

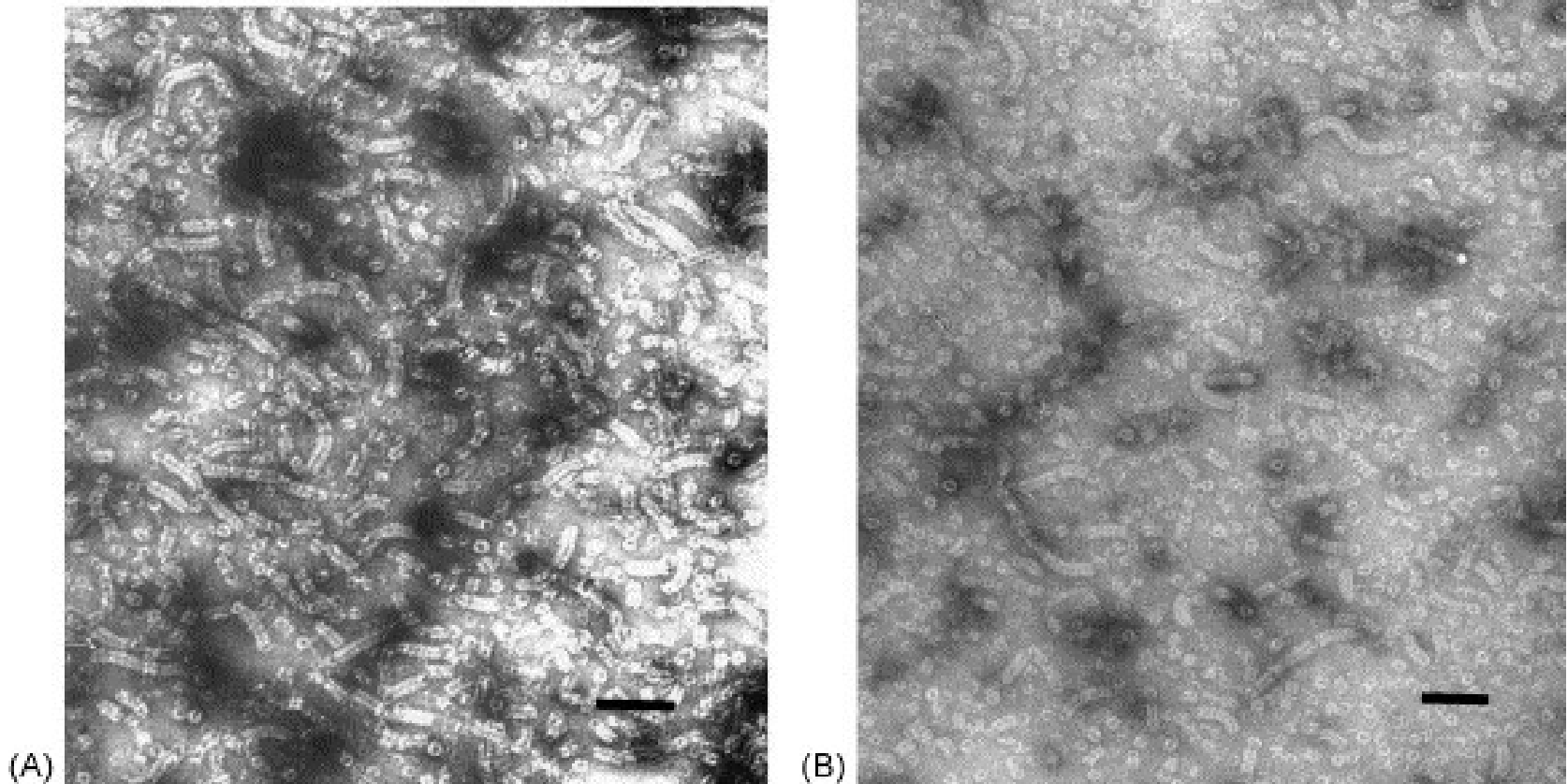
Souhrn 2. přednášky

- Kvasinky patří mezi houby (asco- a basidiomycety)
- Podmínky růstu – determinují morfologii/buněčný program
- Morfologie buněk a kolonií
- Killer toxiny

Killer toxiny

- Některé kmeny *S.cerevisiae* produkují tzv. killer toxiny (proteiny a glykoproteiny sekretované do prostředí), které jsou letální pro citlivé kvasinky i bakterie; ekologická výhoda (výhoda pro vinaře – nepřerostou je cizorodé kmeny)
- Poprvé analyzováno v roce 1963 (Makower a Bevan) kvasinky zabíjí podkladový kmen (K1=laboratorní, K2 a K3=vinařské kvasinky)
- Kvasinky ze stejné skupiny se navzájem nezabíjí (preprotoxin ...)
- Geny jsou kódovány na dsRNA obalené ve „virus-like particles“ (VLP, připomínají savčí dsRNA viry) – kódují obalové, replikační (ale potřebují buňku k replikaci ...), transkripční sekvence a toxin
- **Samotné VLP nejsou infekční (nejsou uvolňovány z buněk - lze je přenést konjugací buněk nebo fúzí protoplastů) ani toxické (preprotoxin v původní buňce interaguje/inaktivuje maturované/sekretované toxiny)**
- Toxin je sekretován a váže se na buněčné stěny (β -1,6-glukany) - způsobuje perforace/póry v cytoplasmatické membráně – ztráta iontů, potenciálu ... buňka hyne
- *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranifaciens* – lineární dsDNA (v cytoplasmě, pGK11), bez kapsidy, toxin se váže na chitin (chitinázová aktivita)
- *Hansenula mrakii* ... - geny na chromosomech, toxin inhibuje syntézu β -1,3-glukanu (v místě růstu pupenu)

Elektronová mikroskopie



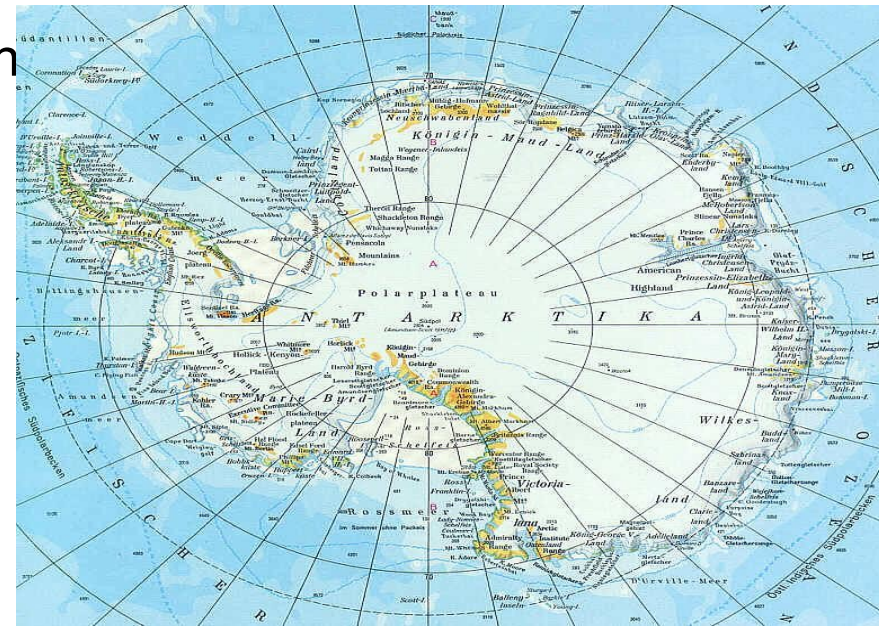
Snímky z elektronového mikroskopu a) N protein HeV b) N protein NiV

Juozapaitis a kol. (2007): Generation of henipavirus nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Virus Res* 124: 95-102.

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:

- z půdy: promývání v destilované vodě → homogenizace → třepačka ...
- klinické vzorky: tělní tekutiny, stěr nebo pomocí lepidivé pásky ...
a pak vyšetří na Sabouraudův agar nebo jiné bohaté médium →
kultivace 2-7 dní při teplotách 22-42°C (37°C)



identifikace/analýza:

- fenotypové metody – morfologie kolonií, morfologie buněk (...spor)
- biochemické vlastnosti (fermentace cukrů, asimilace uhlíkatých nebo dusíkatých substrátů ... růst na chromogenních plotnách)

moderní metody

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



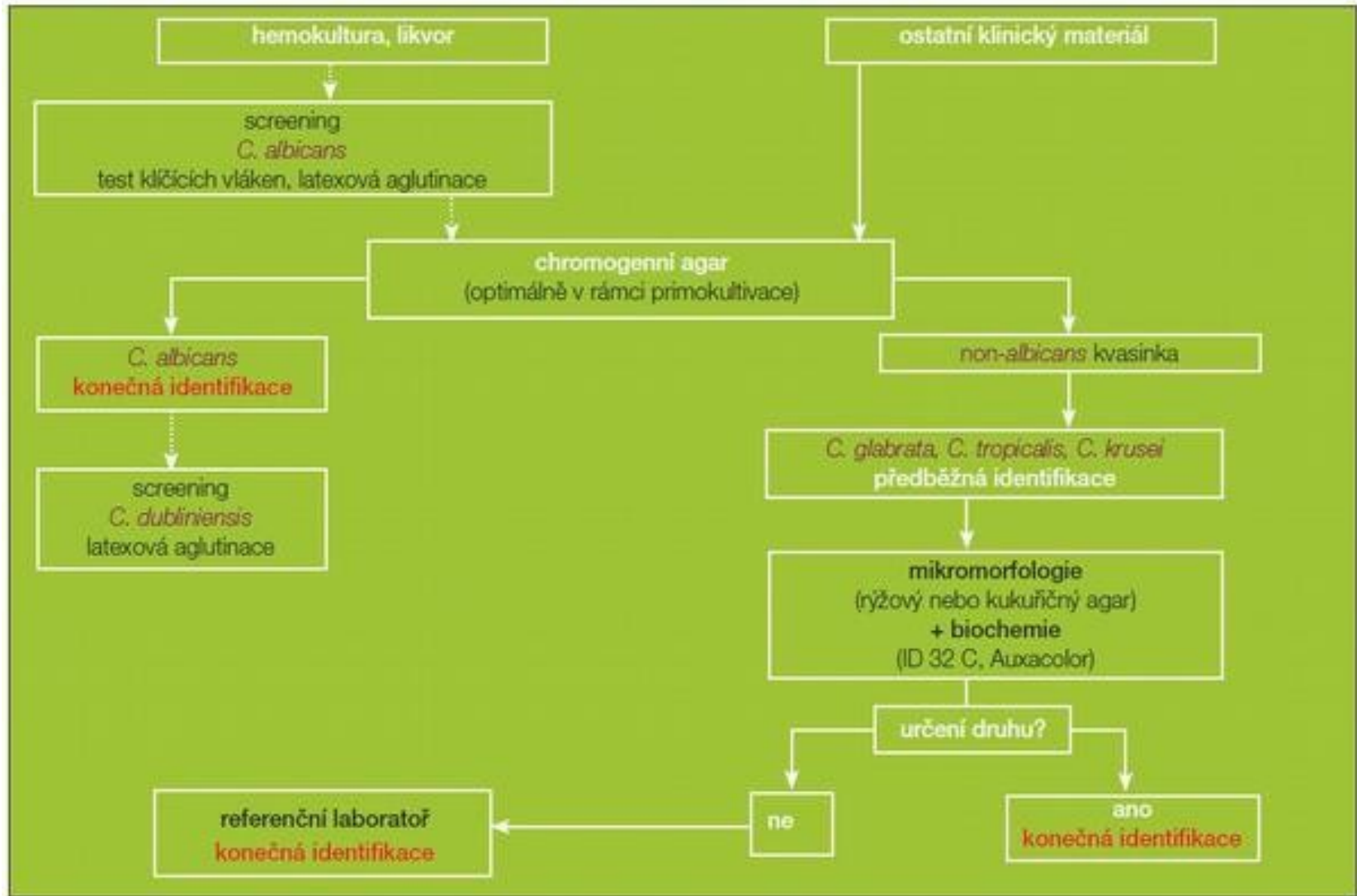
V klinické praxi je důležitější rychlost než přesnost (při zachování správné léčby)

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
	blochemie	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“

Postup klinického vyšetření



Fenotypové metody

Morfologie – rozlišení jednotlivých druhů dle tvaru, velikosti, kolonií, hyf, spor ... teplotní testy.

- rozdělení dle způsobu pohlavního rozmnožování (asko-vřecko, basidio-stopkovýtusé a deuteromycetes; basidiosporogenní produkují ureasu – na močovině s fenolčervení se barví červeně ...)

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

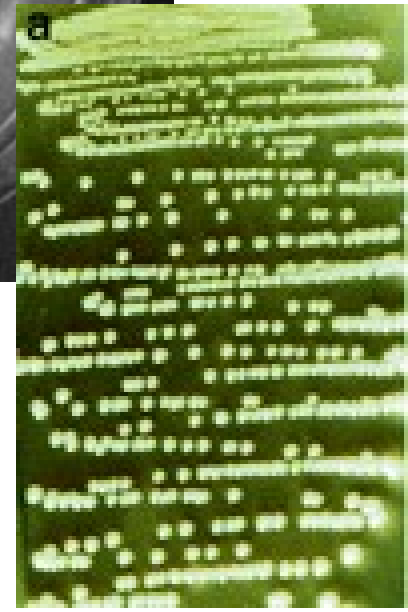
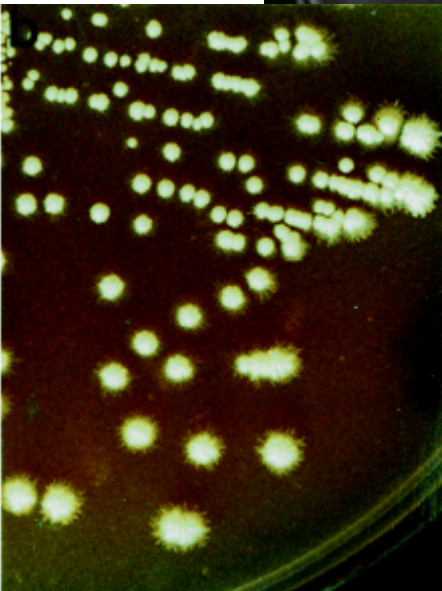
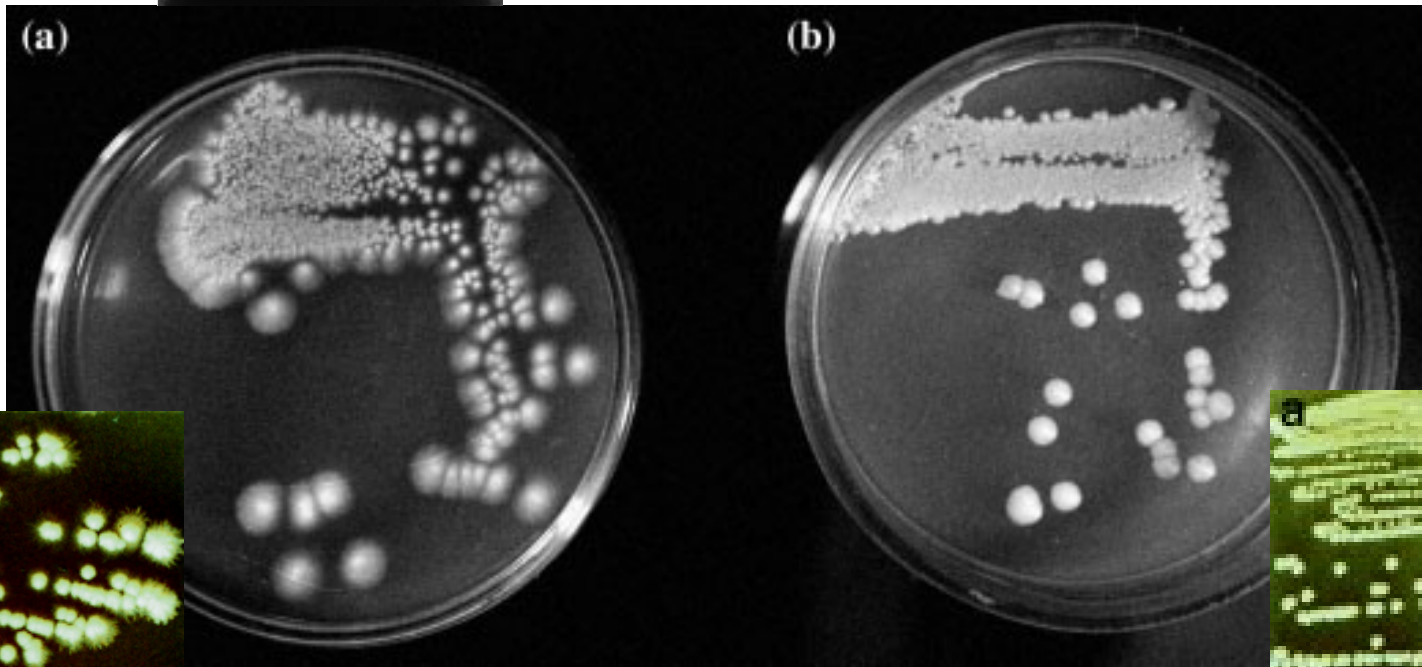
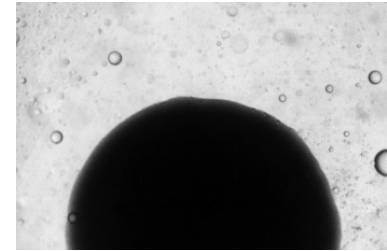
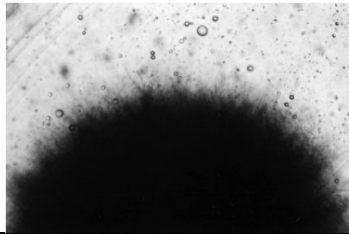


C. dubliniensis: nadbytek chlamydospor na koncích krátkých pseudohyf

- test klíčnicích hyf, *C. albicans* přímo z pozitivních hemokultur nebo kaseinový agar nebo kukuřičný agar

Agar	Basis of differentiation	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Cornmeal–Tween 80 medium; rice agar–Tween medium; Pal’s medium	Chlamydospore 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	Chlamydospore production	Chlamydospore absent	Chlamydospore abundant

Mikromorfologie - Kolonie



Staibuv agar (37°C)

C. dubliniensis

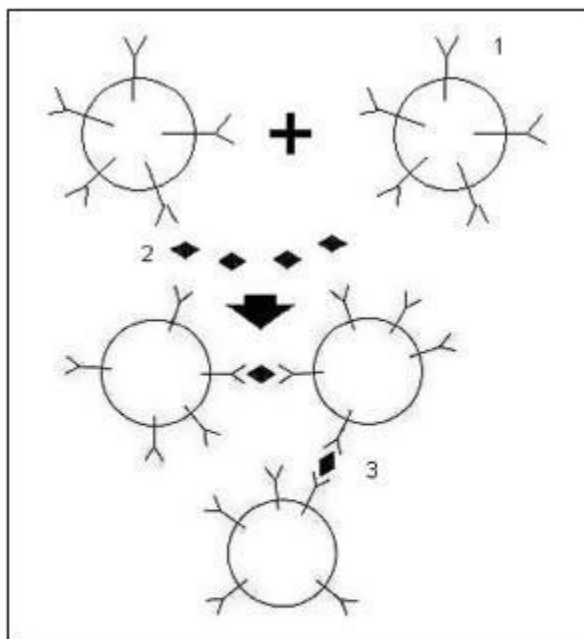
C. albicans

Sérologické testy

- souprava Iatron Serological Candida Check Kit (Iatron Laboratories) nebo Bichro-latex Albicans (Fumouze Diagnostics)



Specifické protilátky proti antigenům buněčné stěny (omezené ...)



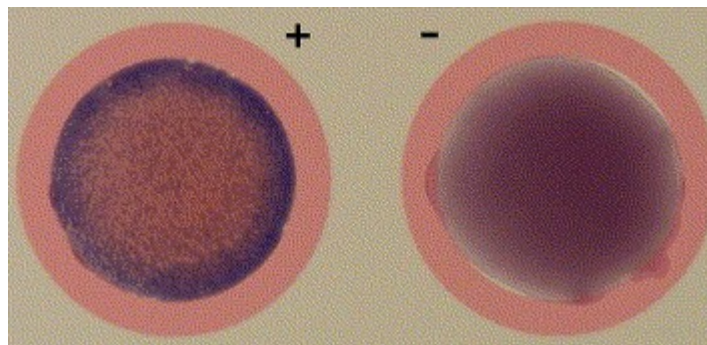
Obr. 2: 1 – latexová částice s navázanou specifickou protilátkou na povrchu; 2 – virová částice; 3 – shluk latexových částic s virem, který vytváří zákal ve vzorku

Totéž platí pro kvasinky

Latexová aglutinácia

C. dubliniensis

C. albicans



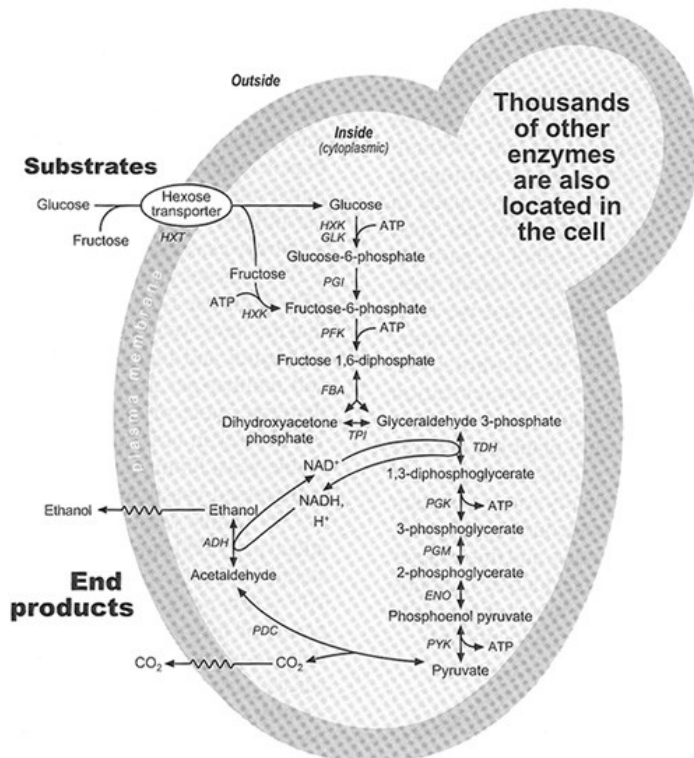
Teplotní test

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

Biochemické testy

- Biochemické parametry – založeny na schopnosti utilizace uhlíkatých látek (cukrů), utilizace dusíkatých látek (hydrolýza močoviny - ureasa)
- Tato schopnost se odvíjí od metabolických schopností daného druhu – přítomnosti specifických enzymů (především fosfatázy, β -glukosidáza, β -N-acetylhexosaminidázy)

biochemie	asimilace	Intenzita zákalu barevná změna
	fermentace	produkce CO ₂



Phenotypic criteria	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Growth on glycerol	-	+
Growth on D-xylóse	+	-
Growth on methyl- α -D-glucoside	+	-
Growth on D-trehalóse	+	-
β -D-glukosidase activity	+	-

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

YT MicroPlate™

A1 Water	A2 Acetic Acid	A3 Formic Acid	A4 Propionic Acid	A5 Succinic Acid	A6 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Glutamic Acid	A9 L- Proline	A10 D-Gluconic Acid	A11 Dextrin	A12 Inulin
B1 D-Cellobiose	B2 Gentiobiose	B3 Maltose	B4 Maltotriose	B5 D-Melezitose	B6 D-Melibiose	B7 Palatinose	B8 D-Raffinose	B9 Stachyose	B10 Sucrose	B11 D-Trehalose	B12 Turanose
C1 N-Acetyl-D-Glucosamine	C2 α-D-Glucose	C3 D-Galactose	C4 D-Psicose	C5 L-Sorbose	C6 Salicin	C7 D-Mannitol	C8 D-Sorbitol	C9 D-Arabitol	C10 Xylitol	C11 Glycerol	C12 Tween 80
D1 Water	D2 Fumaric Acid	D3 L-Malic Acid	D4 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	D5 Bromo-Succinic Acid	D6 L-Glutamic Acid	D7 γ-Amino-Butyric Acid	D8 α-Keto-Glutaric Acid	D9 2- Keto-D-Gluconic Acid	D10 D-Gluconic Acid	D11 Dextrin	D12 Inulin
E1 D-Cellobiose	E2 Gentiobiose	E3 Maltose	E4 Maltotriose	E5 D-Melezitose	E6 D-Melibiose	E7 Palatinose	E8 D-Raffinose	E9 Stachyose	E10 Sucrose	E11 D-Trehalose	E12 Turanose
F1 N-Acetyl-D-Glucosamine	F2 D-Glucosamine	F3 α-D-Glucose	F4 D-Galactose	F5 D-Psicose	F6 L-Rhamnose	F7 L-Sorbose	F8 α-Methyl-D-Glucoside	F9 β- Methyl-D-Glucoside	F10 Amygdalin	F11 Arbutin	F12 Salicin
G1 Maltitol	G2 D-Mannitol	G3 D-Sorbitol	G4 Adonitol	G5 D-Arabitol	G6 Xylitol	G7 i-Erythritol	G8 Glycerol	G9 Tween 80	G10 L-Arabinose	G11 D-Arabinose	G12 D-Ribose
H1 D-Xylose	H2 Succinic Acid Mono-Methyl Ester plus D-Xylose	H3 N-Acetyl-L- Glutamic Acid plus D-Xylose	H4 Quinic Acid plus D-Xylose	H5 D-Glucuronic Acid plus D-Xylose	H6 Dextrin plus D-Xylose	H7 α-D-Lactose plus D-Xylose	H8 D-Melibiose plus D-Xylose	H9 D-Galactose plus D-Xylose	H10 m-Inositol plus D-Xylose	H11 1,2-Propanediol plus D-Xylose	H12 Acetoin plus D-Xylose

FIGURE 1. Carbon Sources in YT MicroPlate



Oxidation Tests

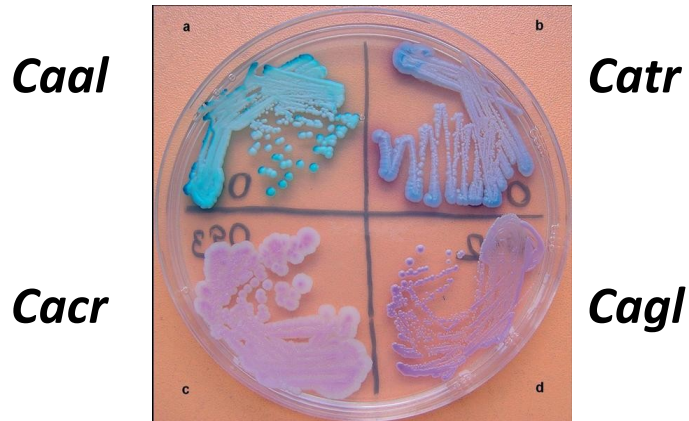


Assimilation Tests

Je možné určit až 267 druhů kvasinek z 53 rodů (ale pouze 50% spolehlivost)

Chromogenní testy

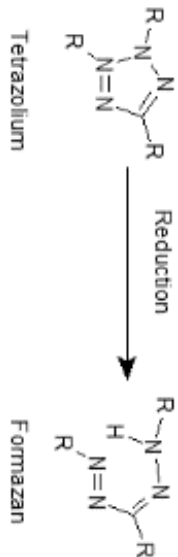
- test enzymových aktivit - chromogenní substráty – např. tetrazoliové soli
- „Zlatý standard“ – půda vyvinutá Rambachem - CHROMagar Candida (CHROMagar Microbiology, v ČR Colorex Candida od Trios)



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



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



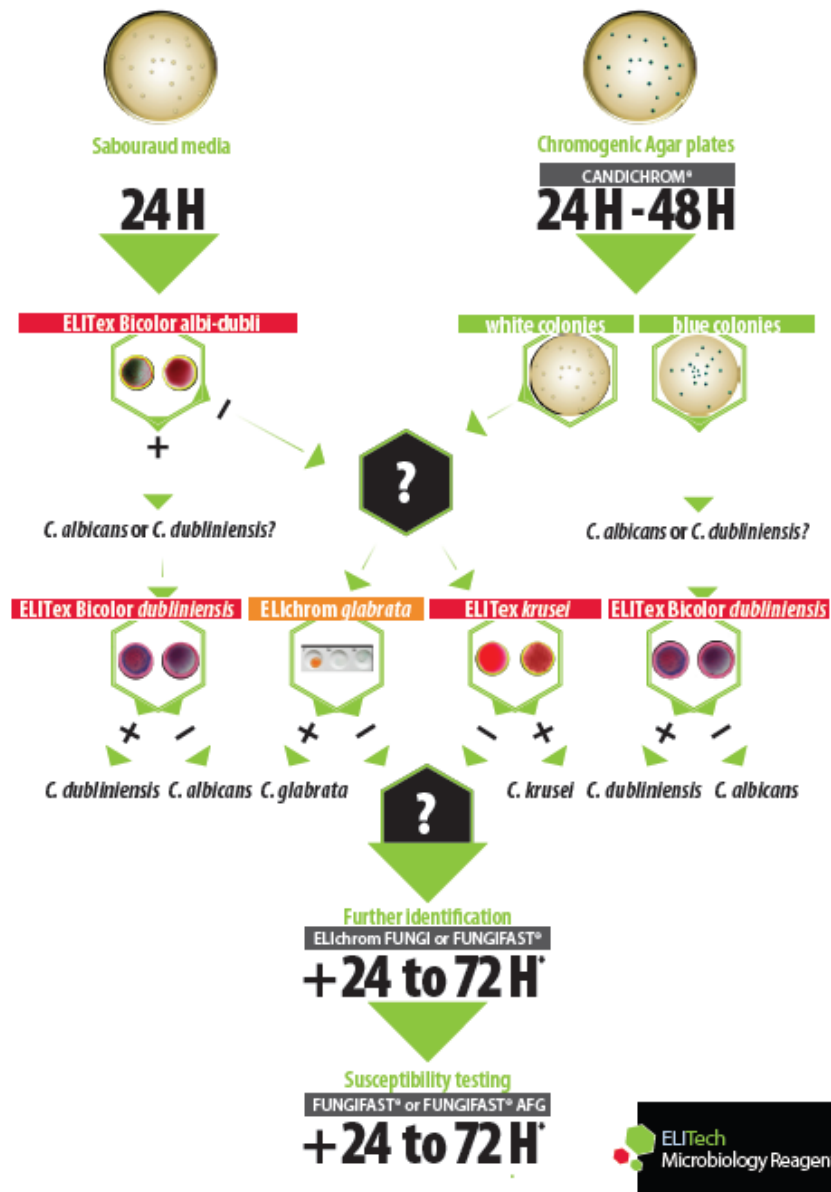
Agar	Basis of differentiation	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Tetrazolium salt médium	Colony color determined by the ability to reduce the tetrazolium salt	Pale pink to whitish colonies	Red to maroon colonies
Chromagar Candida (Chromagar, Paris, France; M-Tech Diagnostics Ltd, Cheshire, UK)	Colony color determined by β - <i>N</i> -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

Výše uvedené metody se používají běžně v klinických laboratořích
Jsou k dispozici kompletní sady souprav

Tab. 2 - Selektivně diagnostické půdy pro předběžnou ide

Registrovaný název	Typ	Výrobce
CHROMagar Candida	chromogenní	CHROMagar Microbiology
CandiSelect 4	chromogenní	Blo-Rad Laboratories
HardyCHROM Candida	chromogenní	Hardy Diagnostics
Brilliance Candida Agar	chromogenní	Oxoid
Candida Chromogenic Agar	chromogenní	Laboratorios Conda
BBL Chromagar Candida	chromogenní	BD Diagnostics
Candida ID 2	chromogenní	bioMérieux
Candichrom II	chromogenní	ELITech Group
Fluoroplate Candida	fluorogenní	Merck Chemicals

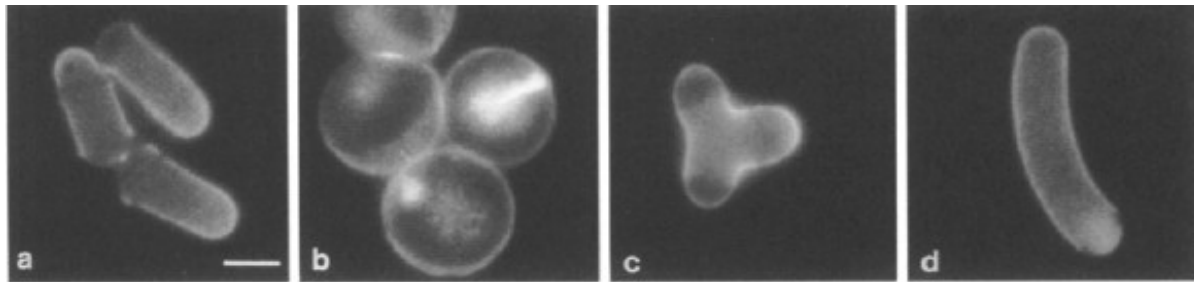
CAAL – *Candida albicans*, CATR – *Candida tropicalis*, CAKR – *Candida krusei*, CALI – *Candida lusitanae*, CALU – *Candida lusitanae*, CAKE – *Candida kefyr*, CAGU – *Candida guillierii*



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)

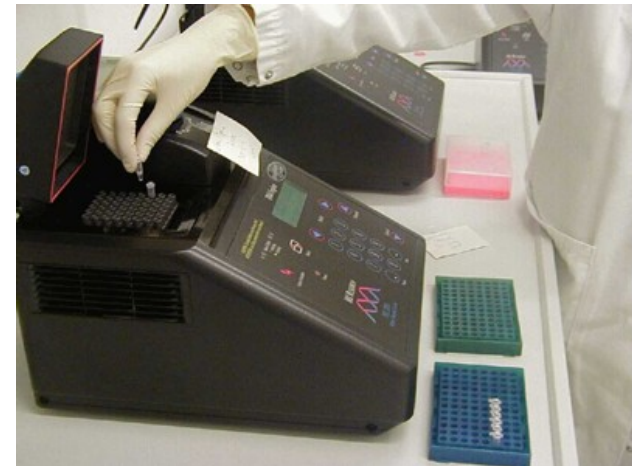


molekulární taxonomie (komerční účely - odlišit kmeny *S.c.*)

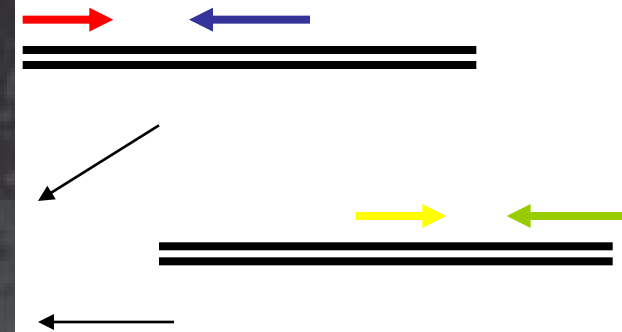
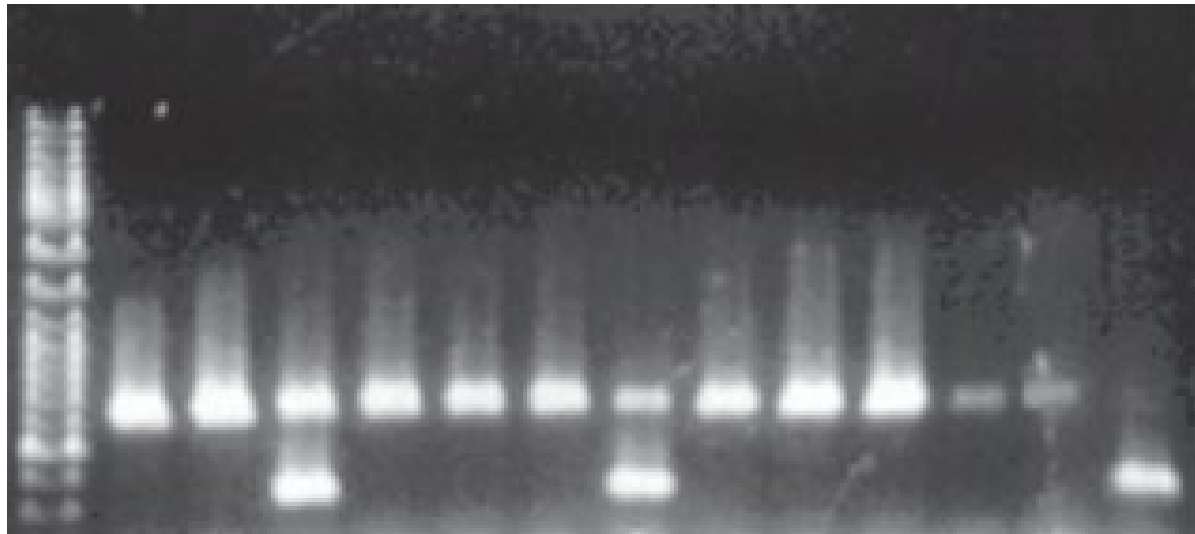
- pulsní gelová elektroforéza (PFGE), FISH (karyotyp)
- PCR, restrikční polymorfismus (odlišení druhů)
- nejnověji MALDI-TOF (taxonomie)

Identifikace založená na odlišnosti typických sekvencí DNA

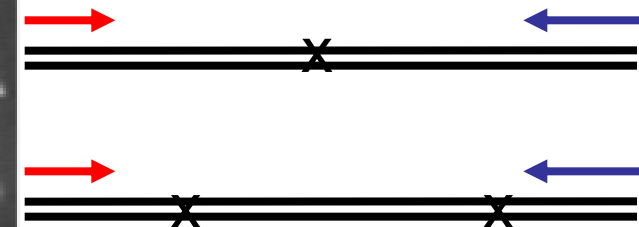
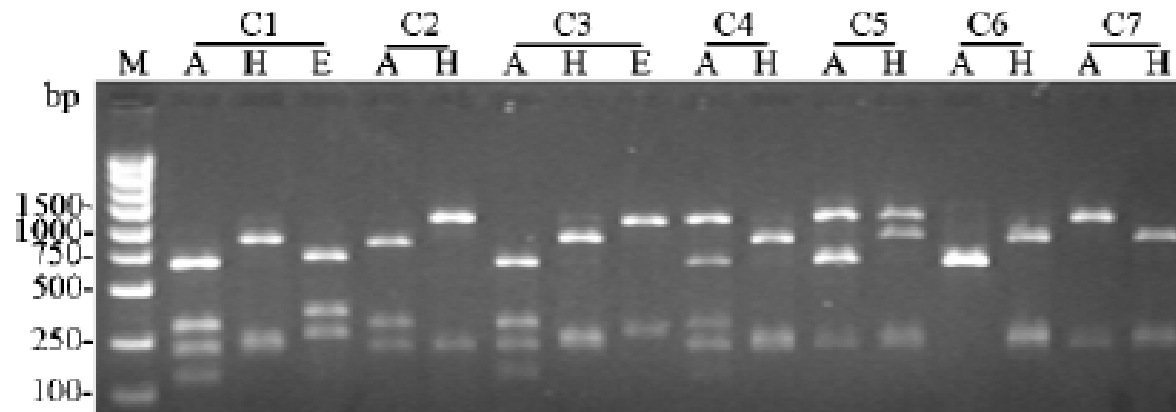
- obtížná izolace DNA, proteinů ... z kvasinek
- je třeba nejdříve narušit silnou buněčnou stěnu ... pomocí enzymů nebo mechanicky
- poté PFGE nebo dále extrahovat DNA (např. fenol-chloroform, poté srážení etanolem)
- specifické sekvence lze identifikovat pomocí Southern blotu nebo PCR
 - izolace DNA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



- 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)

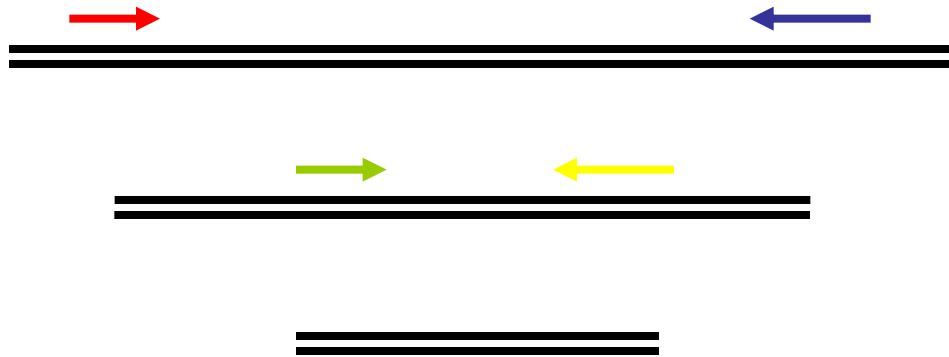


- po PCR může následovat štěpení restriční endonukleasou a odlišení druhů na základě odlišné délky štěpných produktů (tzv. **RFLP** – restriction fragment length polymorfism)



Nested („zahnízděná“) 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	TGCTTAACTTCGCAGATCGG	
<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

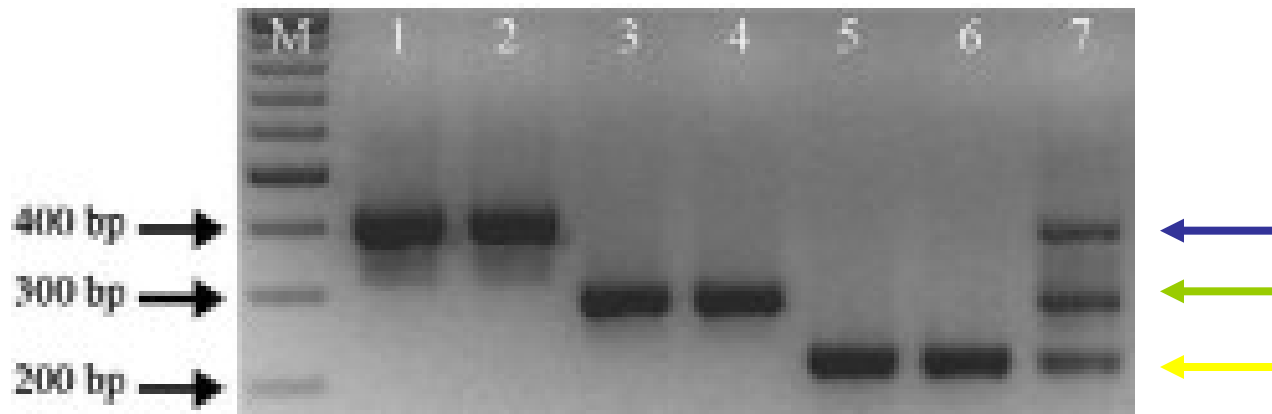
Candida glabrata
397bp

Candida nivariensis
293bp

Candida bracarensis
223bp



univerzální
primer (konzervativní oblast 5.8S rDNA)

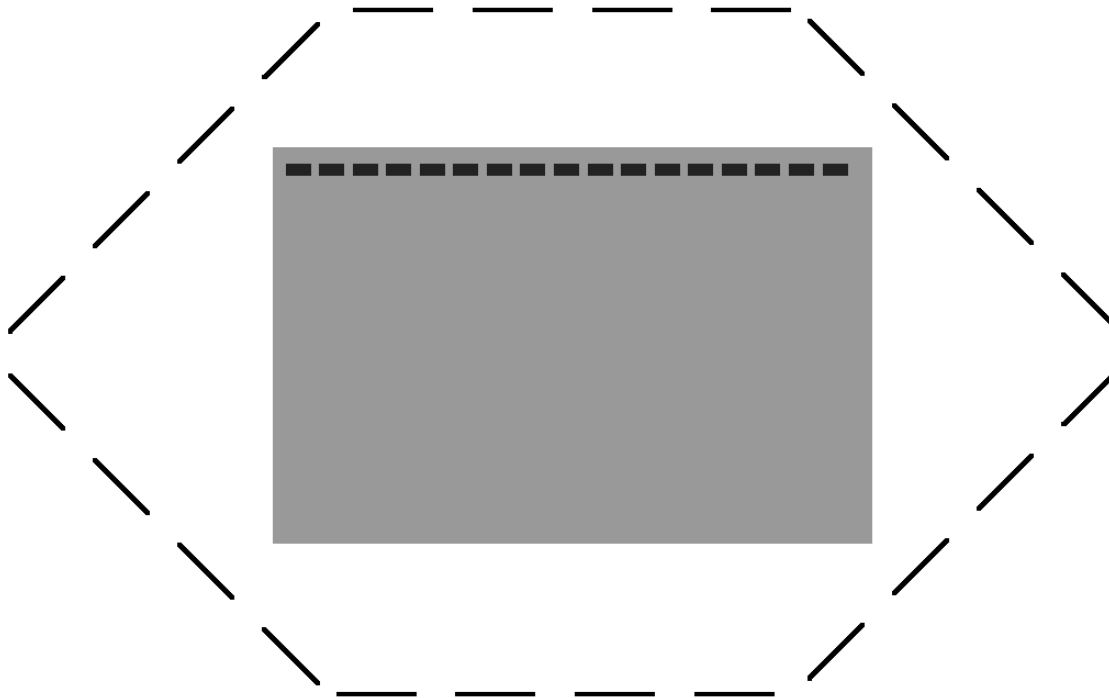


PFGE

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

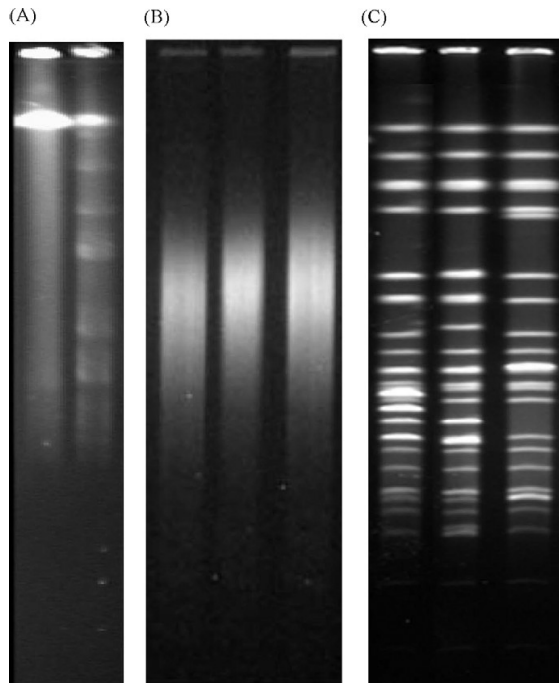
PFGE = pulse field gel electrophoresis (elektroforéza s měnícím se elektrickým polem, při změně směru elektrického pole trvá větším molekulám DNA déle, než se přeorientují - umožňuje separovat molekuly velké několik Mb)

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



Karyotypizace

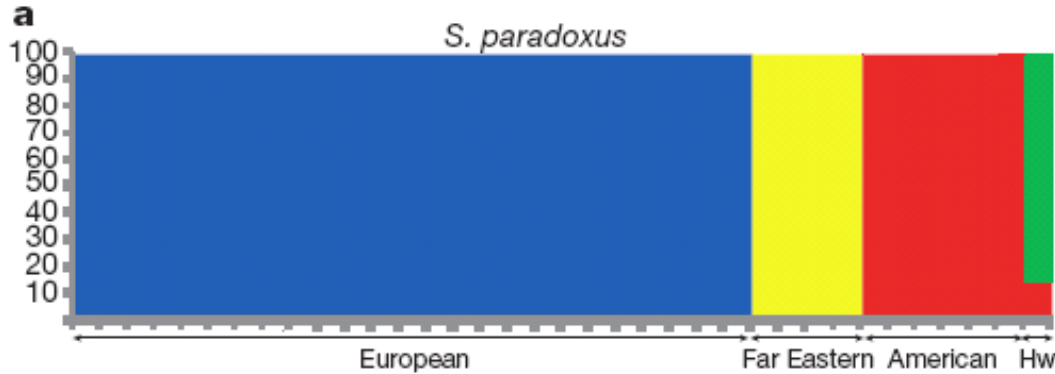
- *S.c.* kmeny mají podobný karyotyp – většinou se liší délkou chromosomu XII (podle počtu rDNA genů)
- Průmyslové kvasinky jsou většinou polyploidní – homologní chromosomy mají odlišné velikosti
- Srovnání kmenů pro fylogenetické účely (intaktní nebo RE naštěpené chromosomy)
- Určení příbuznosti izolátů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



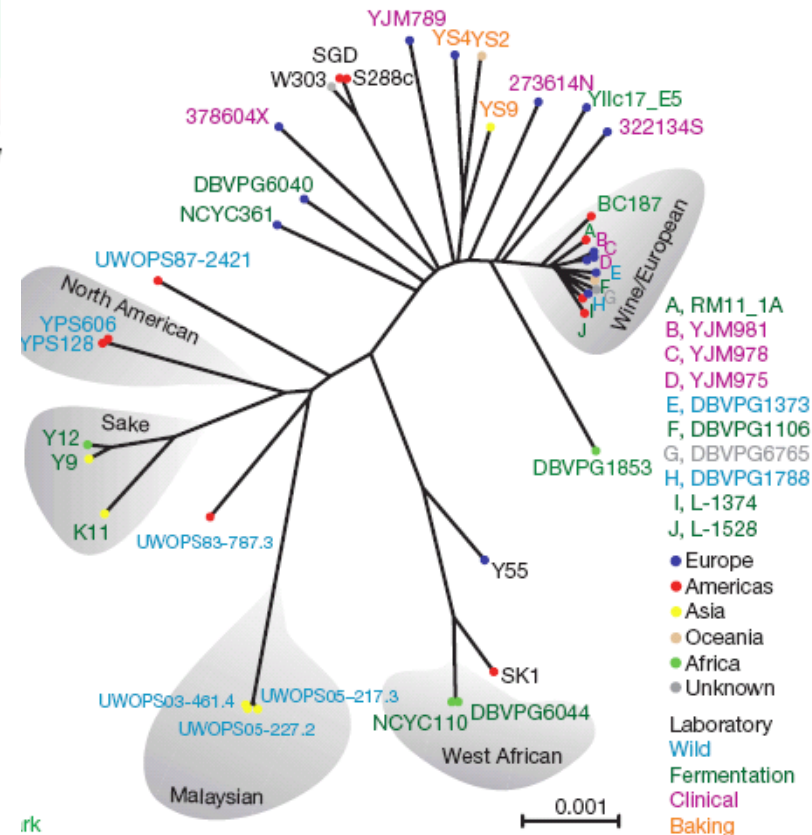
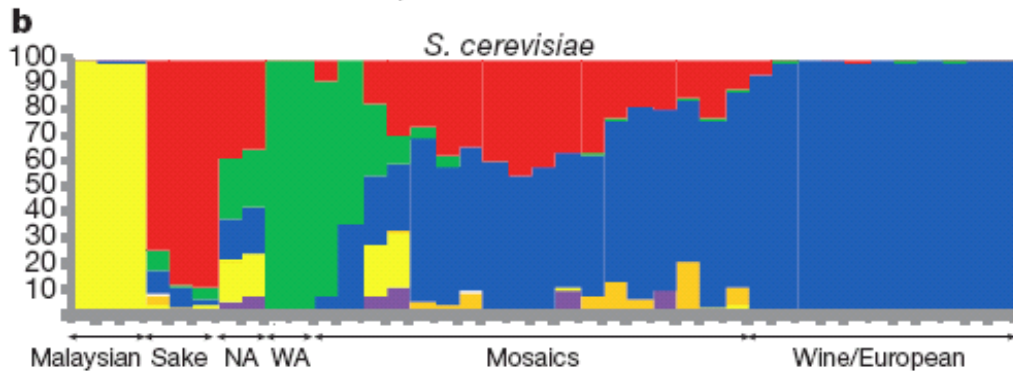
- (A) Nekompletní naštěpení RE
- (B) Degradace nukleázy
- (C) Oprava přidáním 75 mM thiourey do pufru

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

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

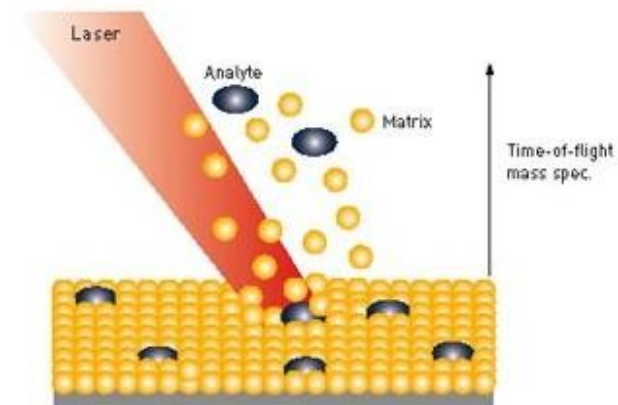
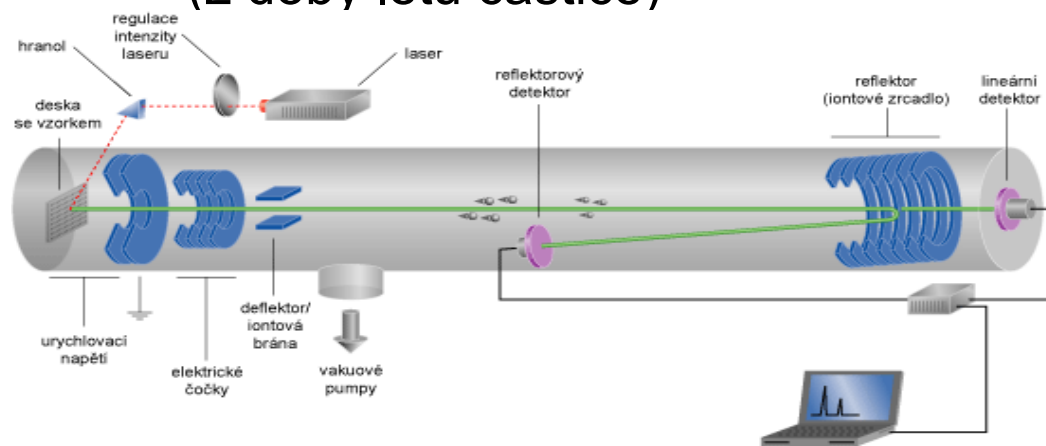


- *S. cerevisiae* - 3-4 původní linie, které se díky člověku křížily ...

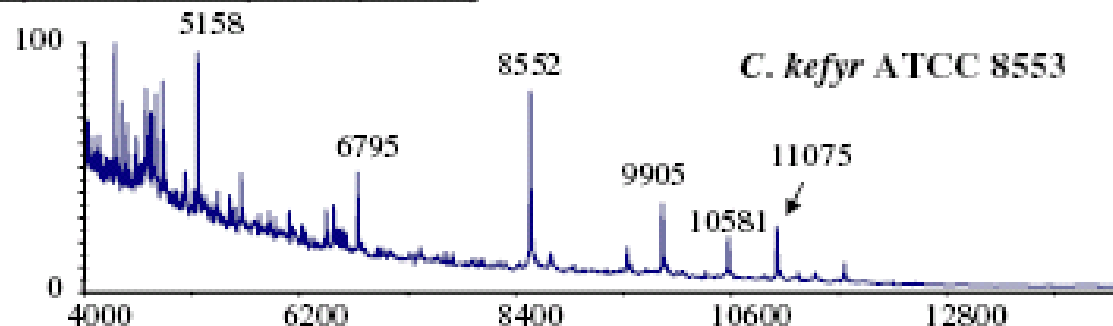
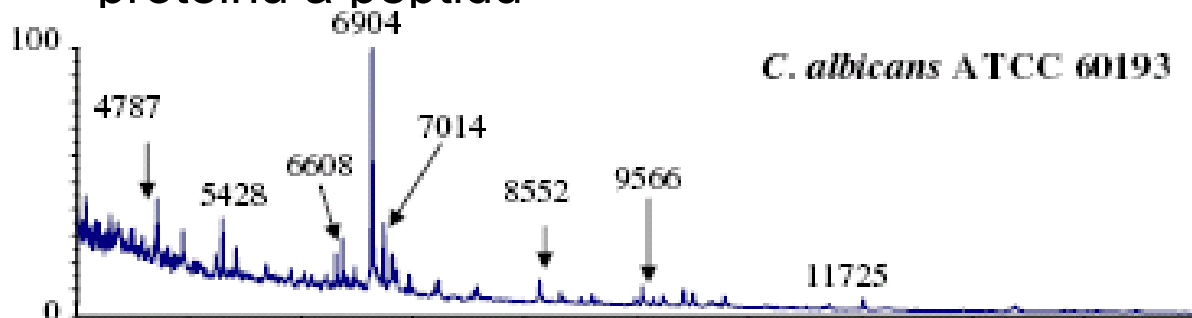


MALDI-TOF

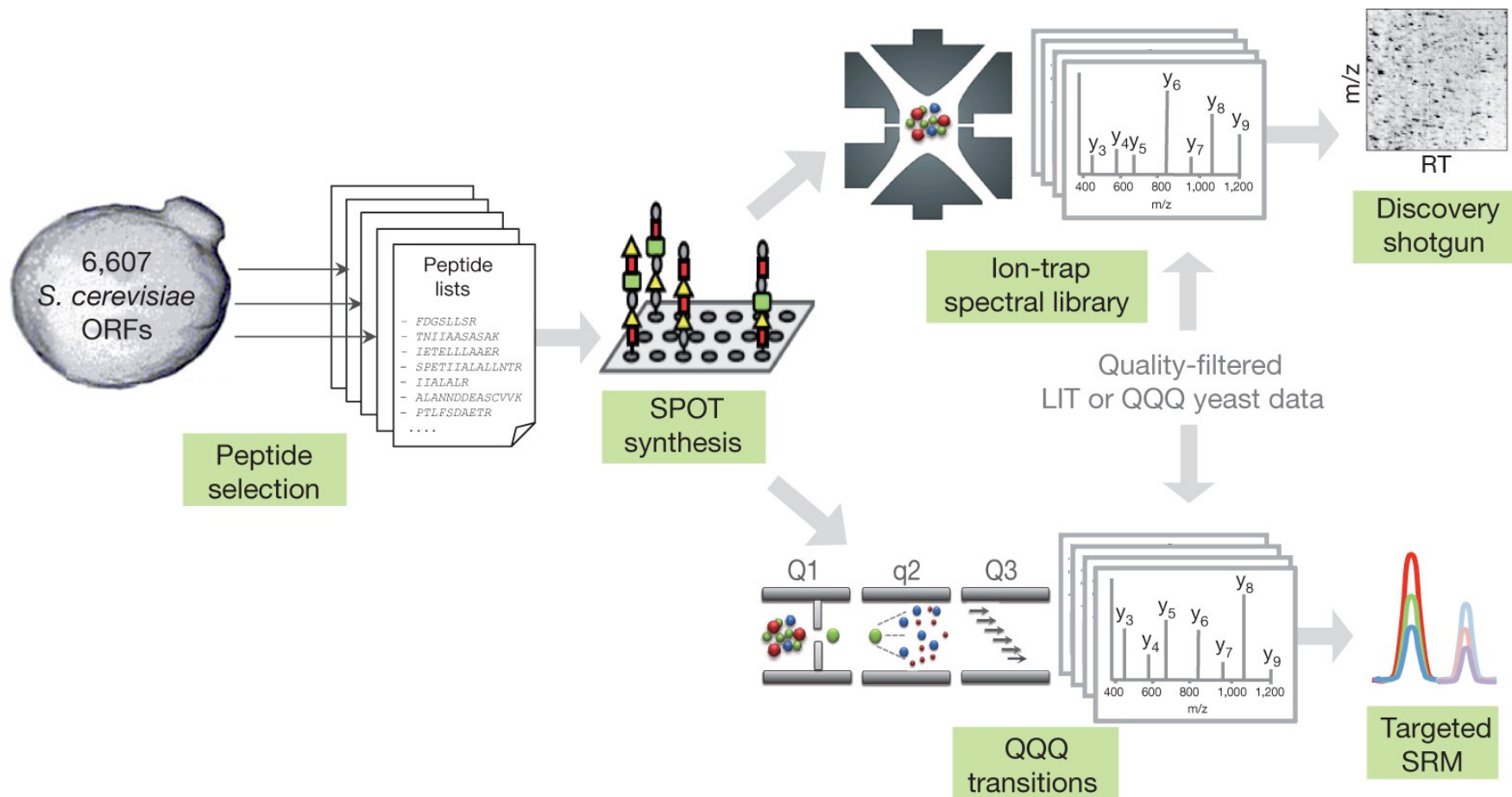
- hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry – MALDI-TOF)
- Umožňuje odpaření a ionizaci netěkavých biologických vzorků z pevné fáze přímo do plynné
- Vzorek je smíchán s tzv. matricí
- 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 vakuua 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

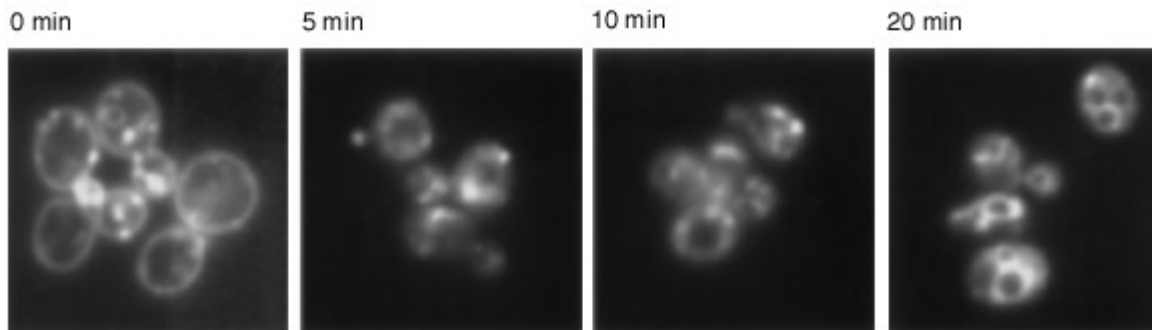
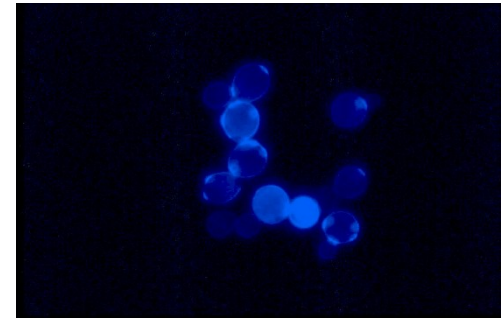
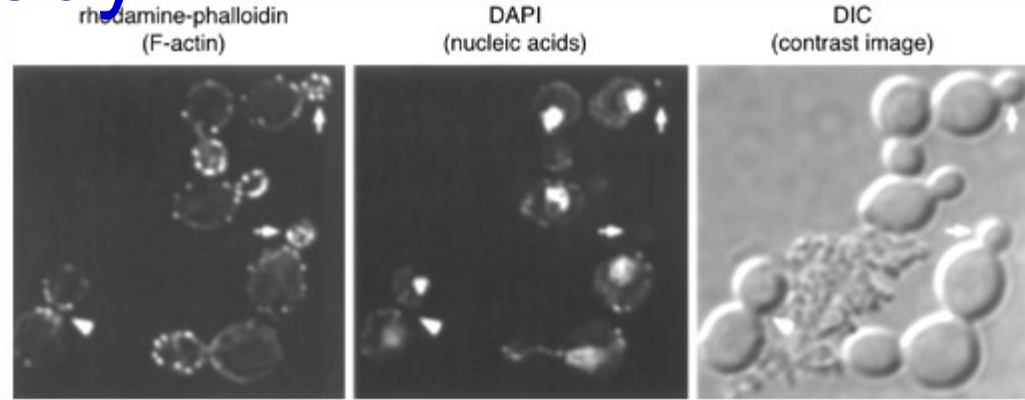


Vygenerování referenční „mass-spectrometric“ mapy pro kvasinkový proteom



Fluorescenční metody

- Techniky barvení
 - FISH – lokalizace spec. sondy
 - DNA/jádro – **DAPI**
 - aktinový – **phalloidin**
 - buněčná stěna – **calcofluor**
 - Endocytóza ->vakuoly – **FM4-64**
 - Mitochondrie, ER - **DiOC₆**
(3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide)



- proteiny tagované GFP (*in vivo*)

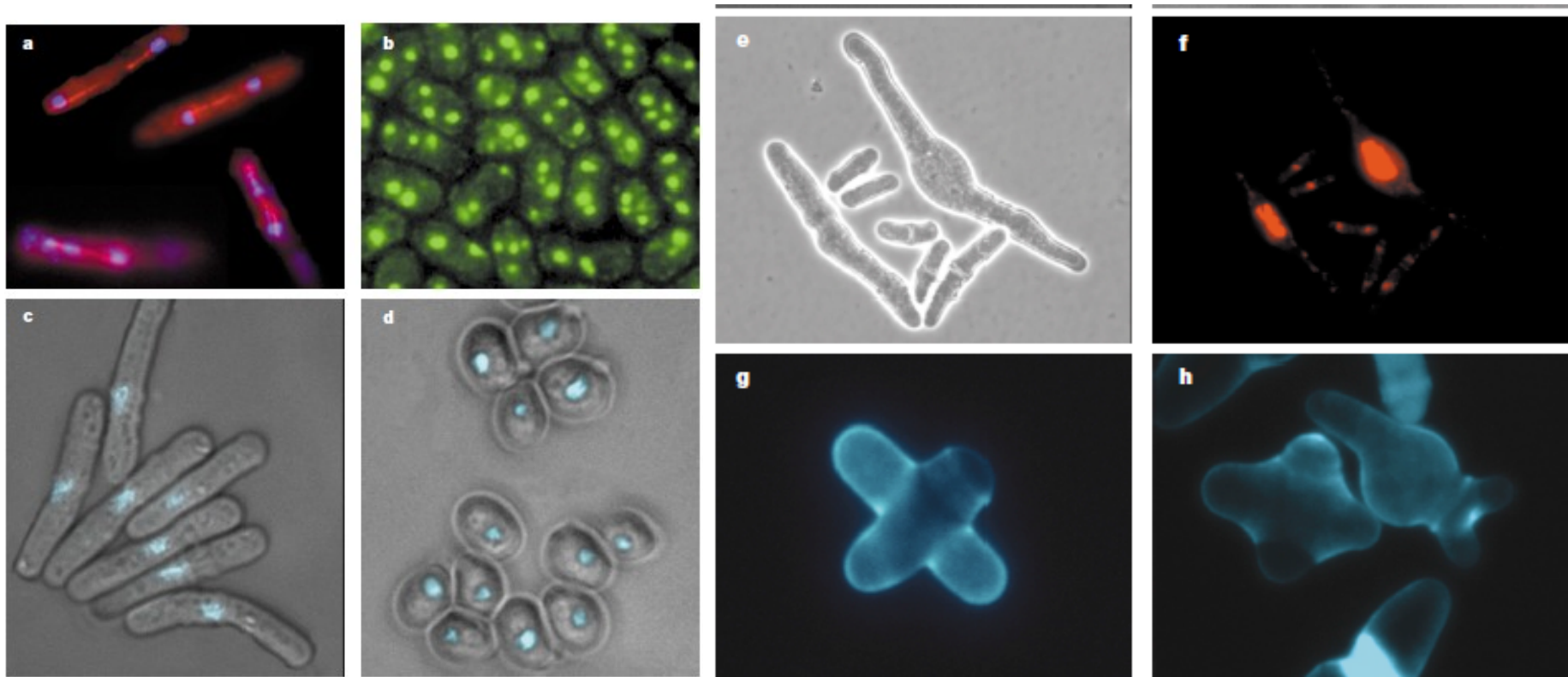
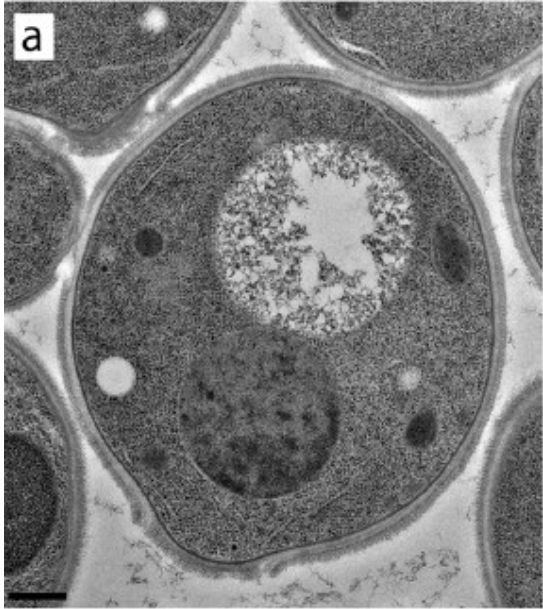


Figure 2 | **Examples of mutant phenotypes in studies of cell-cycle and chromosome dynamics.** **a-c, e-g** | *Saccharomyces pombe*; **d** | *Saccharomyces cerevisiae*. **a** | Abnormal mitosis in fission yeast. The top two wild-type cells show a normal mitotic spindle (anti-tubulin, red) and proper segregating anaphase nuclei (DAPI, which stains DNA, blue). The bottom two mutant cells show a fragmentation phenotype of irregularly segregating DNA along the spindle. **b** | Cells entering meiosis from the haploid state in a *pat1* mutant. DAPI is false-coloured green. Note the three or four irregularly segregating nuclei per cell body, after a lethal attempt to go through MI and MII divisions. **c** | *cell division cycle 2* (*cdc2*, which encodes a cyclin-dependent kinase (CDK) mutants elongate without dividing. Composite image of differential interference contrast (DIC) and fluorescence (DAPI). **d** | *cdc28* (CDK) mutants arrest without budding. **e-f** | Normal yeast cells (smaller cells) are shown next to re-replication mutants in yeast that overexpress *cdc18*. Mutants undergo several rounds of DNA replication in the absence of mitosis (**e**, phase contrast; **f**, propidium iodide-stained DNA in red). **g** | Cells deleted for *tip1*, with mispositioned growth sites. **h** | Overexpression of an unknown gene that affects cytokinesis, as well as the size, number and positioning of growth sites. (Panels **e-f** courtesy of Hideo Nishitani, Japan; panels **g-h** courtesy of Damian Brunner, EMBL, Germany.)

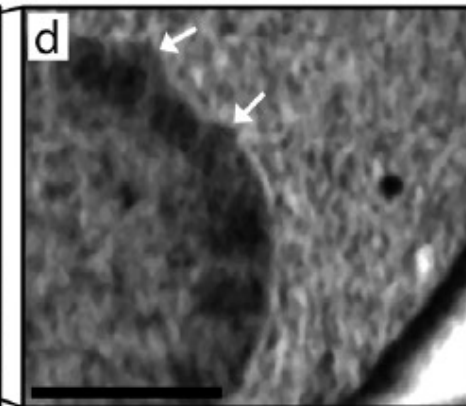
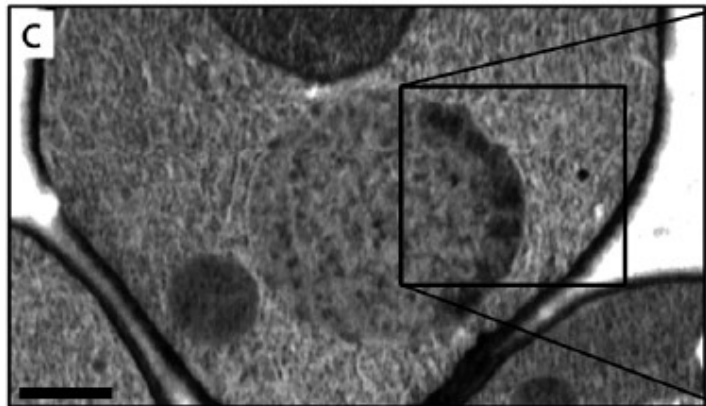
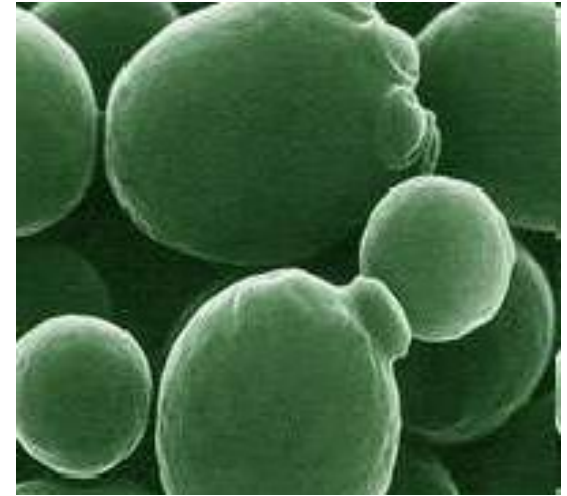
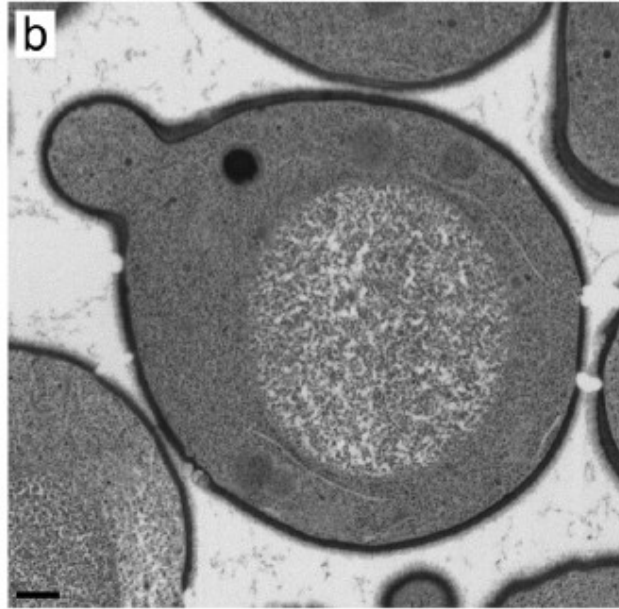
Elektronová mikroskopie

Wei, et al., BioTechniques, 2012

TEM



FIB - SEM



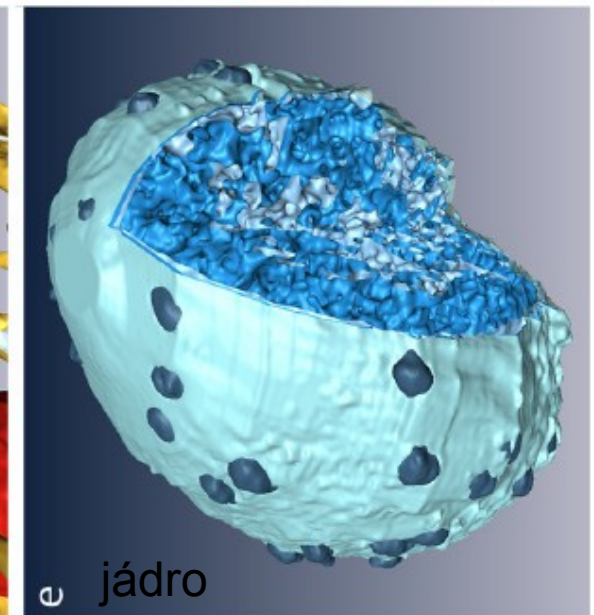
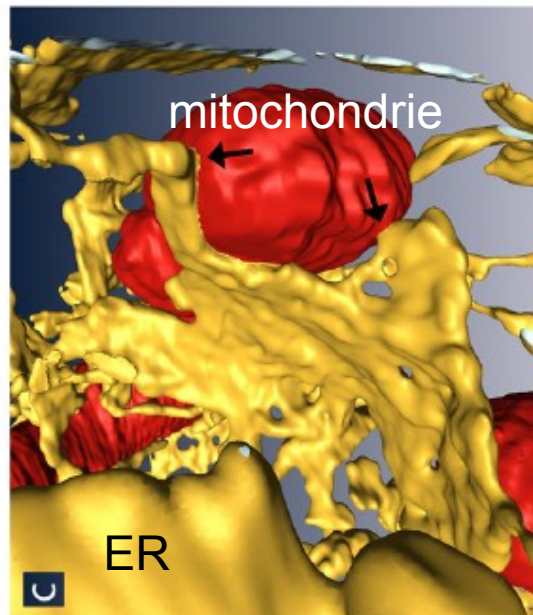
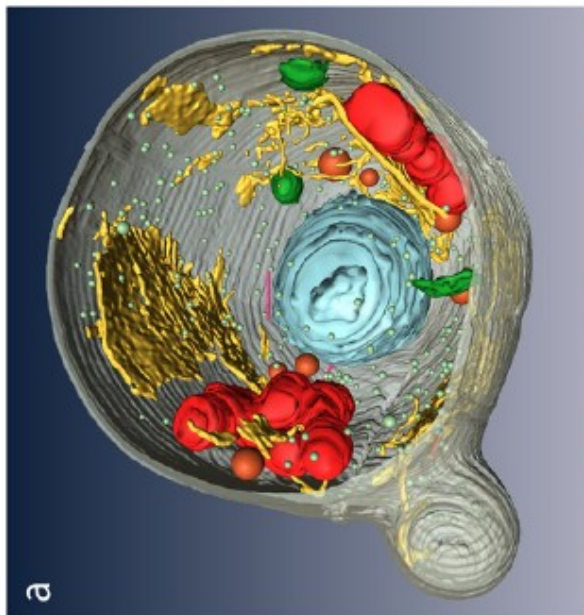
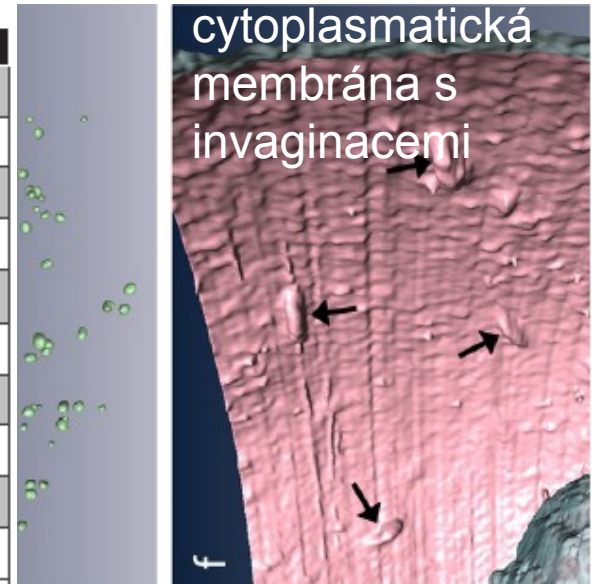
- studium buněčné stěny
... organel (sekrece ...)
více prof. Kopecká a prof.
Svoboda

- 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



18.9.2014	12-13.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam
25.9.2014	12-13.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
2.10.2014	12-13.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Genetické a molekulárně biologické metody
9.10.2014	12-13.50hod	A7-2.14	prof. Kopecká	O podstatě buněčných stěn kvasinek
16.10.2014	12-13.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
23.10.2014	12-13.50hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
30.10.2014	12-13.50hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
6.11.2014	12-13.50hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
13.11.2014	12-13.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
20.11.2014	12-13.50hod	A2-2.11	Dr. Kolesár	Využití kvasinek pro studium procesů opravy DNA
27.11.2014	12-13.50hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Organizce kvasinkového chromatinu
4.12.2014	12-13.50hod	A2-2.11	Mgr. J. Kopecká	Kvasinky a biotechnologie
11.12.2014	8-12hod	A7-2.17	Svoboda+Paleček	Cvičení k přednáškám
18.12.2014	9-11hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Zkouška