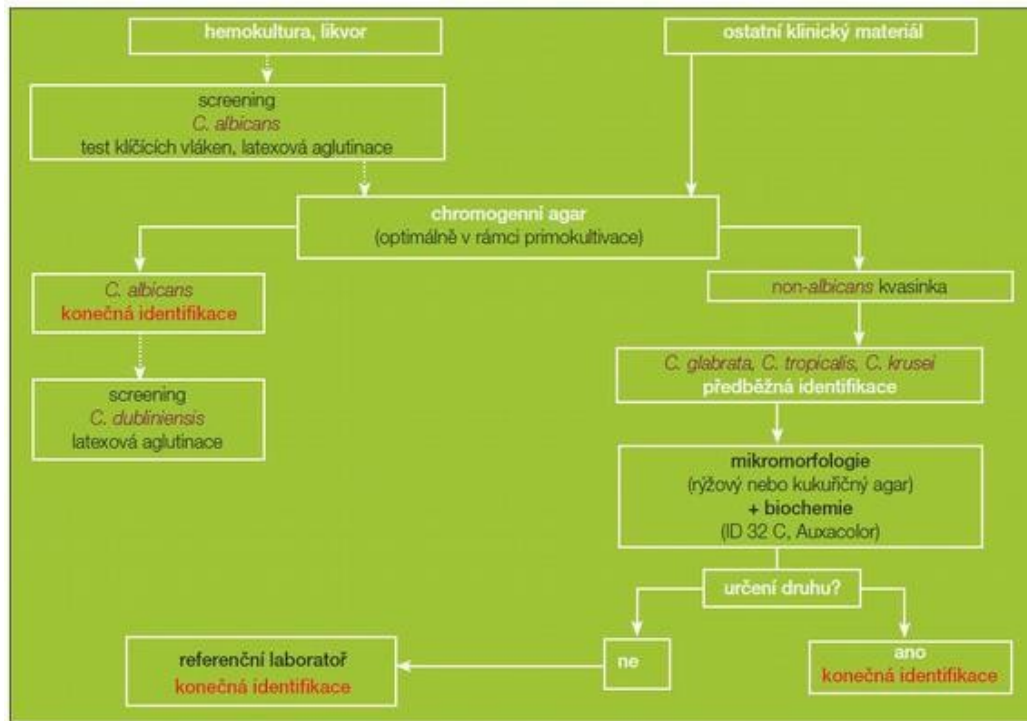
Charakter identifikace	Princip	Způsob detekce	Hodnocení
orientační	selektivní a diagnostické půdy	aktivita enzymů, produkce pigmentu	fluorescence, barevná změna
	mikromorfologie	nativní preparát	klíční hyfy
	sérologie	monoklonální protilátky	aglutinace
	enzymatické testy	aktivita enzymů	barevná změna
podrobná	mikromorfologie	nativní preparát	chlamydospory artrospory mycellum/pseudomycellum
		barvený preparát	askospory pouzdra
	biochemie	asimilace	Intenzita zákalu barevná změna
		fermentace	produkce CO ₂
	molekulární biologie	analýza DNA	FISH (fluorescence) PCR
		analýza RNA analýza proteinů	NASBA MALDI-TOF MS

FISH – fluorescenční hybridizace *in situ*, PCR – polymerázová řetězová reakce, NASBA – amplifikace založená na sekvencích nukleové kyseliny, MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrometrie „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight“

(Hamal a spol. 2010: Postgraduální medicína)

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgraduální-medicína-priloha/identifikace-kvasinek-z-klinického-materialu-prehled-soucasnych-moznosti-se-zamerenim-na-fenotypove-metody-a-komerční-produkty-455847>

Jsou k dispozici komerční soupravy pokrývající určité kvasinkové druhy



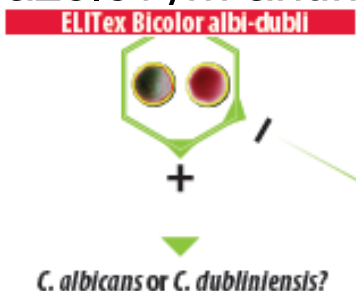
Orientační metody

- rozdělení dle způsobu pohlavního rozmnožování (asko-vřecko, basidio-stopkovýtřusé a deuteromycetes; basidiosporogenní produkují ureasu – na močovině s fenolčervení se barví červeně ...)
- Nejstarší sérologická souprava - Iatron Serological Candida Check Kit (Iatron Laboratories) - sklíčková aglutinace kandid (Kauffmann-Whiteovo schéma)

Komerční testy: identifikace *C. albicans* a *C. dubliniensis*

- Bichro-Latex Albicans (Fumouze Diagnostics) - test klíčních hyf, *C. albicans* přímo z pozitivních hemokultur
- ELITex Bicolor albi-dubli (ELITech Group)

Bichro-Dubli - rychlá detekce *C. dubliniensis* (vyšší rezistence k azolovým antimykotikům), ELITex dubliniensis



Podrobné metody

Kombinace (mikromorfologických, biochemických ...) parametrů:

- Morfologie – rozlišení jednotlivých druhů. Charakteristika tvaru, velikosti, povrchu..., asexuální a sexuální struktury,... teplotní studie....

<i>Agar</i>	<i>Basis of differentiation</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Cornmeal–Tween 80 medium; rice agar–Tween medium; Pal's medium	Chlamyospore production	Small numbers, occurred singly and attached terminally to pseudohyphae	Large numbers and arrangement in contiguous pairs, triplets or larger multiples attached to a single suspensor cell
Casein medium; Staib medium	Chlamyospore production	Chlamyospore absent	Chlamyospore abundant

<i>Phenotypic criteria</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Growth at 42 to 45°C	+	-
Growth on hypertonic Sabouraud broth	+	-

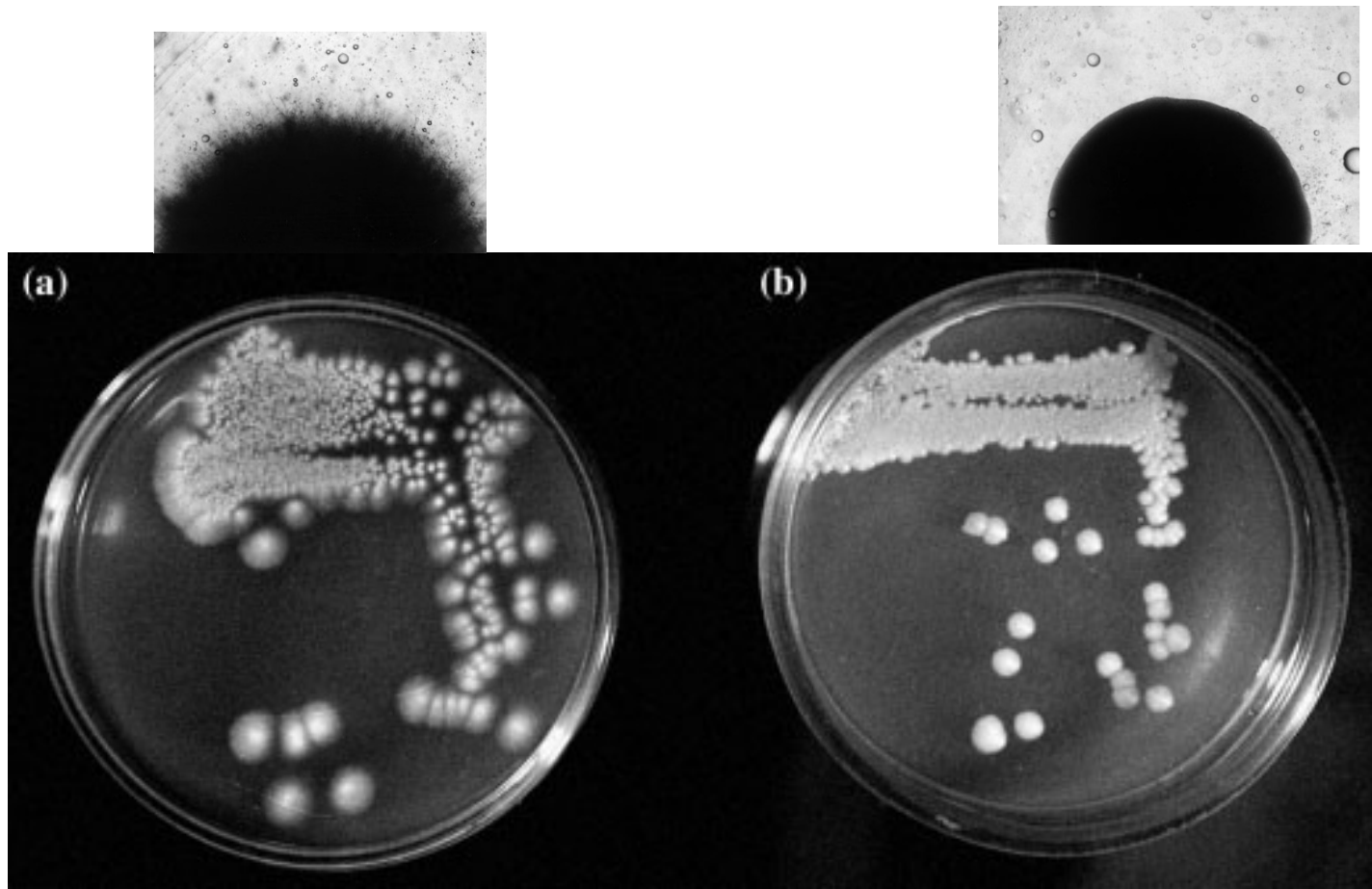
Campanha et al., 2005, Oral Diseases

C. albicans: na delších hyfách či pseudohyfách jen jedna terminální chlamydospora



C. dubliniensis: nadbytek chlamydospor na koncích krátkých pseudohyf

Mikromorfologie - Kolonie



Např. odlišení *C.d.* od *C.a.*: 24h kultivace na Staibově agaru při teplotě 37 C
(a) *C. dubliniensis* (b) *C. albicans*

Biochemické testy

- Biochemické parametry – založeny na schopnosti utilizace uhlíkatých látek (cukrů), utilizace dusíkatých látek (hydrolýza močoviny),

(např. *C. dubliniensis* není schopna utilizovat D-xylózu, D-trehalózu, methyl- α -D-glukosid –chybí β -D-glukosidázová aktivita; *C. albicans* není schopna utilizovat glycerol)

chromogení substráty

ATCC 10231(*C. albicans*) at 48 h.



ATCC 13803 (*C. tropicalis*) at 48 h.

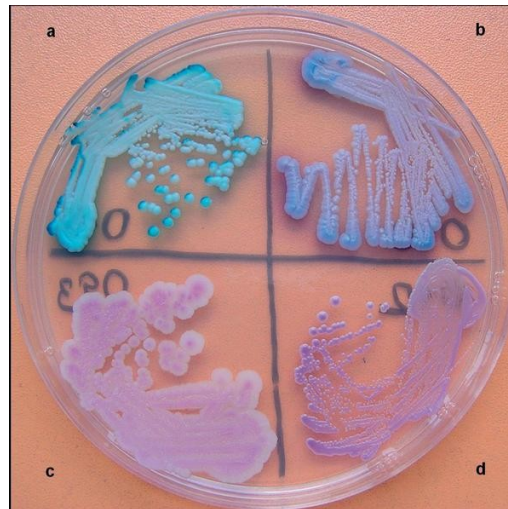


Phenotypic criteria	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Growth on glycerol	-	+
Growth on D-xylose	+	-
Growth on methyl- α -D-glucoside	+	-
Growth on D-trehalose	+	-
β -D-glucosidase activity	+	-

Agar	Basis of differentiation	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Tetrazolium salt médium	Colony color determined by the ability to reduce the tetrazolium salt	Pale pink to whitish colonies	Red to maroon colonies
Chromagar Candida (Chromagar, Paris, France; M-Tech Diagnostics Ltd, Cheshire, UK)	Colony color determined by β -N-acetylgalactosaminidase activity	Light green, light-blue or blue green colonies	Dark green colonies
Candida ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)	Colony color determined by hexosaminidase activity and other chromogenic substrate	Blue-green colonies	Dark-bluish green colonies

Selektivně diagnostické kultivační půdy

- „Zlatý standard“ – půda vyvinutá Rambachem - CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, v ČR Colorex Candida od Trios)
- předběžná identifikace čtyř druhů kandid:
 - C. albicans*
 - C. tropicalis*
 - C. crusei*
 - C. glabrata*



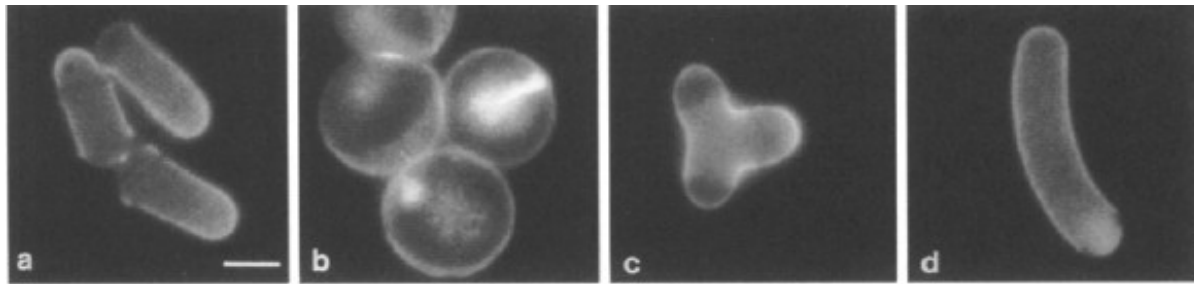
C. tropicalis
C. glabrata

Agar	Basis of differentiation	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Tetrazolium salt médium	Colony color determined by the ability to reduce the tetrazolium salt	Pale pink to whitish colonies	Red to maroon colonies
Chromagar Candida (Chromagar, Paris, France; M-Tech Diagnostics Ltd, Cheshire, UK)	Colony color determined by β -N-acetylgalactosaminidase activity	Light green, light-blue or blue green colonies	Dark green colonies
Candida ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)	Colony color determined by hexosaminidase activity and other chromogenic substrate	Blue-green colonies	Dark-bluish green colonies

Molekulární taxonomie

-konvenční taxonomie je problematická :

- morfologie kvasinek není stabilní→ roztěr a nárůst trvá několik dní (prodlužuje se včasná diagnóza ...)
- Většinu fyziologických, enzymatických ... charakteristik lze zvrátit mutací (v jediném genu)



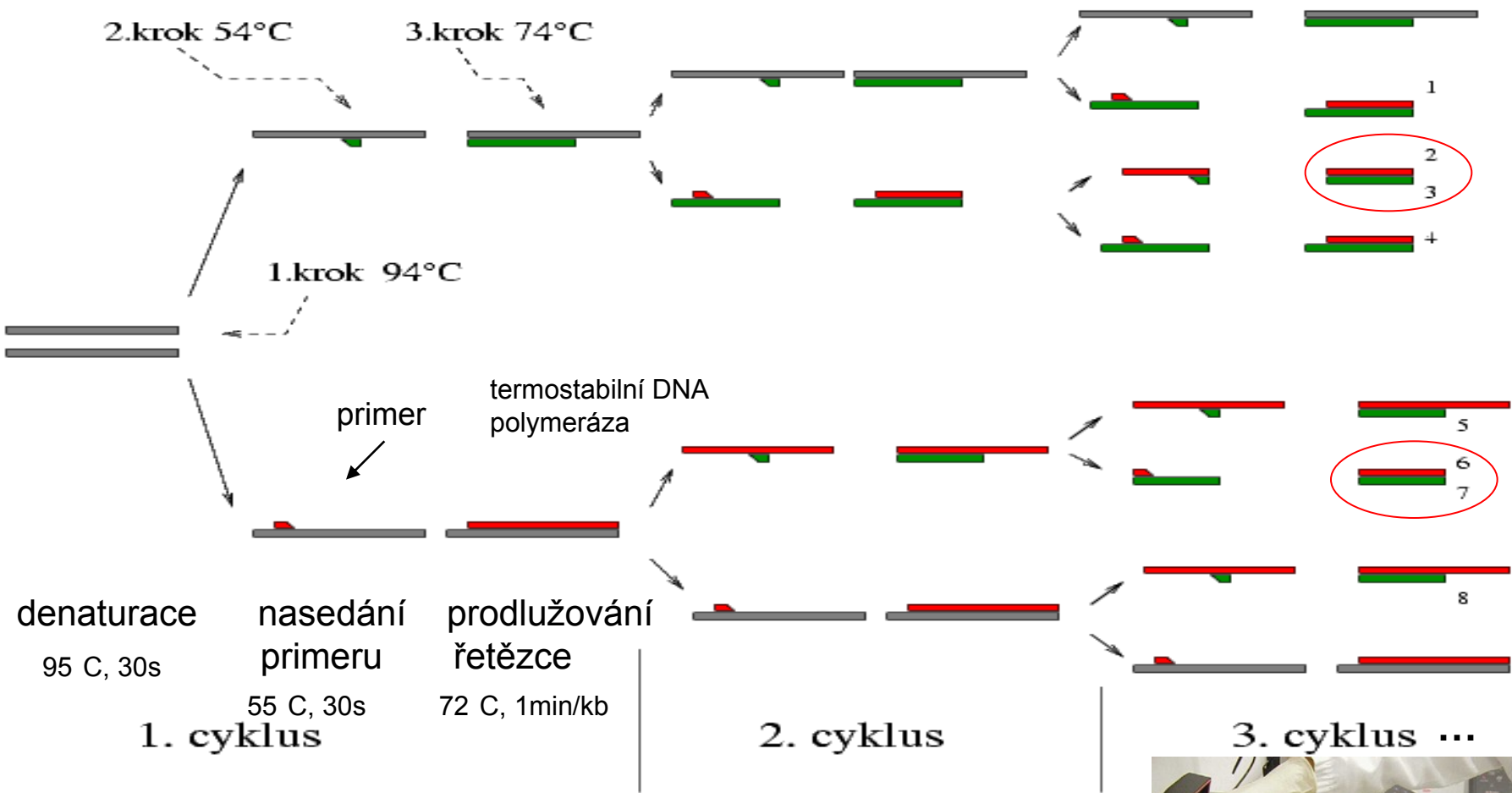
molekulární taxonomie (komerční účely - odlišit kmeny *S.c.*)

- pulsní gelová elektroforéza (PFGE), FISH (karyotyp)
- PCR, restrikční polymorfismus (odlišení druhů)
- nejnověji MALDI-TOF (taxonomie)

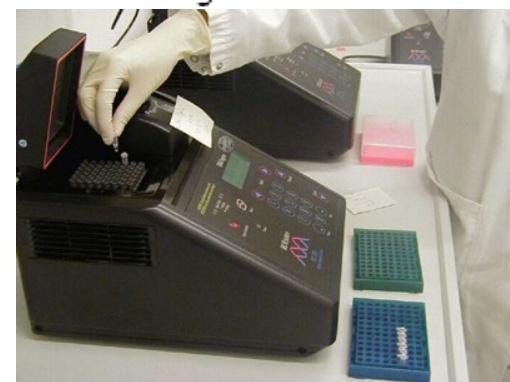
Identifikace založená na odlišnosti typických sekvencí DNA

- obtížná izolace DNA, proteinů ... z kvasinek
- je třeba nejdříve narušit silnou buněčnou stěnu ... pomocí enzymů nebo mechanicky
- poté PFGE nebo dále extrahovat DNA (např. fenol-chloroform, poté srážení etanolem)
- specifické sekvence lze identifikovat pomocí Southern blotu nebo PCR
 - izolace DNA a štěpení restriční endonukleázou -> agarozový gel -> přesátí na membránu -> sonda značená digoxigeninem (většinou se využívá sekvencí rDNA)

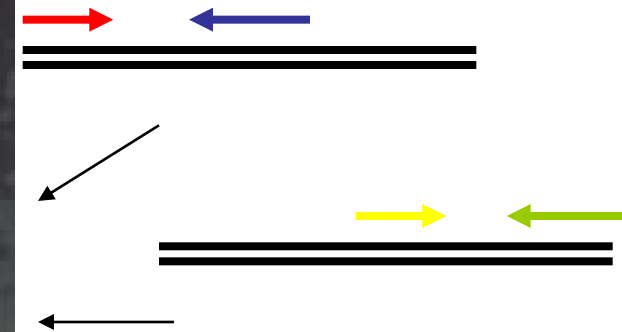
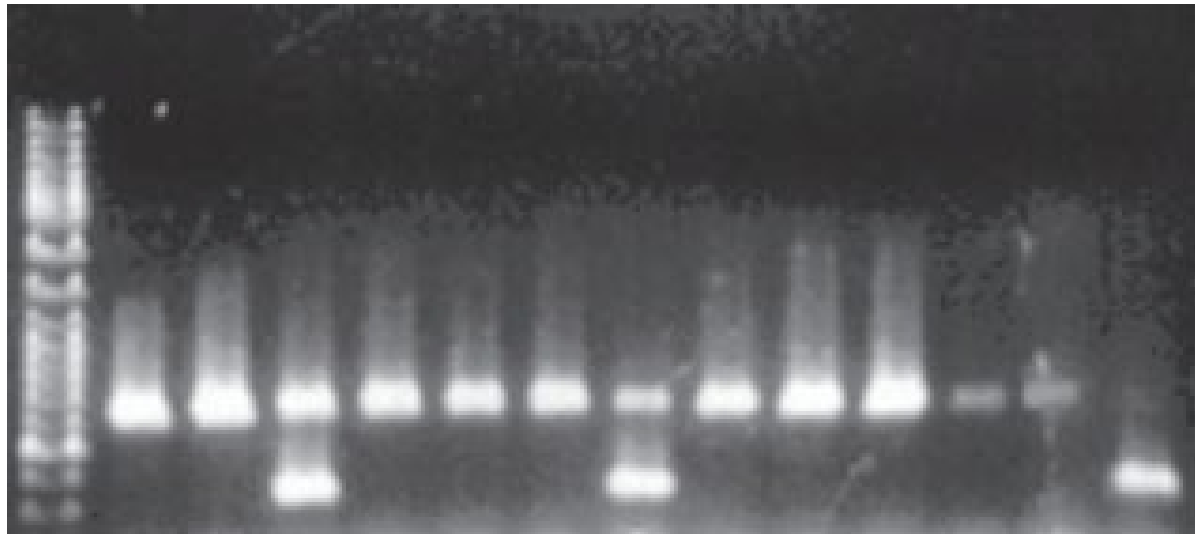
Polymerázová řetězová reakce (PCR)



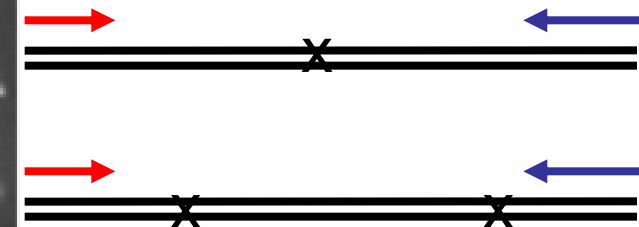
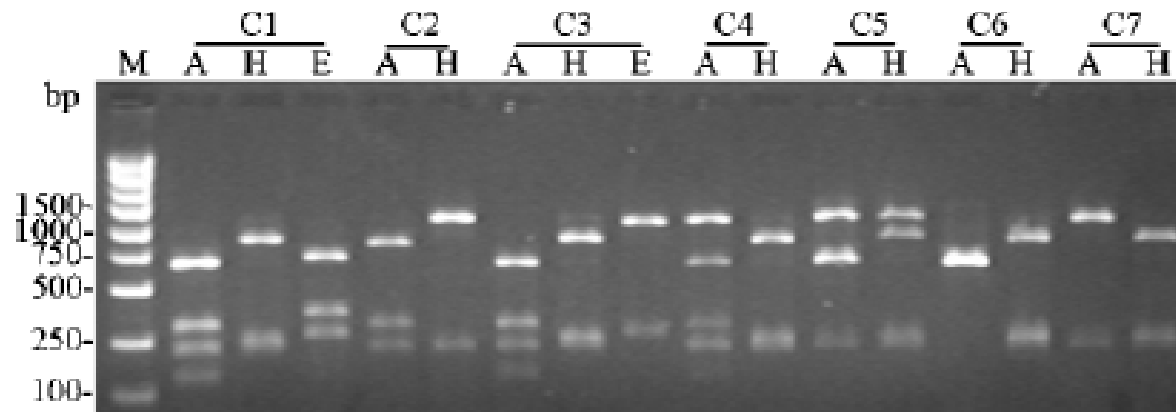
25-35 cyklů v termocykleru



- 1. sada primerů je universální kvasinková (pozitivní kontrola, vyšší proužky) a 2. sada primerů je druhově specifická (méně konzervovaný úsek DNA) - separace gelovou elektroforézou (barvení ethidium bromidem, UV transiluminátor)

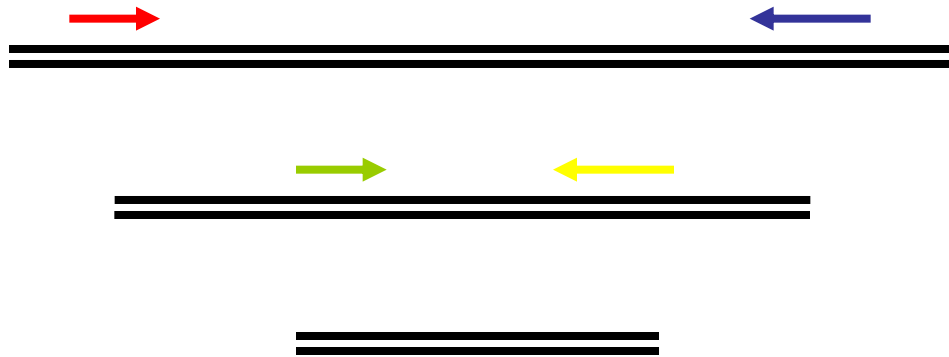


- po PCR může následovat štěpení restriční endonukleasou a odlišení druhů na základě odlišné délky štěpných produktů (tzv. **RFLP** – restriction fragment length polymorfism)



Nested („zahnížděná“) PCR

- amplifikace probíhá dvoufázově
- v 1. fázi je pomocí jedné sady primerů namnožena delší sekvence nukleové kyseliny
- takto získané amplikony jsou pak přeneseny do jiné amplifikační zkumavky obsahující druhé dvojici primerů, specifických k vnitřní oblasti úseku amplikonů
- konzervovaná intergenová oblast rDNA
- detekce gelovou elektroforézou
- eventuálně sekvenace



- 2 sady primerů, intergenová oblast rDNA

Species and primers used		Sequence (5'U 3')	Annealing temperature (°C)
<u>First PCR for six <i>Malassezia</i> species[†]</u>	Forward	ATCCTTTGCAGACGACTTGA	55
	Reverse	TGCTTAACCTCGCAGATCGG	
<u>First PCR for three <i>Malassezia</i> species[‡]</u>	Forward	ACCTGCAGAAGGATCATTAGTGA	56
	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATG	
First PCR for each <i>Malassezia</i> species			
<u><i>M. dermatis</i></u>	Forward	CGCACCTTGCGCTCCATGGT	58
	Reverse	AGCCTGGTTTCCCAGGCAGCGG	
<u><i>M. furfur</i></u>	Forward	TGTGTACCATAGGCACCCAC	58
	Reverse	CACGGTGATAAAGGGATGCA	
<u><i>M. globosa</i></u>	Forward	TCGAGTGCATACCACACTCGAG	57
	Reverse	TACGGTGCTTTCACGGTTCT	
<u><i>M. japonica</i></u>	Forward	CGTATGTGGATCTTATCCTAT	44
	Reverse	TGACTAGTGTCGTAGGCACGGTA	
<u><i>M. obtusa</i></u>	Forward	CATGGTCCATCTCCCACACA	60
	Reverse	AGAGAGTGCGTGGCGCATGGT	
<u><i>M. restricta</i></u>	Forward	CGACCTAGTCGACTACATCCTACT	55
	Reverse	TTCGGAGATAACAAGCCTCCAT	
<u><i>M. slooffiae</i></u>	Forward	ACGCACGCTAACACAACGTG	60
	Reverse	TGTGCGATTCTGAAGCGCACA	
<u><i>M. sympodialis</i></u>	Forward	CGCACCTTGCGCTCCATGGT	58
	Reverse	GGTACAATCCCCAGGCAGVAA	
<u><i>M. yamatoensis</i></u>	Forward	CGATCAAACCTTCTCTGTGTCCAG	59
	Reverse	TGTGTGGGAGGTAGAAGAGGCA	

[†]Common primers for *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. obtusa*, *M. restricta* and *M. yamatoensis*. [‡]Common primers for *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*.

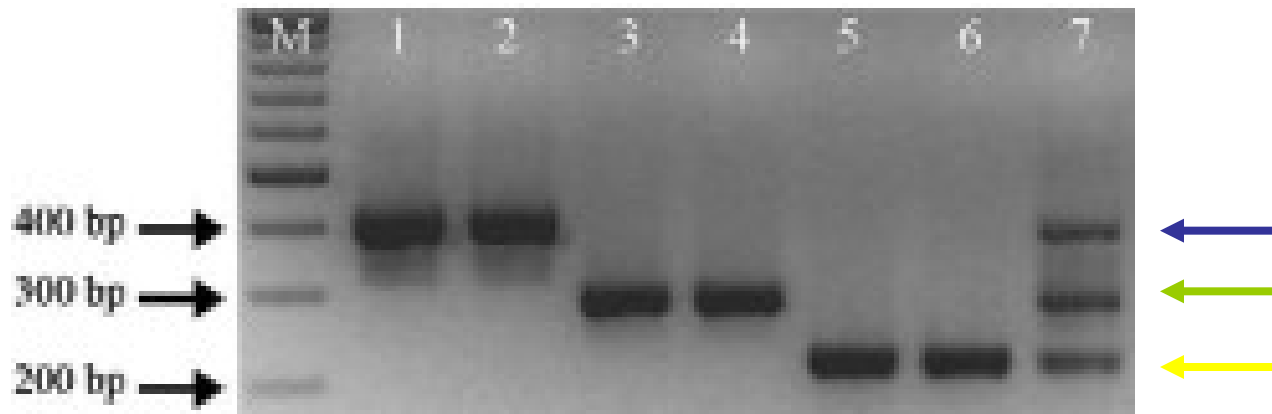
Multiplex PCR

Candida glabrata
397bp

Candida nivariensis
293bp

Candida braccarensis
223bp

univerzální
primer (konzervativní oblast 5.8S rDNA)

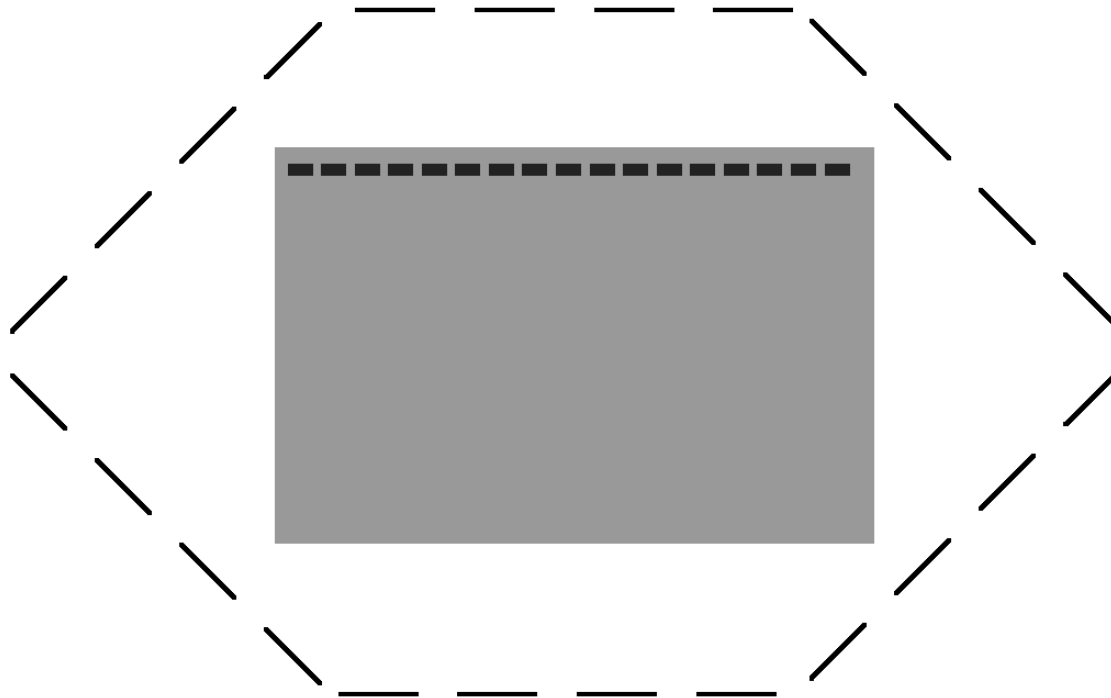


PFGE

Klasická elektroforéza dokáže rozlišit fragmenty pouze do velikosti 40-50kb
(větší molekuly se pohybují stejnou rychlostí nezávisle na velikosti)

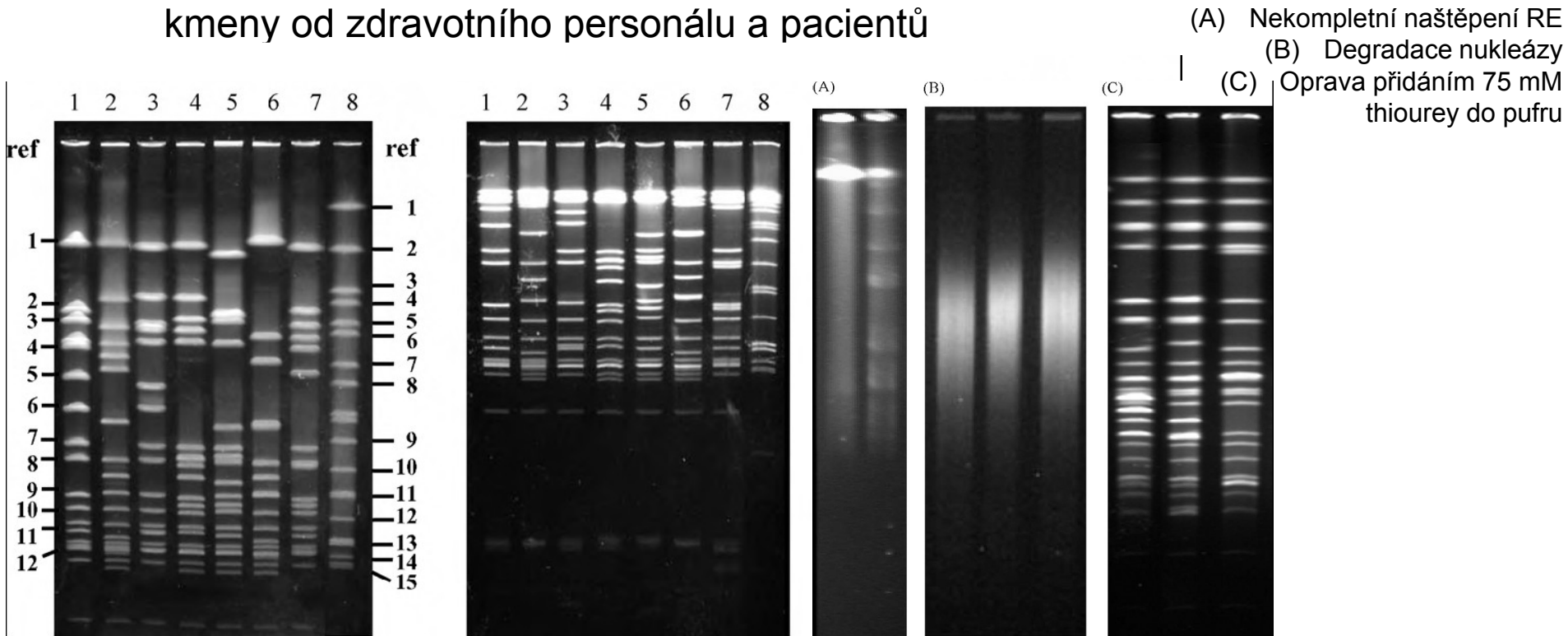
PFGE = pulse field gel electrophoresis (elektroforéza s měnícím se elektrickým polem, při změně směru elektrického pole trvá větším molekulám DNA déle, než se přeorientují - umožňuje separovat molekuly velké několik Mb)

- contoured clamped homogeneous electric field (CHEF)
- gel obsahuje vzorky DNA uvnitř agarózových bločků (minimalizace náhodných zlomů velkých molekul DNA)

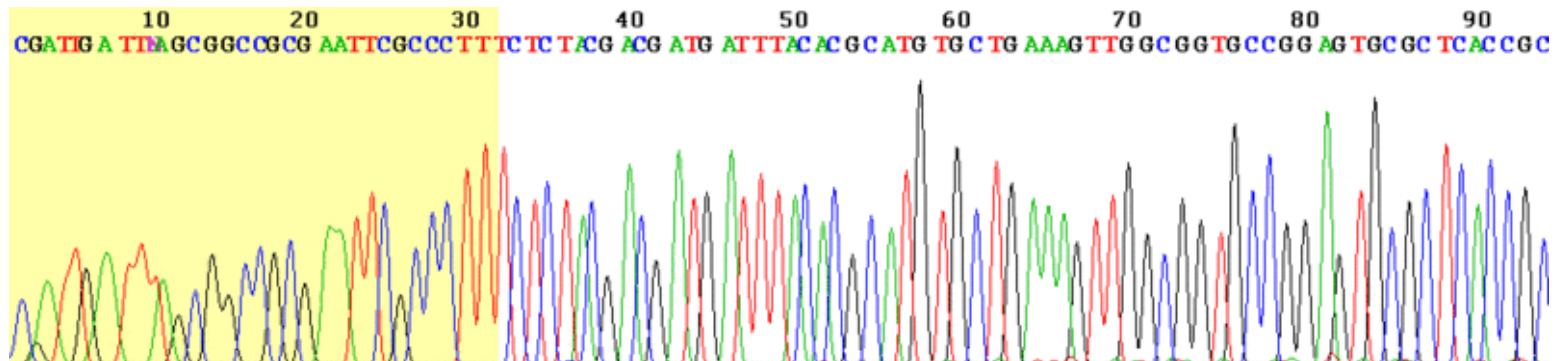
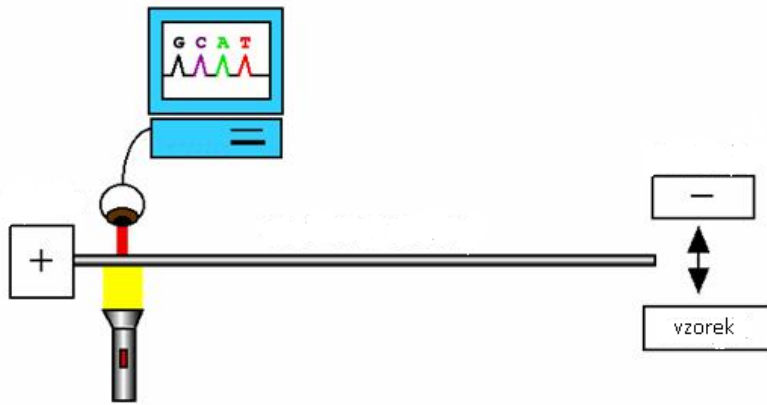


Karyotypizace

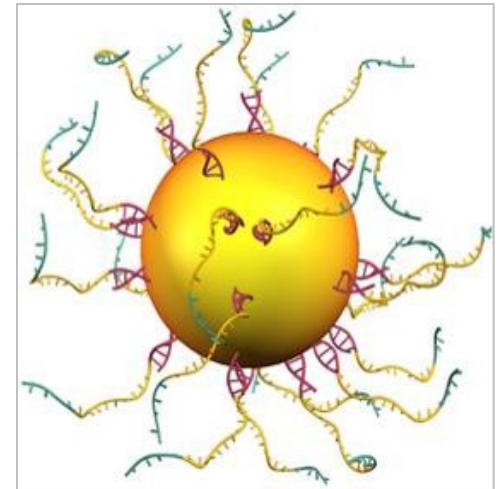
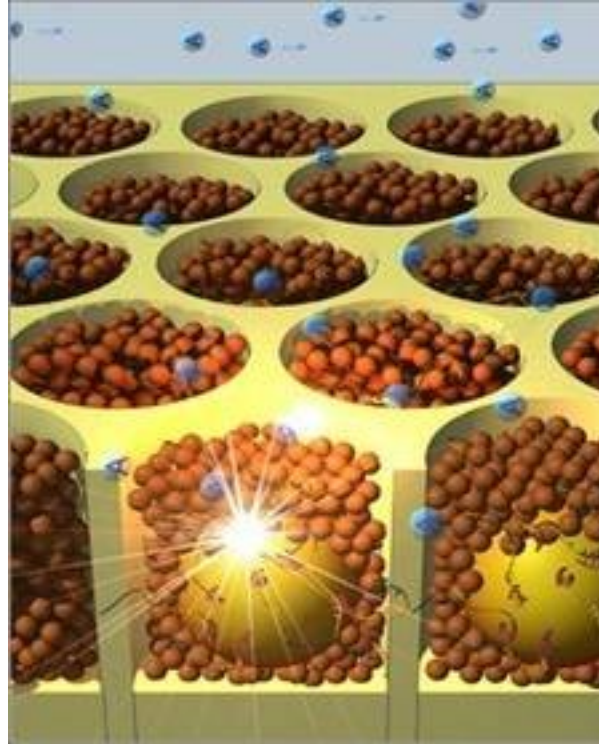
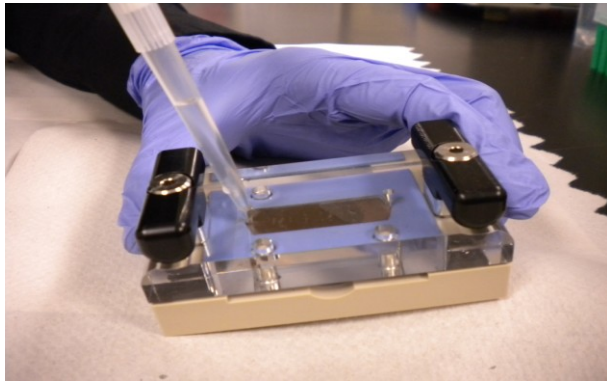
- S.c. kmeny mají podobný karyotyp – většinou se liší délkou chromosomu XII (podle počtu rDNA genů)
- Průmyslové kvasinky jsou většinou polyploidní – homologní chromosomy mají odlišné velikosti
- Srovnání kmenů pro fylogenetické účely (intaktní nebo RE naštěpené chromosomy)
- Určení příbuznosti izolátů jednoho druhu pro epidemiologické účely např. kmeny z různých míst od jednoho pacienta, kmeny od 2 různých pacientů, kmeny od zdravotního personálu a pacientů



Sekvenování



Nová generace sekvenování

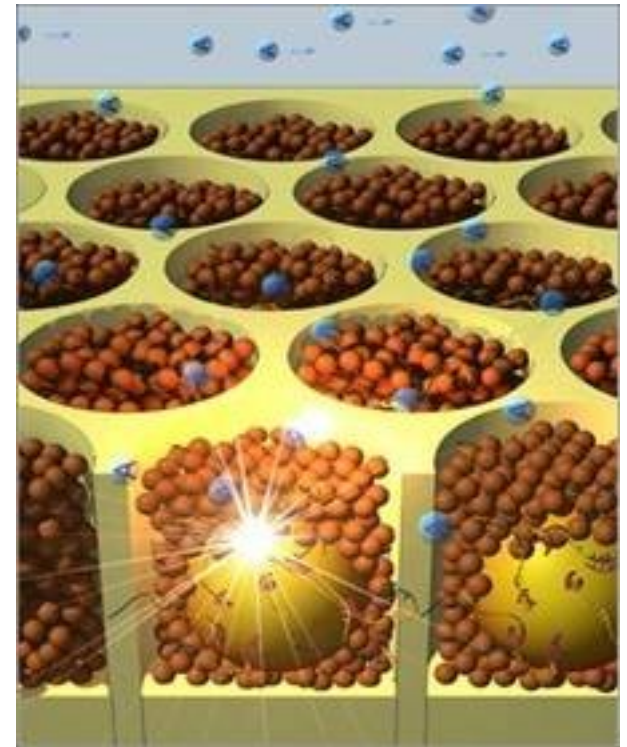
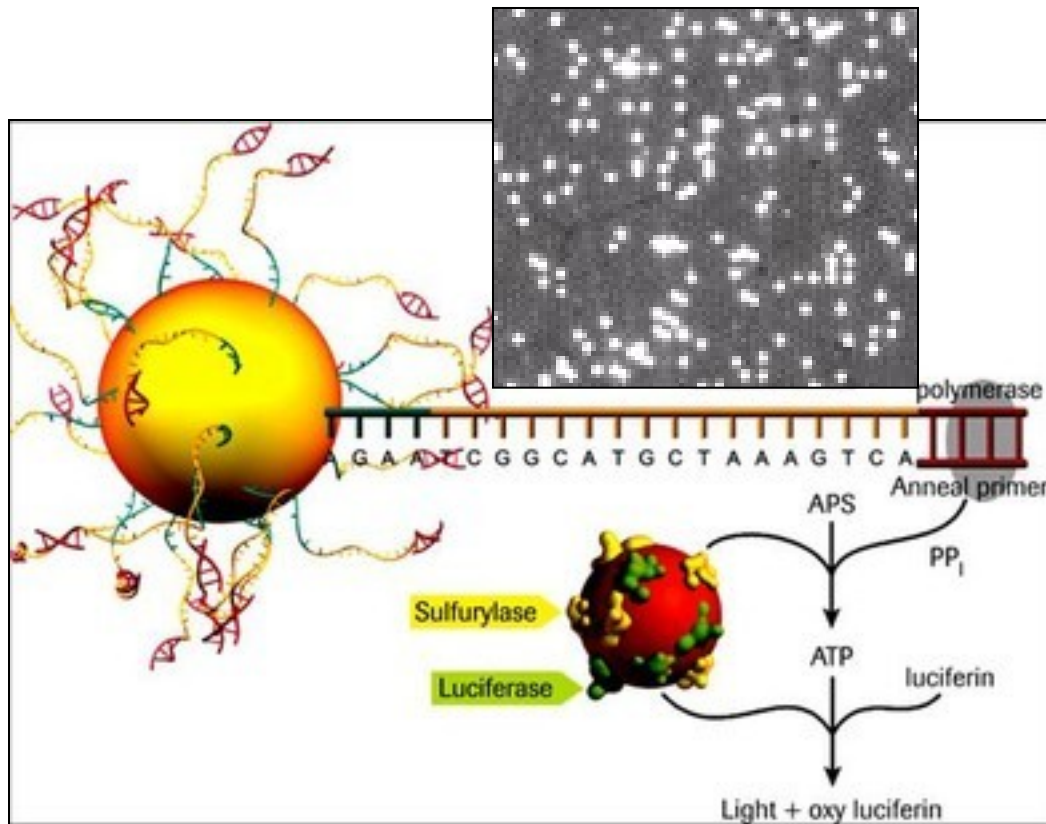


300 000 jamek každá s jednou kuličkou obsahující jedno namnožené vlákno ssDNA

Technologie 454 od firmy Roche

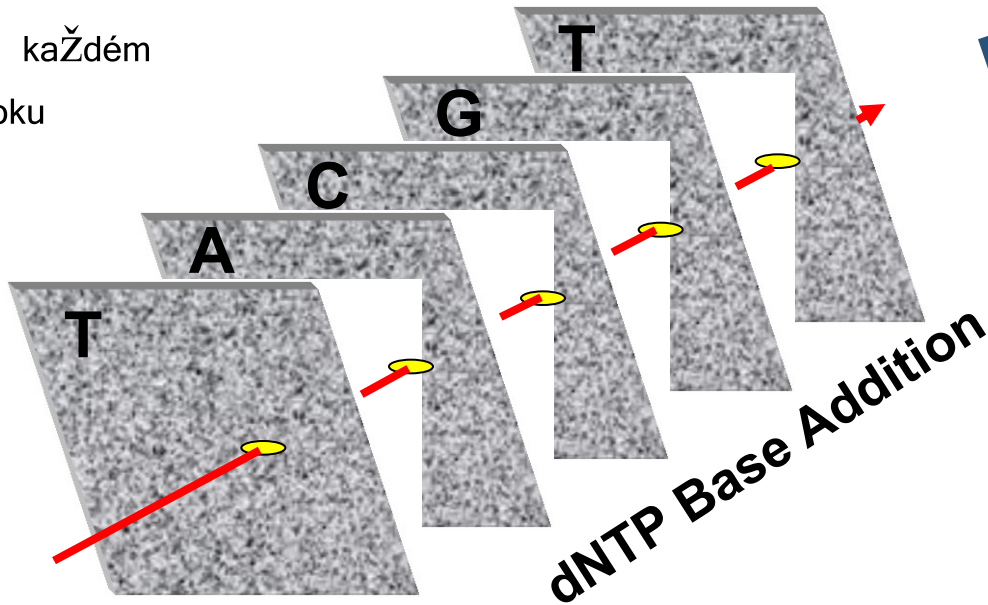
Nová generace sekvenování

Dojde k emisi světla vždy při zainkorporování komplementárního nukleotidu - nukleotid zainkorporován jako při PCR prodlužování řetězce avšak vždy je k dispozici pouze jeden nukleotid (4x opakovat – A C G T)

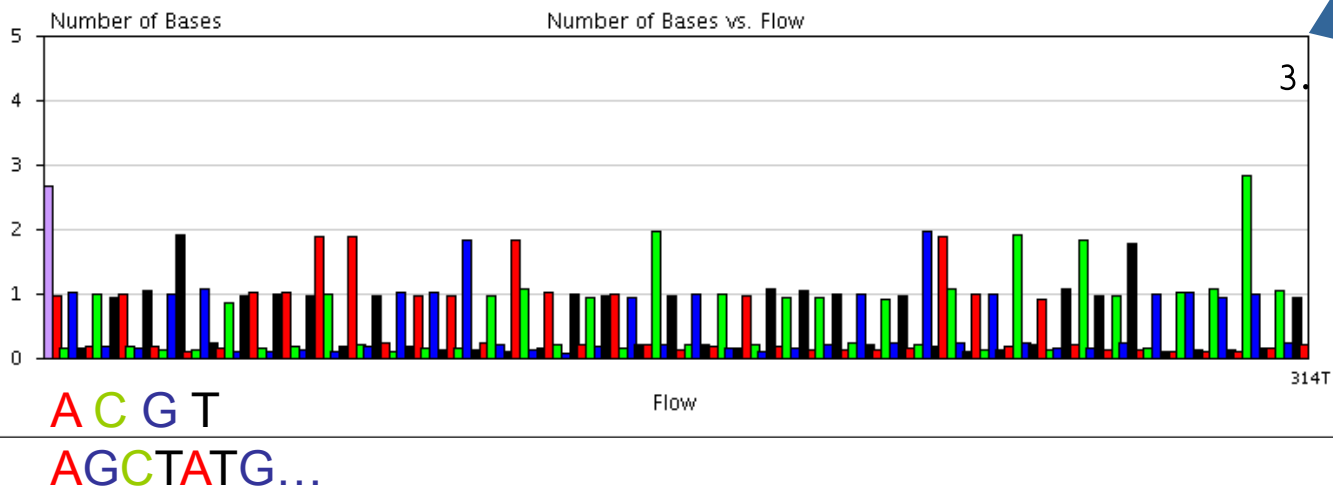


Technologie 454 od firmy Roche

1. Destička se „fotí“ v Čase po každém kroku



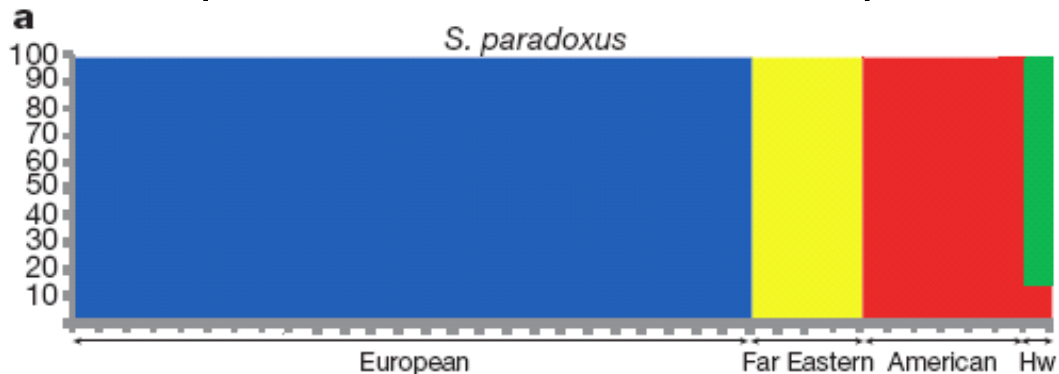
2. Snímek každé jamky se skládá do sekvence



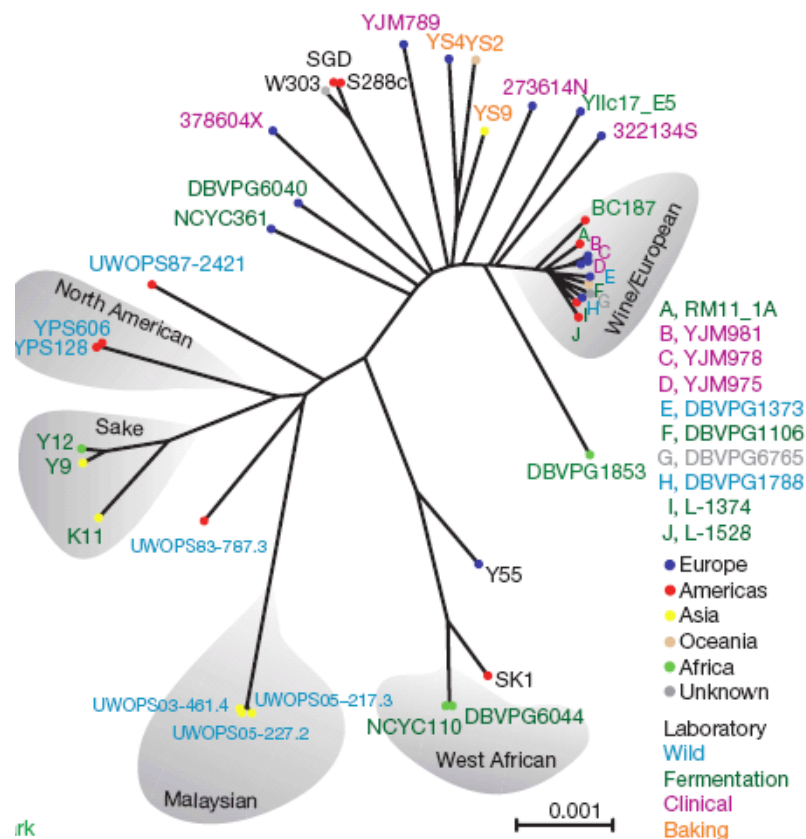
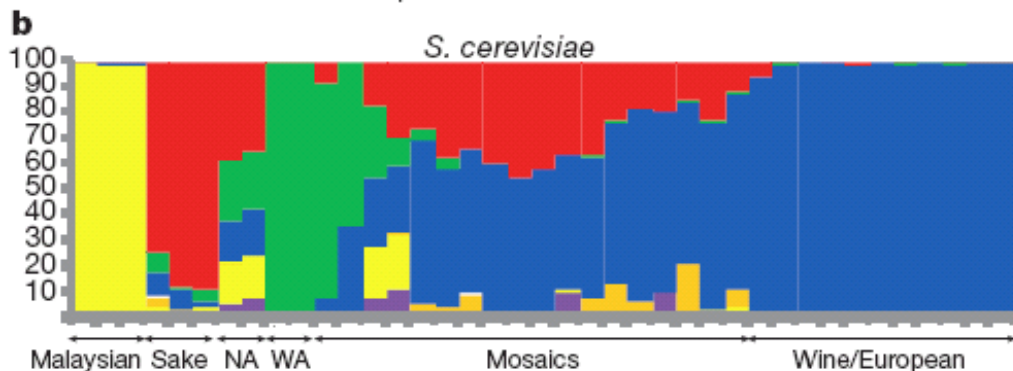
3. Síla signálu odpovídá počtu zainkorporovaných nukleotidů

Studie populací *S. cerevisiae* a *S. paradoxus*

- Sekvenace (+ hybridizace na čipech) > 100 kmenů z různých koutů světa
- *S. paradoxus* – linie izolované podle lokalit

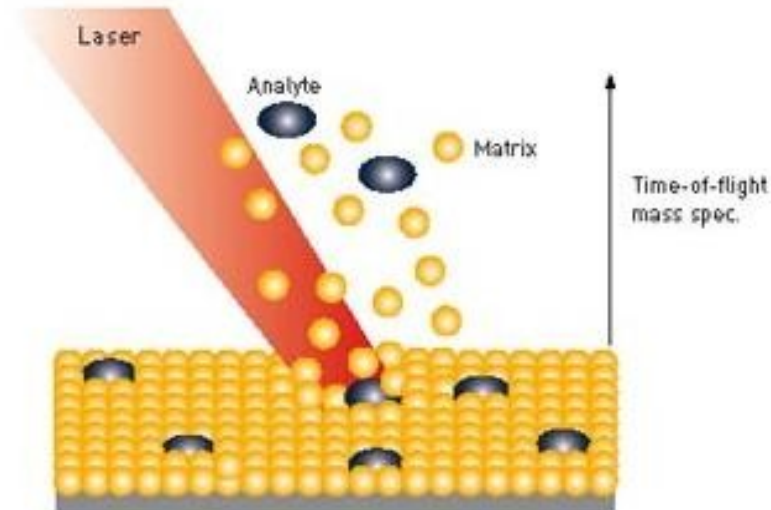


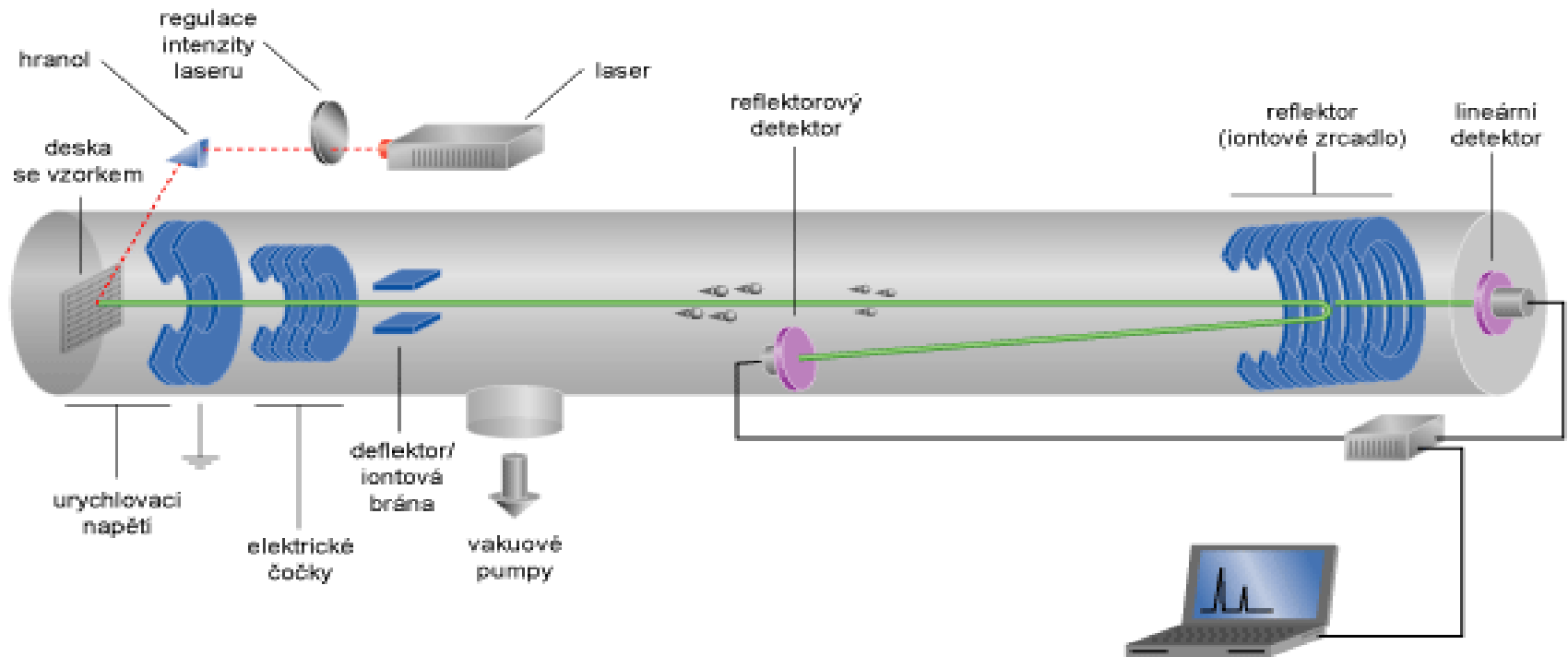
- *S. cerevisiae* - 3-4 původní linie, které se díky člověku křížily ...



MALDI-TOF

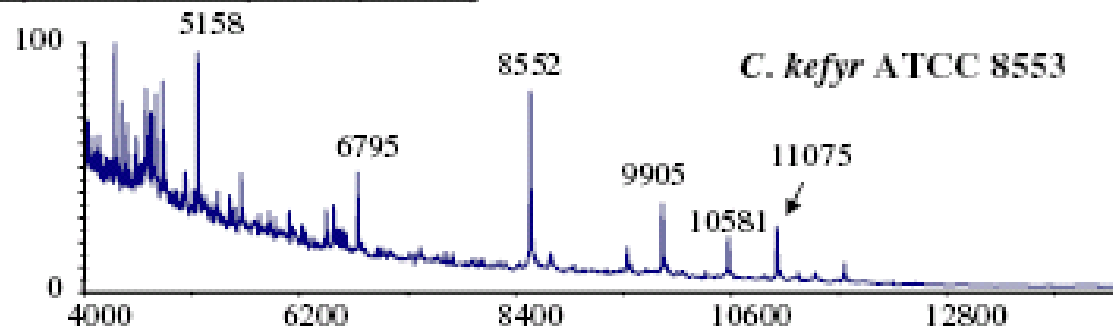
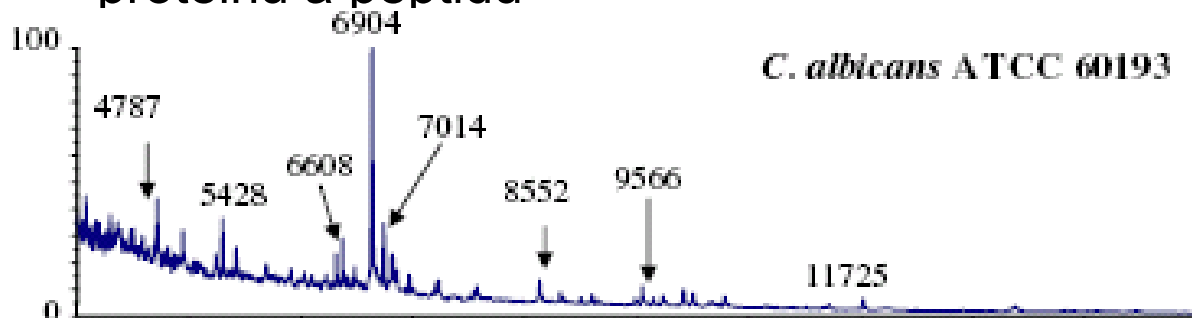
- hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)
- Umožňuje odpaření a ionizaci netěkavých látek z pevné fáze přímo do plynné
- Vzorek je smíchán s tzv. matricí (v molárním poměru řádově $1:10^{-4}$)
- Směs se nanese na speciální kovovou destičku a nechá zaschnout
- Destička se vloží do iontového zdroje a ve vakuu je ozářena pulsním laserem (UV)
- energii laserového pulsu absorbuje matrice a předá ji molekulám analytu – odpaří se





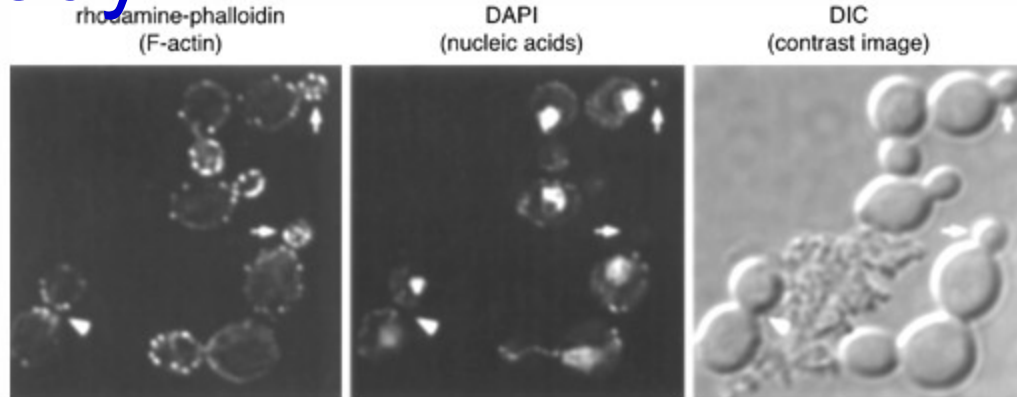
ion vstupuje do vakua v trubici detektoru - z jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje (z doby letu částice)

- MALDI-TOF hmotnostní spektrum je zobrazením četnosti ionizovatelných částic buněčného proteomu
- Charakter spektra závisí na krystalizaci a ionizačních vlastnostech vzorku → výška píku je rovna relativní koncentraci proteinu v místě ionizace
- Při srovnávání spekter druhů uvnitř rodu se hledají rodově charakteristické signály píků
- Identifikace na úroveň kmenů možná díky detekci charakteristických proteinů a peptidů

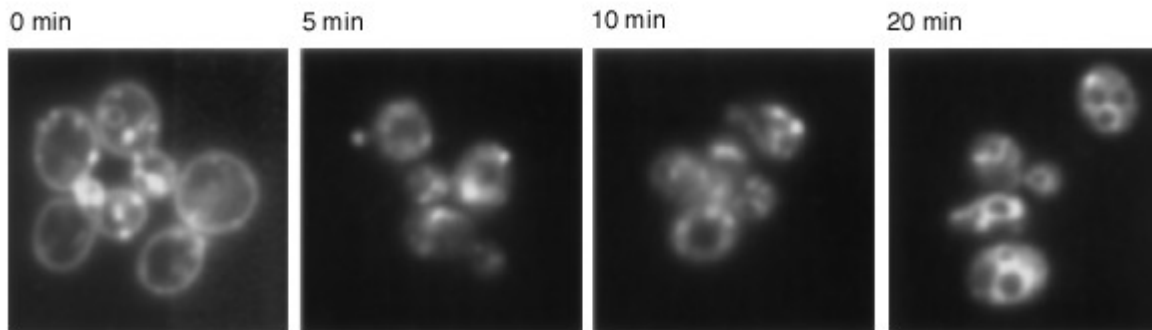
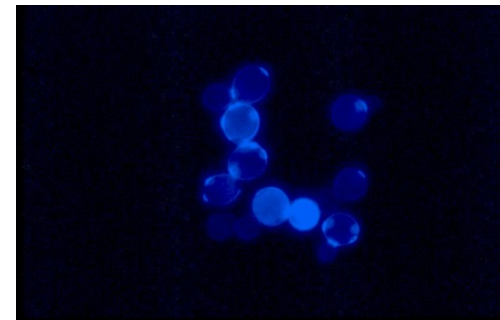


Fluorescenční metody

- Techniky barvení
 - DNA/jádro – **DAPI**
 - aktinový – **phalloidin**



- buněčná stěna – **calcofluor**
- Endocytóza ->vakuoly – **FM4-64**
- Mitochondrie, ER - **DiOC₆**
(3,3'-dihexyloxacarboyanine iodide)

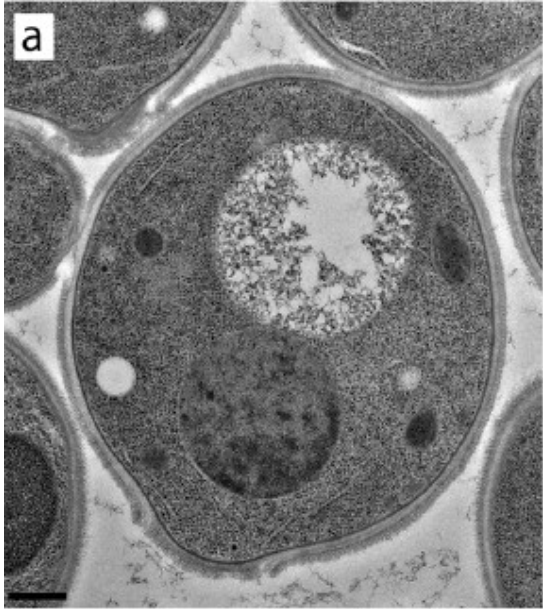


- proteiny tagované GFP (*in vivo*)

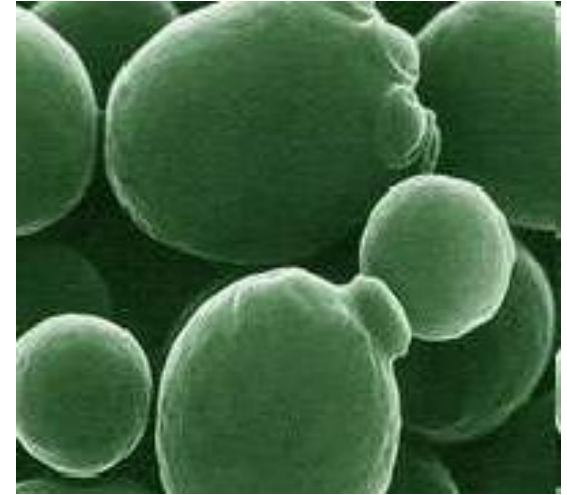
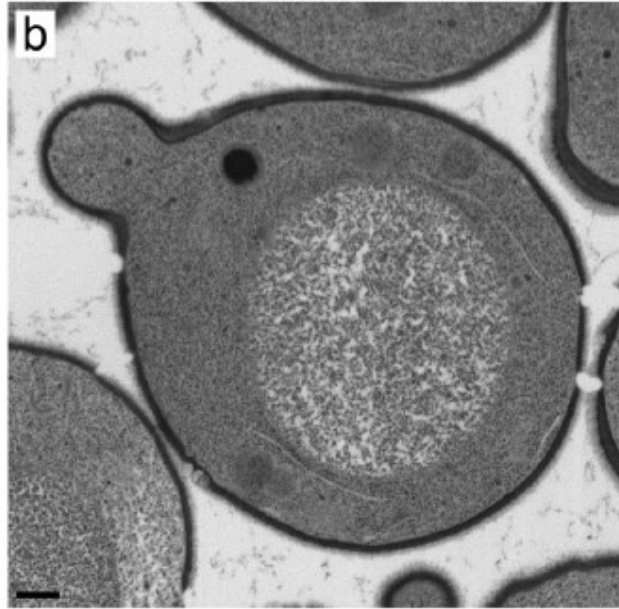
Elektronová mikroskopie

Wei, et al., BioTechniques, 2012

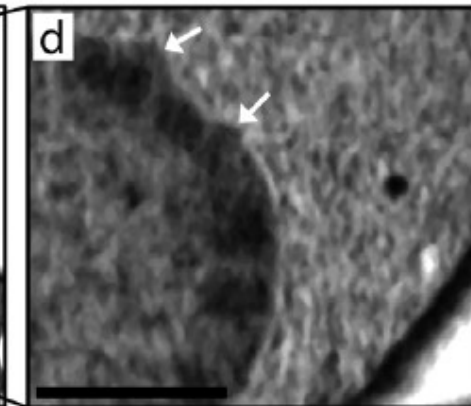
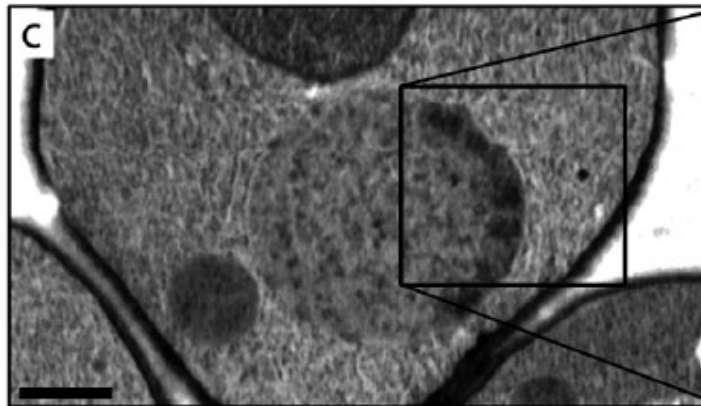
TEM



FIB - SEM



- studium buněčné stěny
... organel (sekrece ...)
více prof. Svoboda



- šipky ukazují na jaderné
póry

- vzorek „prosáknut“
epoxypryskyřicí a osmiem
- „focused-ion beam
scanning“ po 3nm

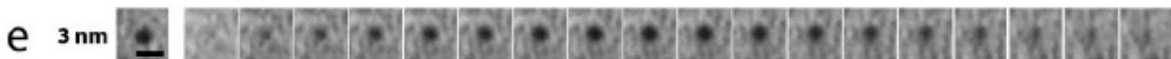
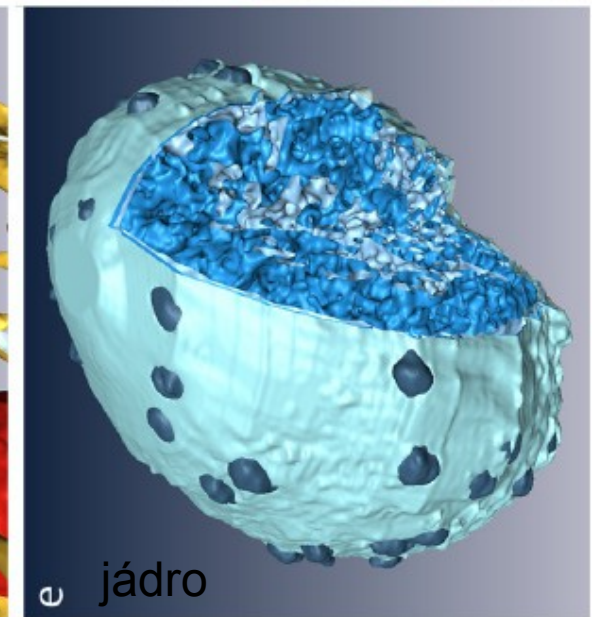
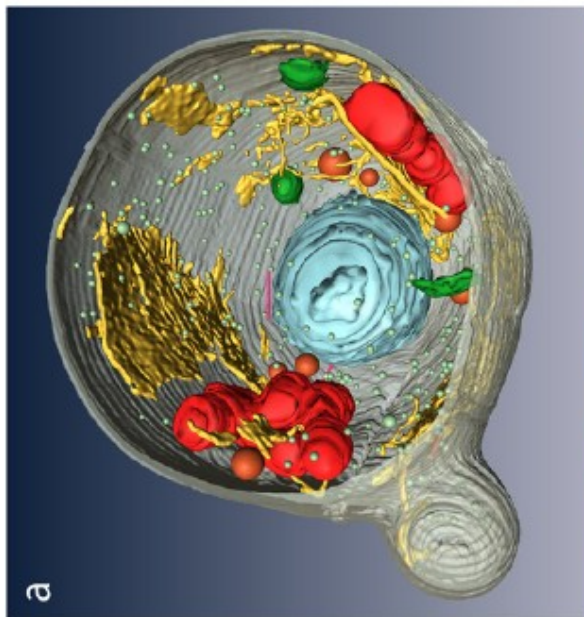
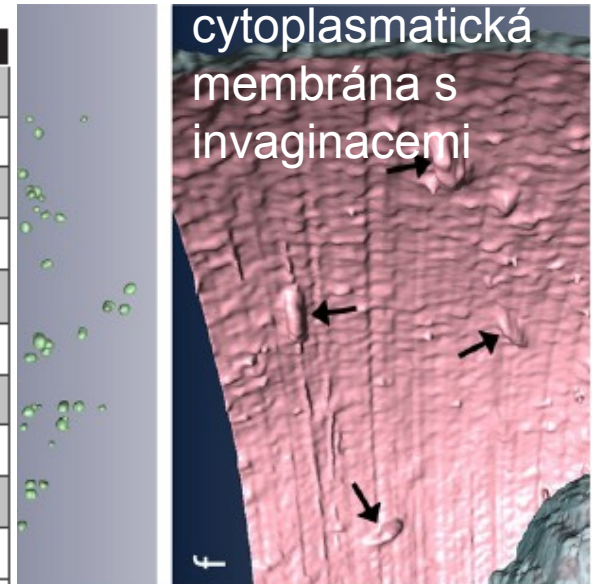


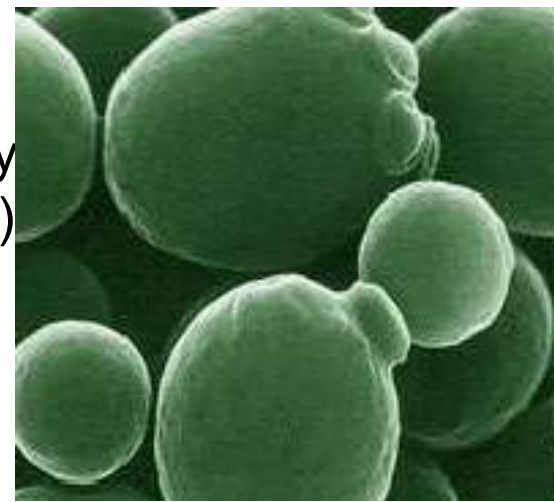
Table 1. Quantitative Analysis of Cellular Components.

Cellular component	Volume (μm^3)	Volume Percentage	Surface Area (μm^2)
Endoplasmic reticulum	0.420643	2.2%	31.403
Nuclear envelope	0.227859	1.2%	11.416
Heterochromatin	0.577432	3.0%	24.441
Euchromatin	0.459362	2.4%	20.716
Golgi	0.022677	0.1%	1.291
Mitochondria	0.299339	1.6%	6.949
Lipid droplets	0.139214	0.7%	2.692
Vesicles	0.000256	0.0%	0.025
Vacuoles	1.480174	7.8%	27.164
Cell Wall	3.017192	15.9%	67.115



Saccharomyces cerevisiae

- oválné, množí se pučením – >diploidní i haploidní buňky
- (rostou) většinou v G1 fázi (zatímco pombe je v G2 fázi)
- Genom 12 Mbp na 16-ti chromosomech
- Krátké centromery a ARS (100bp)
- Kóduje cca 6 275 genů (5 800 je funkčních)
- 120 kopií rRNA, 262 tRNA
- Geny reprezentují 75% celkové sekvence (kompaktní)
- <5% genů obsahuje introny (0.5% genomu), 3% transposony (46% u člověka)



Schizosaccharomyces pombe

- podlouhlé, množí se dělením - většinou haploidní buňky
- Pouze 3 kondenzované chromozomy (13 Mbp)
- Velké repetitivní centromery (40-100kb) a 1kb počátky replikace
- Má geny pro heterochromatin (*S.c.* nemá)
- Asi 4800 kodujících genů (nejméně u eukaryot)
- z nichž 43% má introny
- 50 genů má homologie s geny lidských nemocí

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

<http://www.sanger.ac.uk/modelorgs/yeast.shtml>

<http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/>



Pichia pastoris

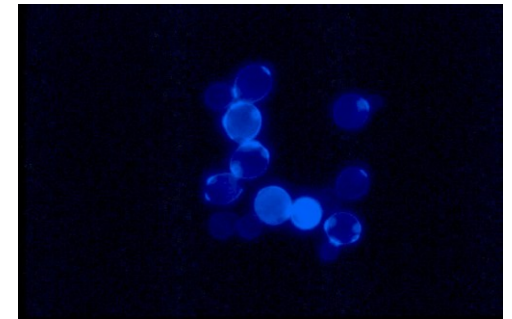
- Metylotrofní kvasinka (schopná růst na metanolu jako jediném zdroji uhlíku)
- Metanol je odbouráván v 1.kroku alkohol oxidázou (AOX1)
- P_{AOX1} je silný promotor (5% celkové RNA) – represe glukózou a indukce
- Podobné geny jako *Saccharomyces cerevisiae* (stejná nomenklatura, schopnost komplementace)
- 10-100x vyšší exprese heterologních proteinů (až 30% celkového proteinu)
- Vytváří kratší glyko řetězce (8-14 manosových zbytků – podobné vyšším eukarytům; *S.c.* 50-150 manosových zbytků - více imunogenní)

Výhody kvasinkového modelu

- Rychle se množící **EUKARYOTNÍ** mikroorganismy (90 min/dělení, 25-30°C)
- Vytváří kolonie na plotnách - mikrobiologické metody (otiskování ploten, kapkový test)

=>toxiny v plotnách – HU, MMS ...)

- Stabilní haploidní i diploidní formy
- Haploidní buňky lze křížit na diploidní (heterozygotní mutanty)
- Diploidní buňky lze sporulovat a využít pro genetickou analýzu (tetrádová analýza)
- Lze transformovat DNA (plasmidy i lineární)
- Centromerické a multicopy plasmidy
- Vysoká frekvence homologní rekombinace (lineární DNA)
- Lze připravovat deleční a mutantní kmeny
- Vydrží v >15% glycerolu na -70°C „indefinitely“



- Techniky barvení (např. aktinový cytoskelet = phalloidin, buněčná stěna = **calcofluor** + **GFP *in vivo***)
- Techniky synchronizace buněk

- *S.c.* má kompaktní genom – knihovny s genomovou DNA (ne cDNA)
- Kompletně osekvenovaný genom (genomové aplikace)
- EuroFan projekt – delece všech *S.c.* genů (+GFP, +2-hybrid)
- Mikročipy - expresní profily za různých podmínek

- Řada životních dějů má analogii v procesech v savčích buňkách (lidské geny testovány v kvasinkách - nemoci, metabolismus, regulační mechanismy)

