



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# C9045 - Biologie kvasinek



Hustopeče u Břeclavi



doc. Jan Paleček  
[jpalecek@sci.muni.cz](mailto:jpalecek@sci.muni.cz)  
(garant – A2, 214)



prof. Augustin Svoboda

# O čem se dozvíte?

- Význam – výskyt, využití, výzkum ...
- Mikrobiologie - základní charakteristiky
- *Biotechnologie - metody*
- Genetika - metody
- Klinické aspekty – patogenní kmeny
- Buněčná biologie – buněčná stěna ...
- Molekulární biologie – buněčný cyklus, transkripce, chromosomy, evoluce

# Rozvrh přednášek

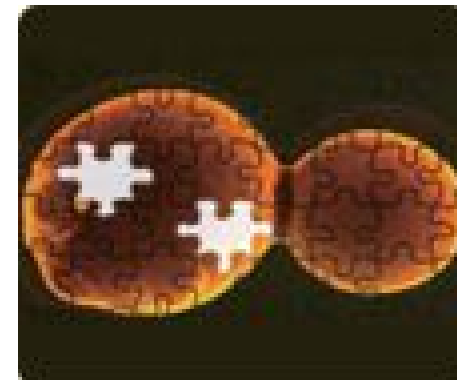
20.09.2018	8-9.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam
27.09.2018	8-9.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
04.10.2018	8-9.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Diagnostické a molekulárně biologické metody
11.10.2018	8-9.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
18.10.2018	8-9.30hod	A2-2.11	Dr. Špirek	Mitochondrie
25.10.2018	8-9.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
01.11.2018	8-9.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
08.11.2018	8-9.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
15.11.2018	8-9.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
22.11.2018	8-9.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
29.11.2018	8-9.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Organizace kvasinkového chromatinu a evoluce
06.12.2018	8-12hod	A7-2.17	Svoboda+Paleček	Cvičení k přednáškám
13.12.2018	9-12hod	A2-2.11	Doc. Paleček	test + předtermín zkoušky

Přednášky – PPT budou na IS po přednášce

Cvičení – blokově

2-3 termíny zkoušení

**test a přednáška**



# Osnova 1. přednášky

- Úvod
- Kvasinky – historie
- Výskyt a přenos
- Vztah k lidskému zdraví
- Význam pro biotechnologie a výzkum



Hustopeče u Břeclavi

# Informační zdroje

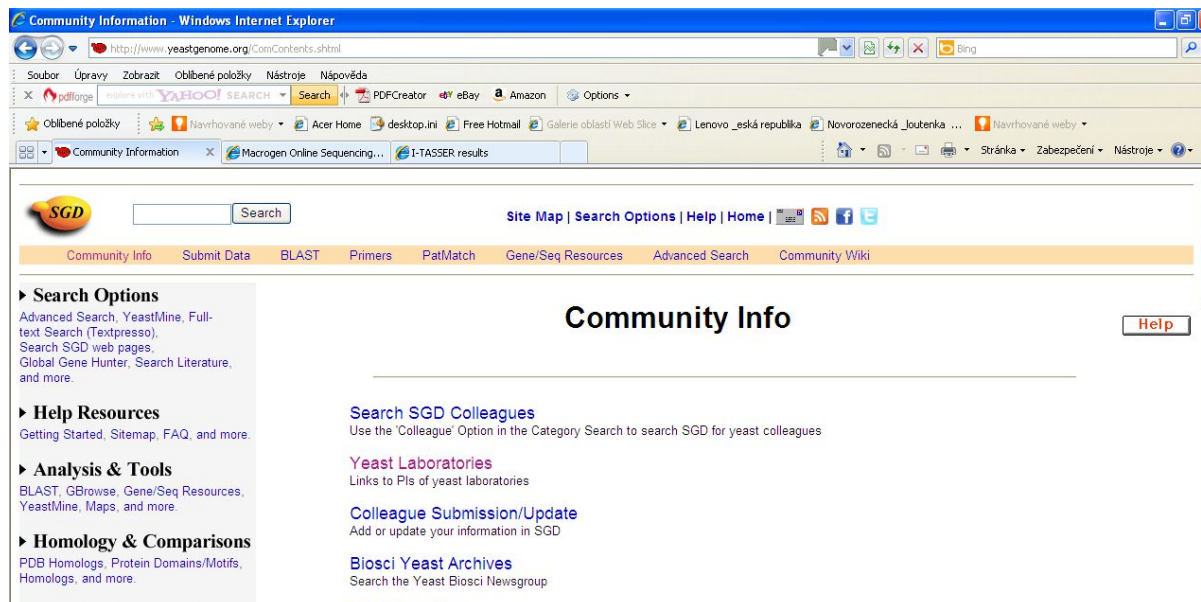
Janderová & Bendová: Úvod do biologie kvasinek, nakladatelství Karolinum (1999)

Hinnebusch & kol: YeastBook ([An Encyclopedia of the Reference Eukaryotic Cell](#), 2012-2016, Genetics: <http://www.genetics.org/content/yeastbook>)

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

... nejnovější články z časopisů Cell, Nature, Science, PNAS ... vždy uvedeny na stránce

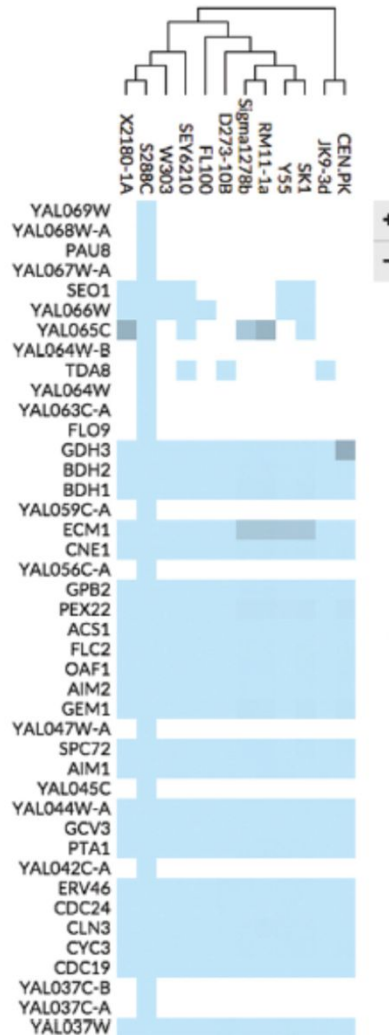
SGD databáze: <http://www.yeastgenome.org/>  
[http://wiki.yeastgenome.org/index.php/Commonly\\_used\\_strains](http://wiki.yeastgenome.org/index.php/Commonly_used_strains)



Cherry et al., NAR, 2012

## Variant Viewer

Enter gene name, GO term, or list of gene names



**Table 1. Genomes included in the initial release of the Variant Viewer**

Strain	SGD strain page URL
CEN.PK2-1Ca	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/CENPK/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/CENPK/overview</a>
D273-10B	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/D273-10B/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/D273-10B/overview</a>
FL100	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/FL100/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/FL100/overview</a>
JK9-3d	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/JK9-3d/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/JK9-3d/overview</a>
RM11-1A	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/RM11-1a/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/RM11-1a/overview</a>
Σ1278b-10569-6B	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/Sigma1278b/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/Sigma1278b/overview</a>
SEY6210	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/SEY6210/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/SEY6210/overview</a>
SK1	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/SK1/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/SK1/overview</a>
W303	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/W303/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/W303/overview</a>
X2180-1A	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/X2180-1A/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/X2180-1A/overview</a>
Y55	<a href="http://www.yeastgenome.org/strain/Y55/overview">http://www.yeastgenome.org/strain/Y55/overview</a>



www.pombase.org | The scientific resource for fission yeast - Windows Internet Explorer

http://www.pombase.org/ pombase yeast

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené položky Nástroje Nápověda

Google pombase yeast Hledat Sdílet Více >> Přihlásit

Oblíbené položky Program Proglasu hodinu za... Navrhované weby desktop.ini Free Hotmail Galerie oblastí Web Slice Lenovo \_eská republika Novorozenecká \_loutenka ... Navrhované weby

www.pombase.org | The scientific resource for fission...

# PomBase

The scientific resource for fission yeast

e.g. cdc2\* Search

Home Find Tools Submit Downloads Genome Status Community About Help

e.g. cdc2\* Search

News

Send HTP data to PomBase

MONDAY, 19TH AUG, 2013

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

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené položky Nástroje Nápověda

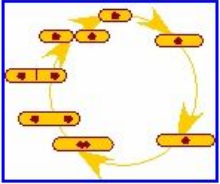
pdfforge explore with YAHOO! SEARCH Search PDFCreator eBay Amazon Options

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

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

## 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.

Switch View: **Summary** Sortable Table 18 PTM Sites

Displaying 101 total unique interactors

**NAB2** | YGL122C 9 1 [details]

Nuclear polyadenylated RNA-binding protein required for nuclear mRNA export and poly(A) tail length control; binds nuclear pore protein Mlp1p; autoregulates mRNA levels; related to human hnRNPs; nuclear localization sequence binds Kap104p

Experimental Evidence Code	Role	Publication	Throughput	Notes
Affinity Capture-MS	BAIT	Carmody SR (2010)	High Throughput	
Affinity Capture-RNA	BAIT	Batisse J (2009)	High Throughput	
Affinity Capture-Western	BAIT	Green DM (2003)	Low Throughput	-
	HIT	Vinciguerra P (2005)	Low Throughput	-
	BAIT	Batisse J (2009)	Low Throughput	-
Reconstituted Complex	BAIT	Grant RP (2008)	Low Throughput	-
	BAIT/HIT	Fasken MB (2008)	Low Throughput	-
Two-hybrid	BAIT	Green DM (2003)	Low Throughput	-
	HIT	Grant RP (2008)	Low Throughput	-
Synthetic Rescue	BAIT	Vinciguerra P (2005)	Low Throughput	

**MLP2** | YIL149C 1 5 [details]

Myosin-like protein associated with the nuclear envelope, connects the nuclear pore complex with the nuclear interior; involved in the Tel1p pathway that controls telomere length

**YRA1** | YDR381W, SHE11 2 2 [details]

RNA binding protein required for export of poly(A)+ mRNA from the nucleus; proposed to couple mRNA export with 3-prime end processing via its interactions with Mex67p and Pcf11p; functionally redundant with Yra2p, another REF family member

Hotovo

Start



## Opening Lecture

Yoshinori Ohsumi (*Japan*), 2016 Nobel Prize Laureate

## Keynote Lectures

Terrance G. Cooper, Alan G. Hinnebusch, Reed B. Wickner (*USA*)

## EMBO Keynote Lecture

Franz-Ulrich Hartl (*Germany*)

### Symposia Speakers

Charles A. Abbas (*USA*)  
Yves Barral (*Switzerland*)  
Maria Bohnert (*Israel*)  
Eckhard Boles (*Germany*)  
Dana Branzei (*Italy*)  
Michael Breitenbach (*Austria*)  
Jason H. Brickner (*USA*)  
Claudio De Virgilio (*Switzerland*)  
John Diffley (*United Kingdom*)  
Jean Marie François (*France*)  
Judith Frydman (*USA*)  
Sue Jinks-Robertson (*USA*)  
James Konopka (*USA*)  
Grzegorz Kudla (*United Kingdom*)  
Per Ljungdahl (*Sweden*)

Olivier Namy (*France*)  
Jens Nielsen (*Sweden*)  
Zdena Palková (*Czech Republic*)  
Graham D. Pavitt (*United Kingdom*)  
Markus Ralser (*United Kingdom*)  
Andreas S. Reichert (*Germany*)  
Manuel Santos (*Portugal*)  
Elmar Schiebel (*Germany*)  
Roger Schneiter (*Switzerland*)  
Chris Stefan (*United Kingdom*)  
Katja Sträßer (*Germany*)  
Lorraine Symington (*USA*)  
Johan Thevelein (*Belgium*)  
Lidia Vasiljeva (*United Kingdom*)

### Workshop Chairs

Bruno Andre (*Belgium*)  
Kathryn Ayscough (*United Kingdom*)  
Charles Boone (*Canada*)  
Yury Chernoff (*USA*)  
Patricia Kane (*USA*)  
Diethar Mattanovich (*Austria*)  
Steve Oliver (*United Kingdom*)  
Katja Sträßer (*Germany*)  
Joseph Schacherer (*France*)



## 28<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB)

August 27 – September 1, 2017  
Prague, Czech Republic



# Témata symposií a workshopů

Regulation of Gene Expression

RNA processing and regulation

Metabolism and stress response

Organelle dynamics

Cellular strategies of protein quality control

**DNA replication, mutation and repair**

Cell cycle, cytoskeleton and morphogenesis

Modern yeast biotechnology

**New tools in yeast research - omics**

Yeast population, comparative and evolutionary genomics

Systems biology and bioinformatics

Proteostasis, ageing and disease models

Yeast pathogens and host interaction



28<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB)

August 27 - September 1, 2017

Prague, Czech Republic



# Kvasinkáři

- Brno – prof. Svoboda, ... doc. Paleček
- Praha – prof. Pálková, Dr. Hašek, Dr. Valášek ...
- SR - Bratislava – prof. Tomáška, prof. Nosek ...
- UK – prof. Nurse, prof. Carr ...
- USA – prof. Schekman, prof. Forsburg ...

Pombelist Subscribers

View this page in English (USA)

Click on your address to visit your subscription options page.  
(Parenthesized entries have list delivery disabled.)

<b>859 Non-digested Members of Pombelist:</b>	<b>289 Digested Members of Pombelist:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <a href="mailto:a.bianchi@sussex.ac.uk">a.bianchi at sussex.ac.uk</a></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <a href="mailto:136197@mail.muni.cz">136197 at mail.muni.cz</a></li></ul>

<http://listserver.ebi.ac.uk/mailman/listinfo/pombelist> - *S. pombe*

<http://www.yeastgenome.org/cache/yeastLabs.html> - *S. cerevisiae*

# ... trochu (pre)historie

- přirozeně v prostředí mohou fermentovat sladké šťávy (např. nektar ...)
- lidé vyráběli nápoje podobné dnešnímu pivu a vínu již před ~9000 lety (Čína), chleba před ~4000 lety
- ve středověku v Evropě kvasily slad – název yeast pochází z německého *Gischt*/holandského *Gist* (název pro pěnu na povrchu kvasných produktů – „Ale“ se *svrchním kvašením* - používaná pro re-inokulaci nového kvašení)
- v Čechách se vařilo pivo od 9.století (kníže Václav zakázal vývoz chmelu pod trestem smrti)
- roku 1516 v Bavorsku poprvé definovali co a kdy se smí použít pro vaření piva (ječmen, voda a chmel – v období od 29.9. do 23.4. kvasinky brali jako vedlejší produkt)
- v letním období skladováno v jeskyních na ledu (skladování a chladné prostředí – kvasinky pro „Lager“ se *spodním kvašením*)

dle NGS  
původem z Číny



Lager – *Saccharomyces pastorianus*

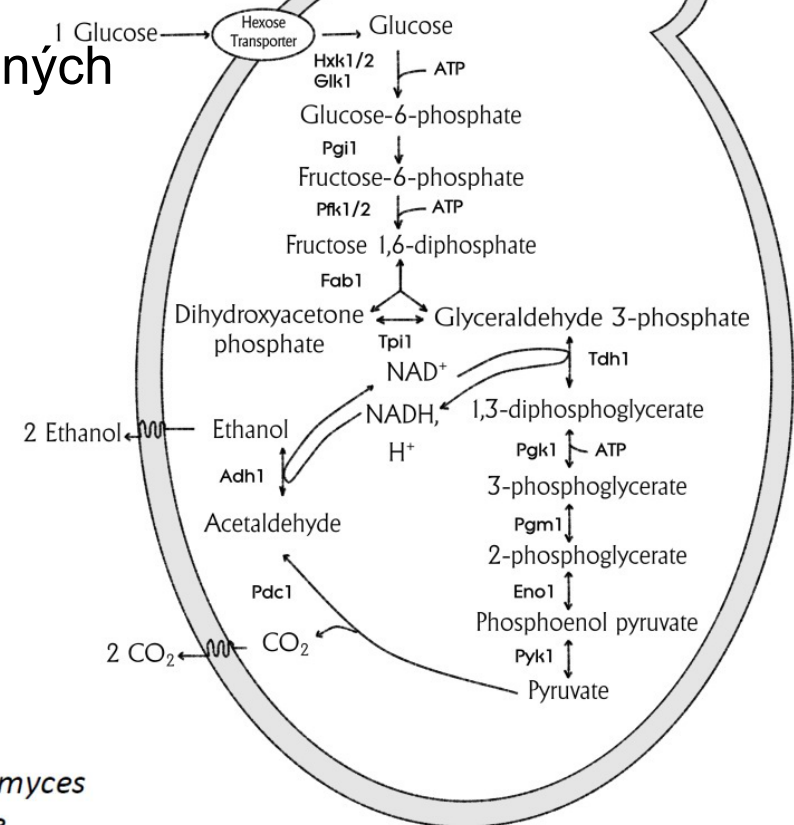
Monerawela a Bond, Biotech Adv, 2017



# ... trochu (experimentální) historie



- poprvé kvasinky pozoroval A. van Leeuwenhoek v roce 1680
- L. Pasteur prokázal aktivní účast při kvašení (polovina 19. století) – řešil problém francouzských vinařů s „kažením vína“ – zjistil, že k fermentaci dochází za anaerobních podmínek (Pasteurův efekt – lepší růst)
- název Zuckerpilz („cukerná houba“) tj. *Saccharomyces* od roku 1837 (Schwann)
- první čisté kultury *S. pastorianus* izolovány z piva (E.Ch.Hansen, Carlsberg) a *S.c.* z vína (Muller-Thorgau) v 80. letech 19. století (*cerevisiae* = pivo v latině, *pombe* = pivo ve swahili)
- Buchner připravil roku 1897 šťávu z rozdrcených kvasnic, prostou buněk (cukr byl touto „šťávou“ zkvašován – zymáza – základy oboru **biochemie**) – Nobelova cena (1907)
- Harden zkoumal enzymy účastnící se procesu kvašení a v roce 1906 objevil i nebílkovinné složky kozymázy tzv. koenzymy



Lager – *Saccharomyces pastorianus*

Monerawela a Bond, Biotech Adv, 2017



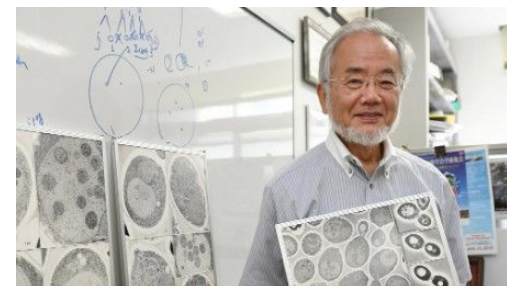
Ale – *Saccharomyces cerevisiae*

## ... trochu (vědecké) historie

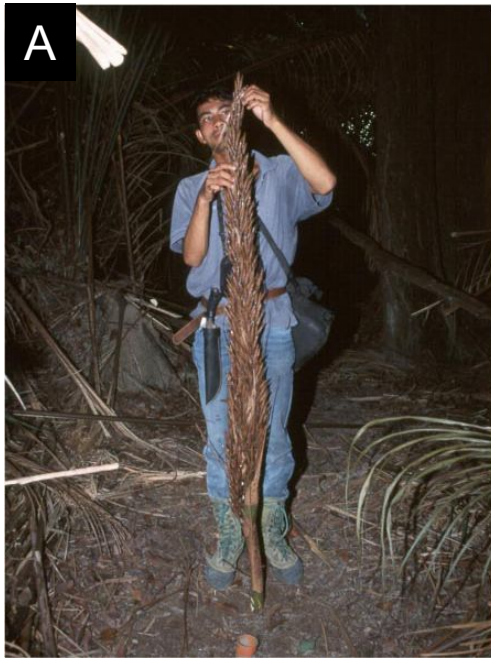
- první systém pro klasifikaci (patogenních) kvasinek, založený na morfologii buněk a několika fyziologických testech (fermentace monosacharidů) vytvořil A. Guilliermond v roce 1912
- v Československu prof. Kratochvilová ...
- v 70. letech 20. století se začaly kvasinky využívat jako modelový eukaryotický organismus v molekulární biologii (navazoval na výzkum bakterií a bakteriofágů)
- nejintenzivněji studovanou eukaryotní buňkou byly kvasinky *S.cerevisiae* (USA) a *S. pombe* (UK, Japonsko)
- Nobelova cena: za výzkum buněčného cyklu - 2001 – **Hartwell**, Hunt, **Nurse**; za sekreci – 2013 – **Schekman**, za autofagii – 2016 – **Ohsumi**)
- *S. cerevisiae* první kompletně osekvenovaný eukaryotní genom (1996, *S. pombe*, 2002; v současnosti osekvenovány desítky druhů a stovky kmenů kvasinek)
- v současnosti několik set laboratoří na světě využívá *S. pombe* ...



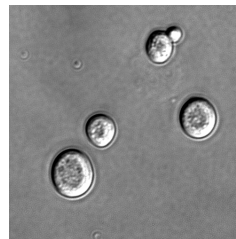
Fantes a Hoffman, Genetics, 2016



- savci pili alkoholický nektar miliony let



- *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

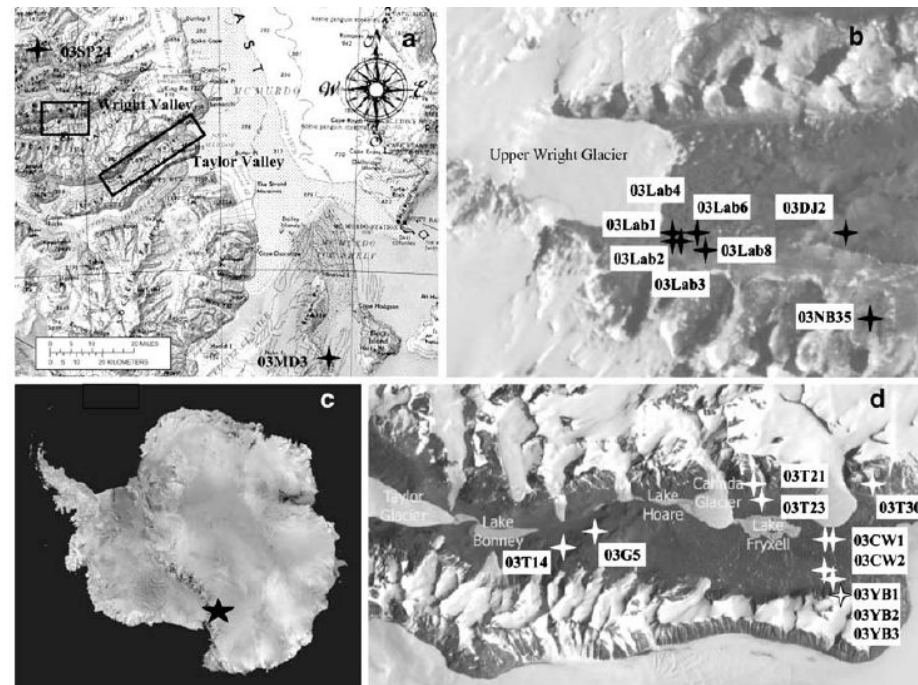


# Přirozený výskyt

- **ve vodě** (dle čistoty – moře 10/l, jezera 100/l, odpadní až 10<sup>8</sup>/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*, *Pichia*, *Cryptococcus*, schopny hydrolyticky štěpit celobiosu, 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> <sup>a</sup>	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> <sup>a</sup>	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

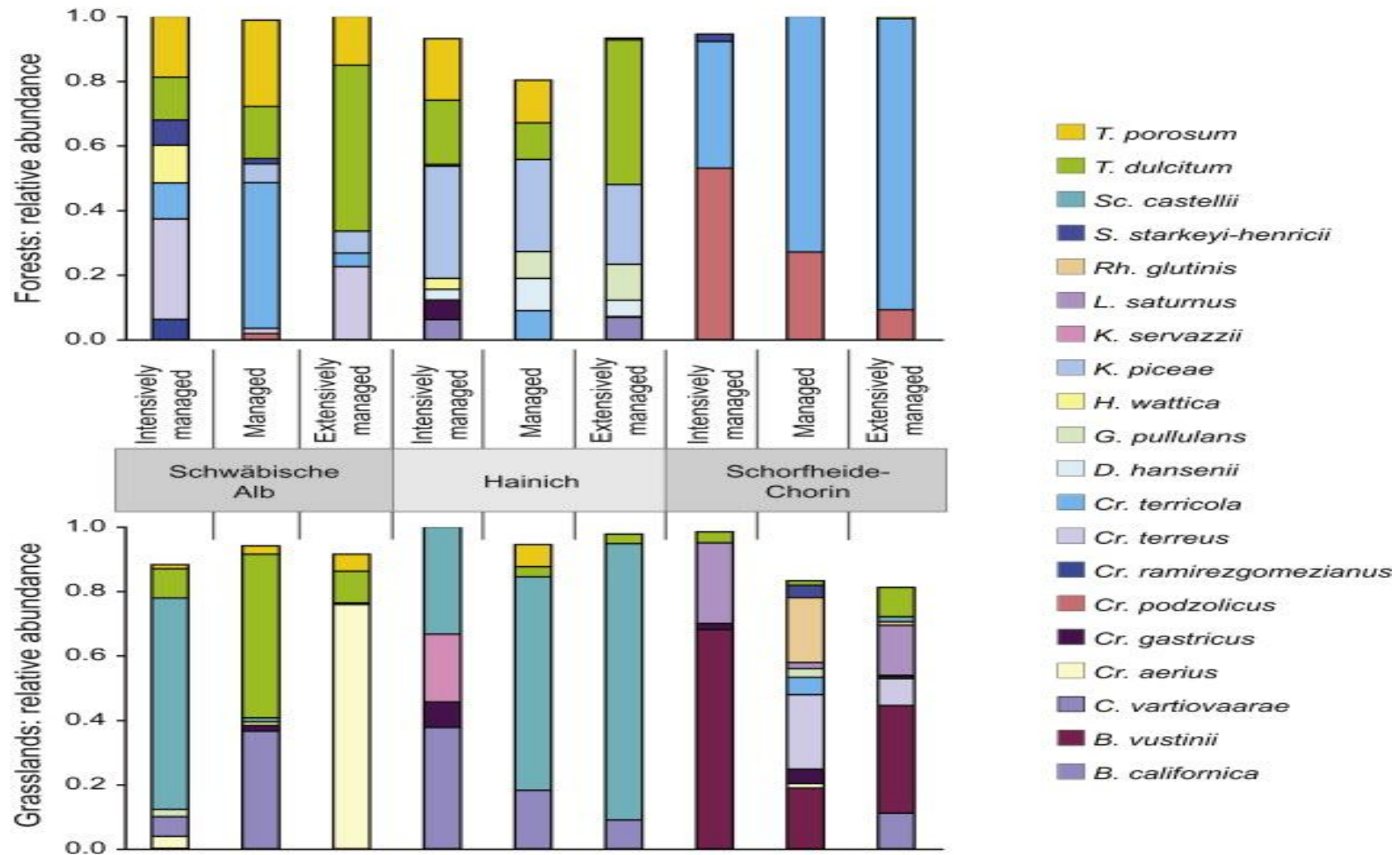
<sup>a</sup>Members of Ascomycota

\* Nově objevené kvasinkové druhy

# Půda a kvasinky

- Typ vegetace → složení půdních mikrobiálních komunit
- Kvasinky jsou kosmopolitní (většinou autochtonní, kromě kmenů výrobních)
- Množství a druhové složení kvasinek v půdách je nerovnoměrné (více v asociaci s rostlinami) – ovlivňuje mnoho faktorů
- Nejsou primárními degradátory těžko rozložitelných látek (lignocelulóza), ale degradátoři meziproductů rozkladu rostlinného materiálu (aerobní rozklad L-arabinózy, D-xylózy, celobiózy)
- Transformace živin
  - Koloběhy C, N, S, P v ekosystému
  - Aerobní respirace i fermentace živin
  - Nitrifikace = přeměna amoniaku na dusičnany (rody *Candida*, *Geotrichum*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Williopsis*)
  - Sulfurikace = oxidace síry na sírany, thiosírany (rody *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Williopsis*)
  - Rozpouštění těžko rozložitelných fosforečnanů (rody *Rhodotorula* a *Williopsis*) → podporuje růst rostlin





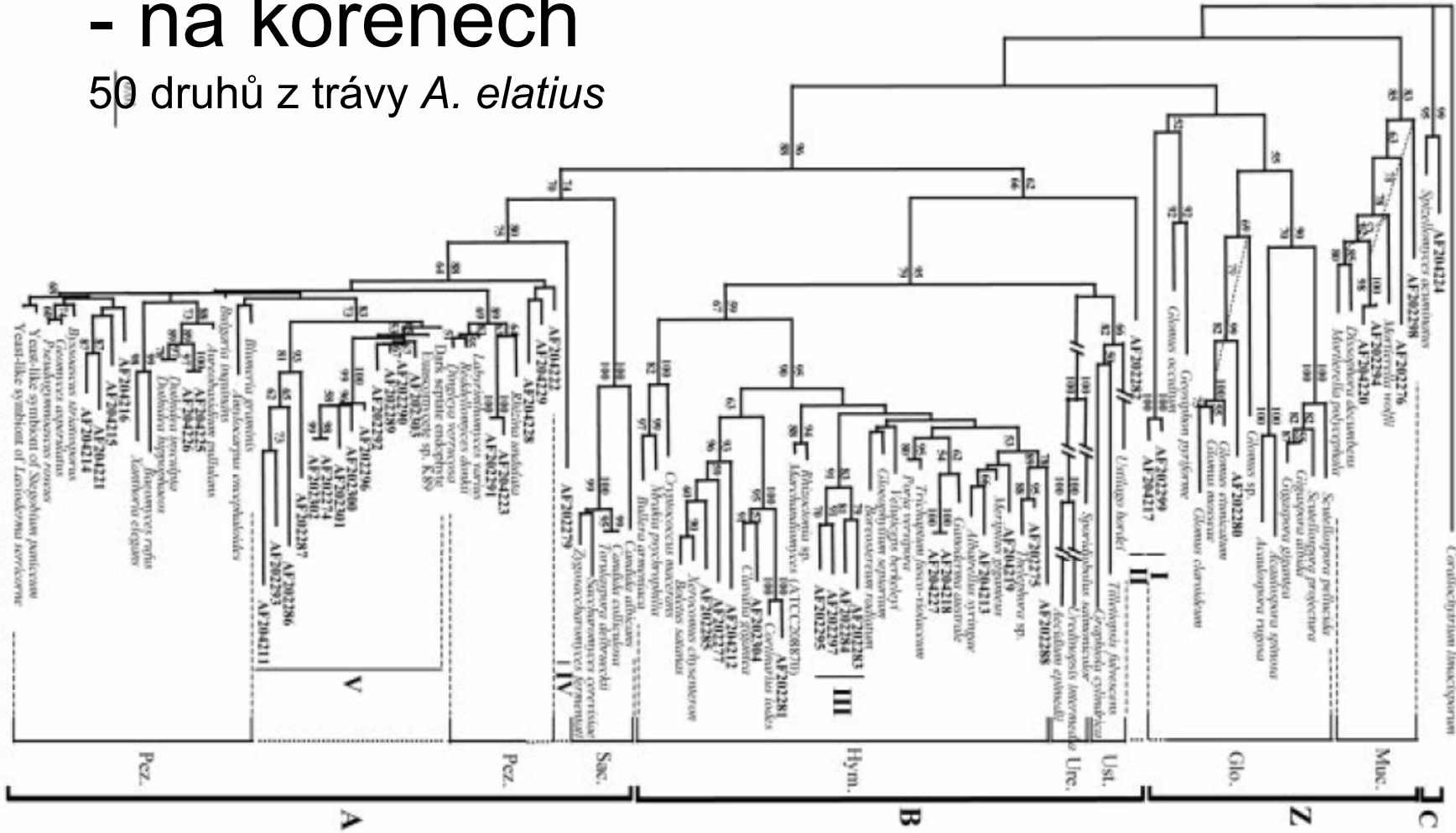
- Nerovnoměrné (komplexní) rozložení kvasinek
- Pokryv půdy má velký vliv na diverzitu a množství půdních kvasinek (lesy x pastviny), stejně tak i lidská činnost (oblasti zemědělsky a lesnický využívané x přirozené)

# Rostliny a kvasinky

- na listech rostlin, květech (nektar palmy Bertramové ... červené kvasinky rodu *Rhodotorula*, *Rhodosporeidium*, *Sporobolomyces*, černá *Aureobasidium pullulans*,)

- na kořenech

50 druhů z trávy *A. elatius*



# Rostliny a kvasinky

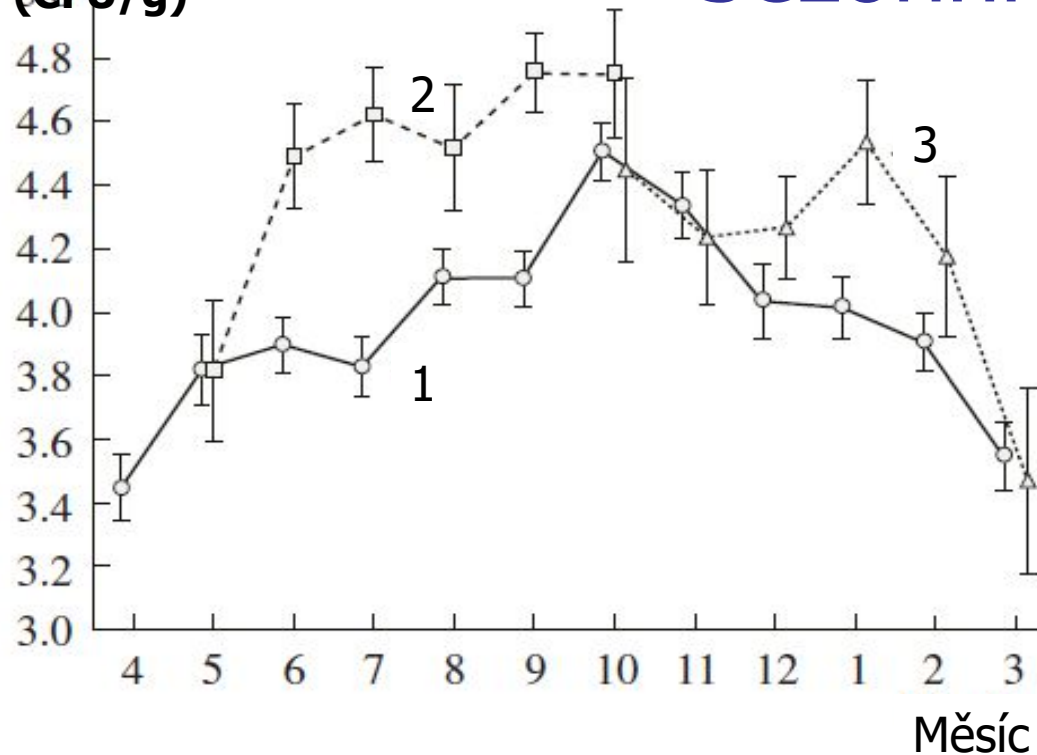
- především na kazících se plodech

(na spadlých rozkládajících se plodech ... schopny hydrolyticky štěpit celobiosu, lignin nebo produkty bakteriálního metabolismu - zahrávající kaktusy => pektolytické bakterie => kvasinky *Pichia cactophila*, *P. opuntiae* => přenos a výživa drosofila)



# Sezónní dynamika kvasinek

Počet kvasinek, log (CFU/g)



1 – listy

2 – květy

3 – hrabanka

Glushakova & Chernov, Microbiology, 2007

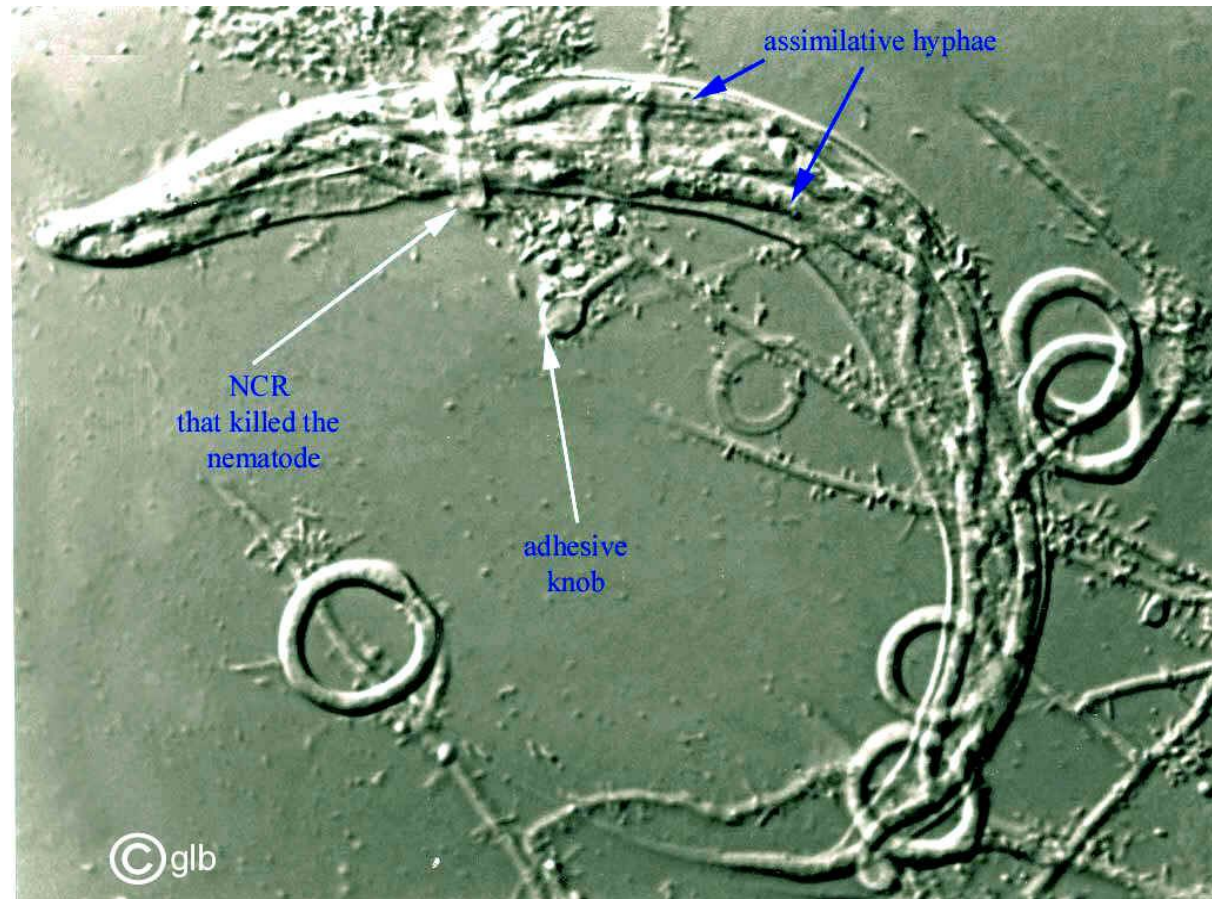
- Rozpouštění nerozpustné fosforečnany ... → podpora růstu kořenů (stimulátory růstu a biohnojiva)
- Symbionti nebo paraziti
- Interakce s houbami
  - Exocelulární polymery (glykolipidy, glykoproteiny) s fungicidními a fungistatickými účinky
  - Extracelulární enzymy (glukanázy)
  - Mykociny (proteiny)

# Interakce s živočichy

- Kvasinky a jejich extracelulární polymery a jednoduché metabolity → zdroj potravy pro jiné organismy
- Predátorské kvasinky *Saccharomycopsis fermentans* a *Saccharomycopsis javanensis*
- Okyselování prostředí → regulace počtu některých bezobratlých

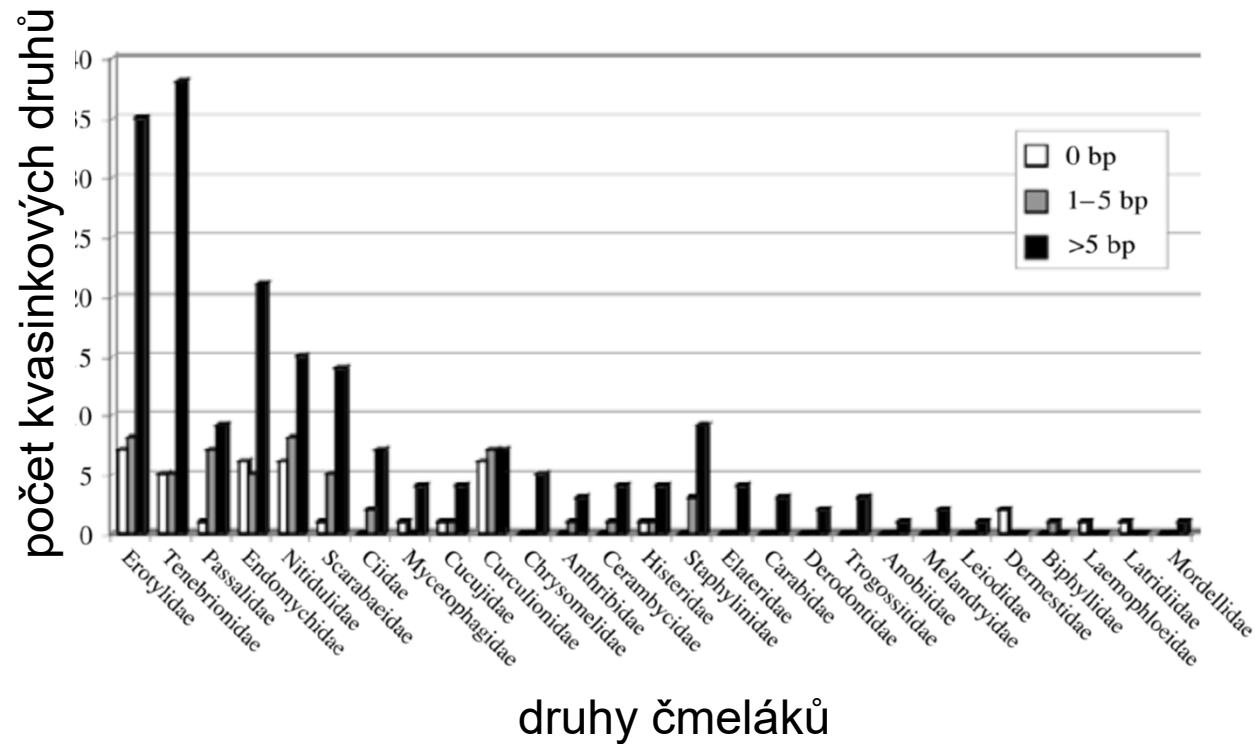


Predátorská kvasinka  
(*Dactylellina candida*)  
napadající hlístici  
(<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/2008/dactylel.htm>)



# Hmyz a kvasinky

- přenášeny hmyzem (opylovači) - včely, brouci, mouchy





# Hmyz a kvasinky

- kvasinky 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: hmyz slouží jako vektor umožňující kvasinkám osidlovat nová prostředí, přičemž zvýšená rekombinace zvyšuje šance na přežití a adaptaci na ně

Sandhu & Waraich, Microb. Ecol., 1985



# Kvasinky a savci

- *Tana pestroocasá* pije fermentovaný nektar z květu Bertramovy palmy ...
- i člověku se dostávají kvasinky do trávicího traktu např. při konzumaci burčáku, nefiltrované pivo ... neškodné pro zdravé jedince (! ale co pro imunokompromitované jedince?)



- nejčastěji je z gastrointestinálního traktu izolována *C. albicans* (*C. dubliensis*)
- kvasinky tvoří jen malou část stálé mikroflóry ve střevě - méně než 0,1 % mikroflóry
- kůže, ústní dutina, sputum, vaginální sekrety, výtěry z ušního kanálu, moč, stolice ...

# Patogenní kvasinky

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

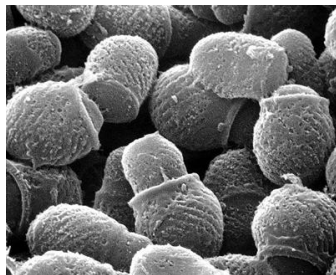
-**Kandidózy** (*C. albicans*, *dublinskiensis*, *krusei*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *glabrata*, *utilis*, *lipolytica*)

-*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)

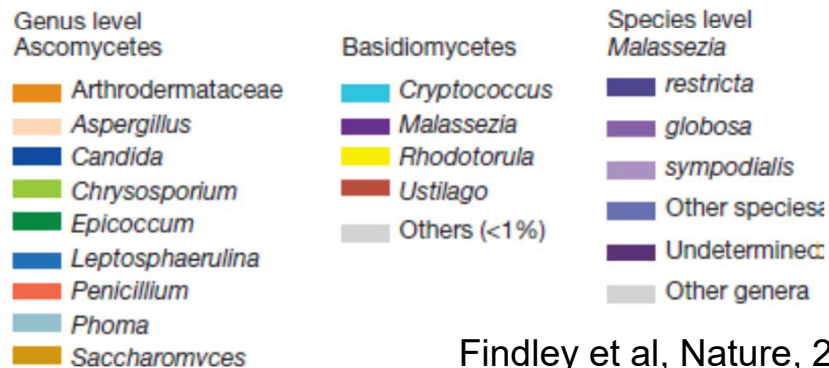
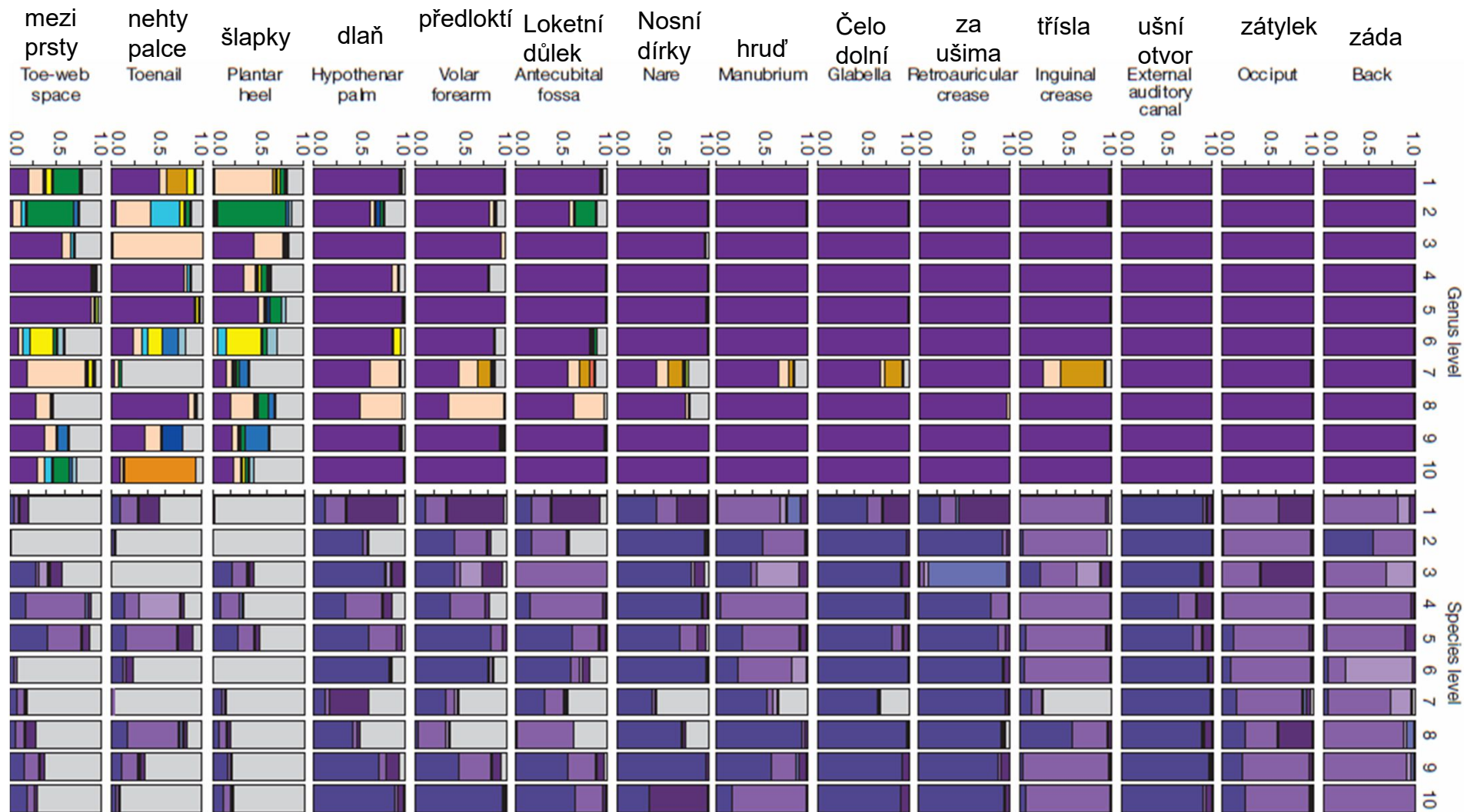
-*Malassezia* – poruchy pigmentace kůže a lupy tzv. **pityriázy** (*M. furfur*, *globosa*, *japonica*, *obtusa*, *restricta*, *yamatoensis*, *dermatis*, *slooffiae*, *sympodialis*, *nana*, *pachydermatis*)

-3 druhy *Trichosporon* (kůže)



*Malassezia furfur*  
pityriasis versicolor





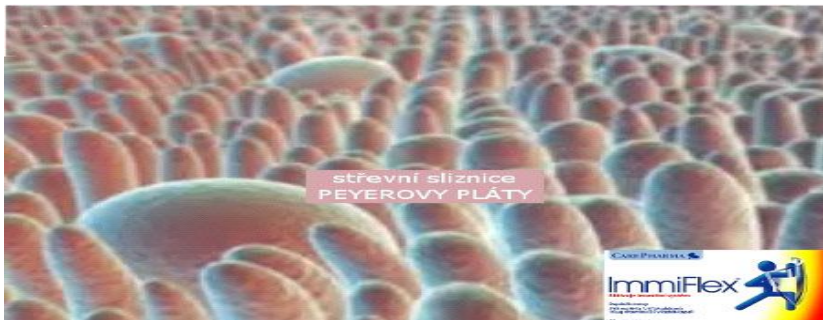
## mikrobiom

- sekvenace vzorků od 10 zdravých jedinců
- ruce, nos, uši, záda, třísla ... *Malassezia*
- zatímco na nohou velká diverzita

# Význam pro zdraví člověka

- 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 (neutrofilů) a zvyšují tak obranyschopnost organismu



Murzyn et al., 2010, FEMS Microbiol Lett.



- *Saccharomyces boulardii* – izolován z čínské švestičky 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 ...

- exprese proteinů - příprava „hepatitis B core“ antigenu, insulin (*S. cerevisiae*), anti-thrombin proti srážení krve (*Pichia pastoris*)

# Význam pro zdraví člověka

The screenshot shows the GenScript website in a Windows Internet Explorer browser. The address bar displays the URL: [http://www.genscript.com/custom\\_protein\\_yeast\\_expression.html?src=email2013123137&logId=68148090&email=&brandId=&type=&c=1&ret=true](http://www.genscript.com/custom_protein_yeast_expression.html?src=email2013123137&logId=68148090&email=&brandId=&type=&c=1&ret=true). The website header includes the GenScript logo with the tagline "Make Research Easy", a "Worldwide" globe icon, and language selection options (En, De, Es, Fr, 日本語). A search bar and navigation links (Log In, Place Order, My Cart, Contact, Overview) are also present. The main navigation menu includes Home, Services, Products, Resources, Promotions, and Company. The left sidebar lists various protein services, including Key Technologies for Protein Expression and Purification, BacPower™, PROtential Protein Expression Evaluation Services, InsectPower™, Bacterial Expression System, Yeast Expression System, Insect Expression System, Mammalian Cell Expression, Chemical Protein Synthesis, High-throughput Protein Variants Service, Kinase Activity Assay, Structural Biology Services, Large Scale Protein Production Service, ProtBank™ Protein Database, and Case Studies. The main content area features a large banner for the YeastHIGH™ Yeast Expression System, described as an "Economic solution for eukaryotic protein production". The banner includes a list of key features: Proprietary YeastHIGH™ technology, Advanced platform for producing humanized antibodies, and Large-scale eukaryotic protein production, up to 500 L. Below the banner, there is a "Get a Quote Now" button with the text "Via email, phone, or fax". The page also includes a breadcrumb trail: "You are here: Biology CRO for Drug Discovery » Protein Services » Yeast Expression System". The browser's taskbar at the bottom shows several open applications, including "Doručená pošta - Mo...", "Psaní zprávy: Re: pre...", "Psaní zprávy: Re: Po...", "slovník.cz - Multilingu...", "Recombinant Protein ...", and "Dílčí zpráva 140113.d...". The system clock shows the time as 7:04.

- exprese proteinů - příprava „hepatitis B core“ antigenu, anti-thrombin proti srážení krve (*Pichia pastoris*) – farmaceutický průmysl (20% produktů v kvasinkách)

# Průmyslový význam



Mgr. J. Kopecká



- 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 amylolytickými 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 <sup>2+</sup>	<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 <sup>2+</sup>	<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 <sup>2+</sup>	<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 <sup>2+</sup>	<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 <sup>2+</sup>	Protonované biomasy: <i>Bacillus lentus</i> (≈ 30)> <i>Aspergillus oryzae</i> > <i>S. cerevisiae</i> (<5)
Cu <sup>2+</sup>	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).

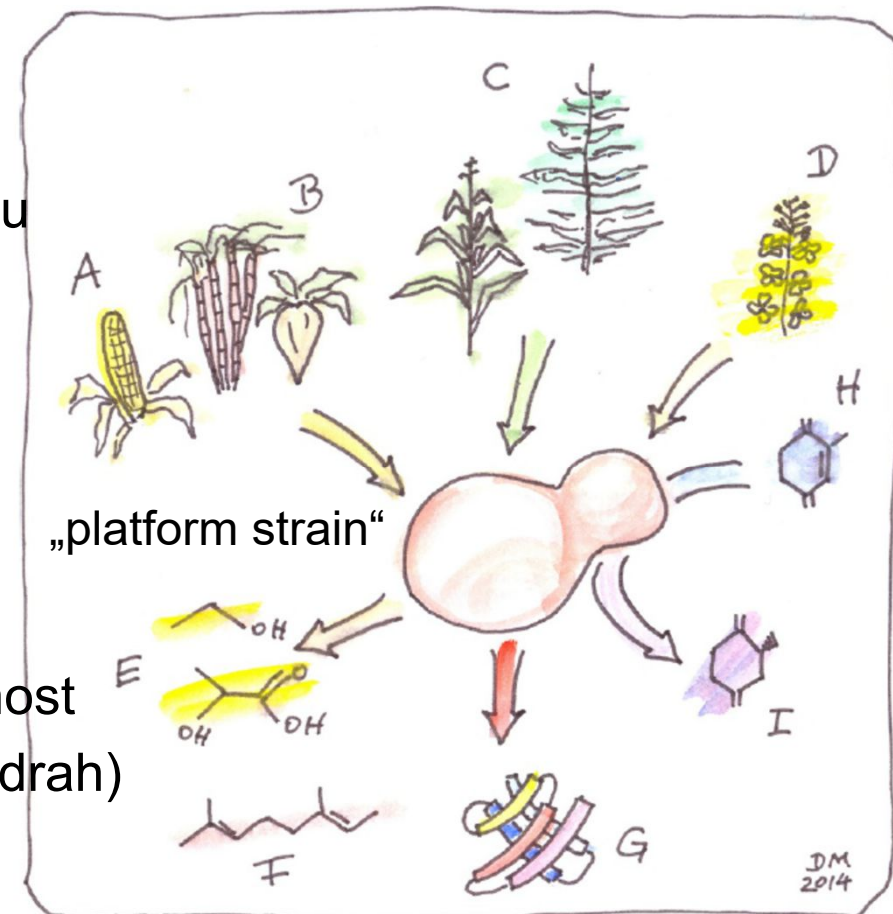
- též v příští přednášce

- kvasinky byly po tisíciletí hlavním mikroorganismem „biotechnologií“
- v polovině 20. století nástup bakteriálních technologií
- kvasinky (díky detailnímu poznání ...) opět nabývají na významu: produkce metabolitů, produkce rekombinantních proteinů, *in vivo* biotransformace
- *S. cerevisiae* – hlavní metabolismus glukosy vede k produkci etanolu (jiné druhy nejsou tak efektivní a užívají i jiné metabolické dráhy ... v přírodě není běžná vysoká konc. glukosy)

výhody kvasinek: vysoká rychlost  
 „pohlcování“ substrátů a metabolismu  
 velmi odolné vůči stresu

- butanol (lepší než etanol), kyselina mléčná, isoprenoidy (Artemisinin – antimalarikum)

sekvence genomů mnoha kvasinek  
 (vhled do jejich metabolismu – možnost využití heterologních metabolických drah)



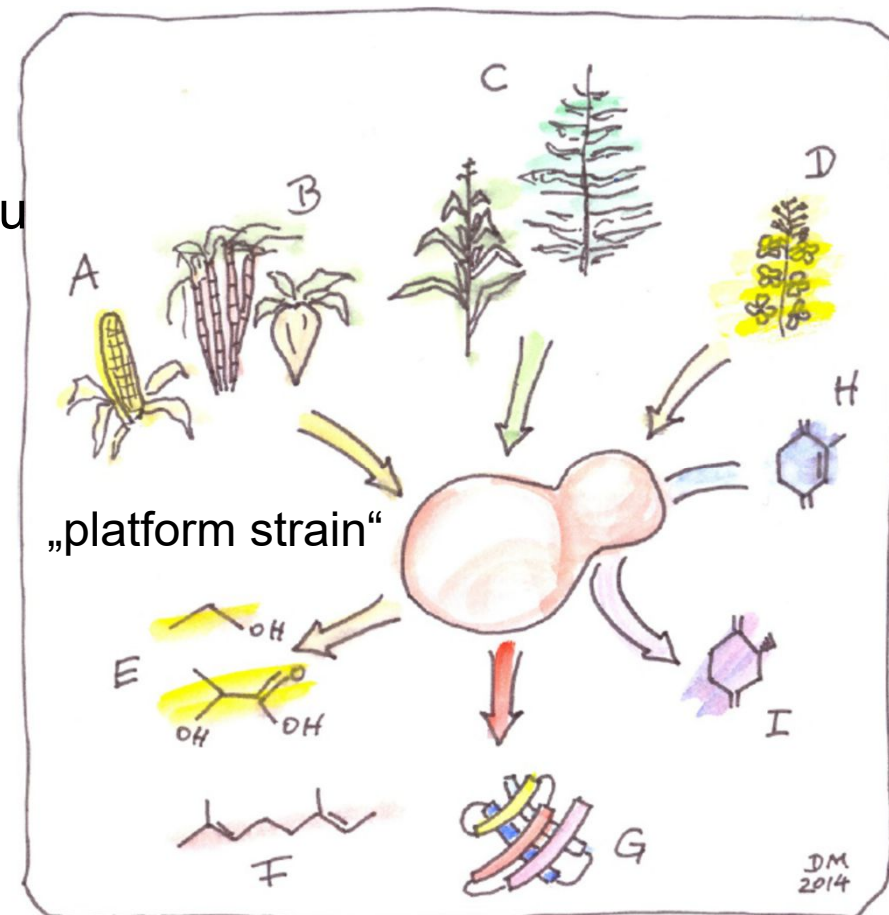


- kvasinky byly po tisíciletí hlavním mikroorganismem „biotechnologií“
- v polovině 20. století nástup bakteriálních technologií
- kvasinky (díky detailnímu poznání ...) opět nabývají na významu: produkce metabolitů, produkce rekombinantních proteinů, *in vivo* biotransformace
- *S. cerevisiae* – hlavní metabolismus glukosy vede k produkci etanolu (jiné druhy nejsou tak efektivní a užívají i jiné metabolické dráhy ... v přírodě není běžná vysoká konc. glukosy)

výhody kvasinek: vysoká rychlost  
 „pohlcování“ substrátů a metabolismu  
 velmi odolné vůči stresu

*Pichia pastoris* (syn. *Komagataella pastoris*), *Hansenula polymorpha* (syn. *Ogataea parapolyomorpha*), *Yarrowia lipolytica*, *Pichia stipitis* (syn. *Scheffersomyces stipitis*), *Kluyveromyces marxianus*

Mattanovich et al, Microbiol Cell Factories, 2014

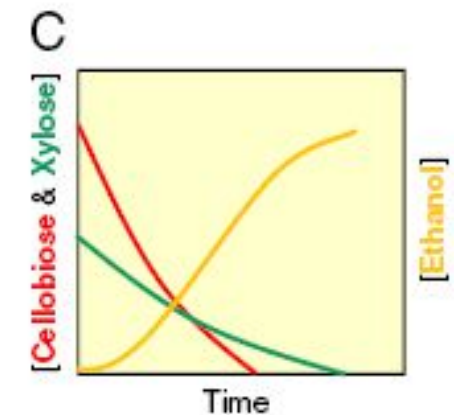
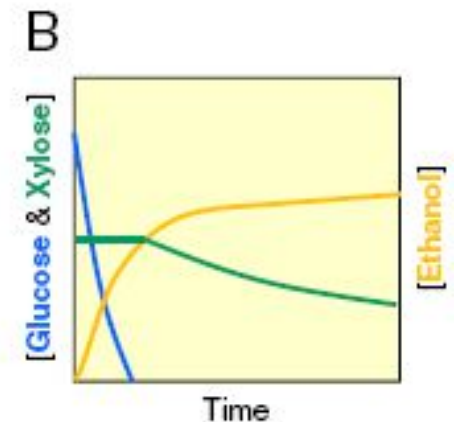
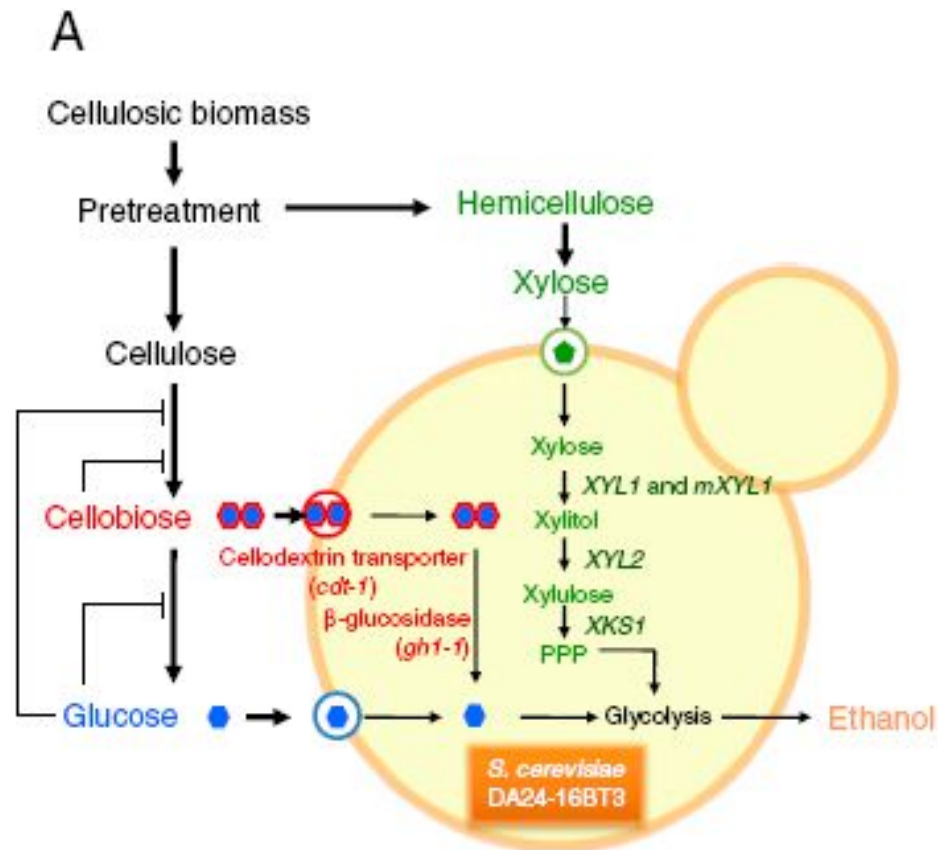


# Využití *S. cerevisiae* pro výrobu biopaliv

- Nemají přirozenou metabolickou dráhu pro odbourání celobiosy a xylozy
- Vloženy geny *XYL1* and *XYL2* kódující xylózovou reduktázu (XR) a xylitolovou dehydrogenázu (XDH) z kvasinky *Pichia stipitis*
- Přednostní využívání glukózy (*glukózová represe v dalších přednáškách*)
- Transport celobiosy do buňky (*cdt-1* integrován do genomu) a jeho přeměna na glukózu uvnitř buňky (*gh1-1* z *Neurospora crassa* na „multicopy“ plazmidu) obešla represi



- Více v dalších přednáškách



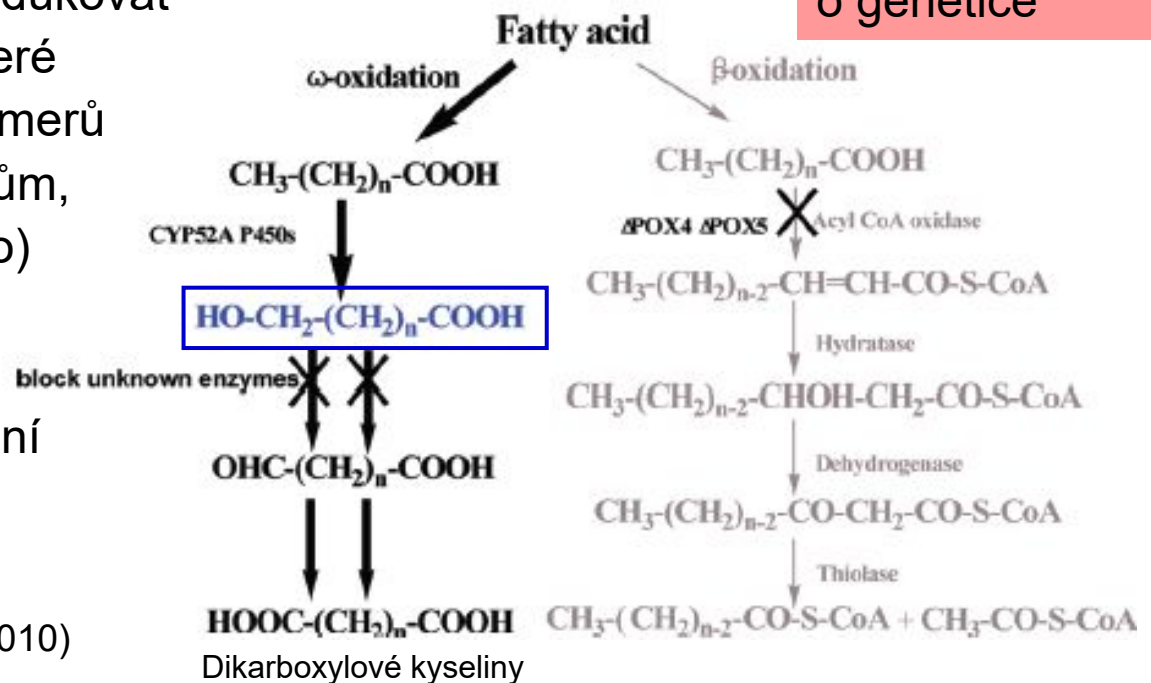
# Příprava monomerů pro výrobu plastů – využití *Candida tropicalis*

- *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- mutantní kmen (P450:  $\Delta$ POX4 ...) není schopen  $\beta$ -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 (alkohol oxidázy) a dehydrogenás (alkohol dehydrogenás) aby eliminovali  $\omega$ -oxidaci
- nový kmen je schopen produkovat

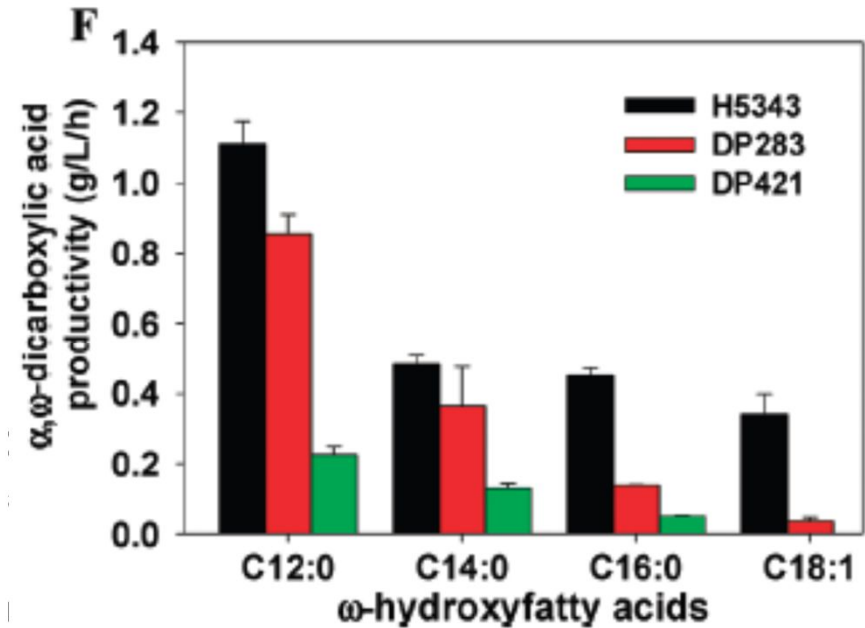
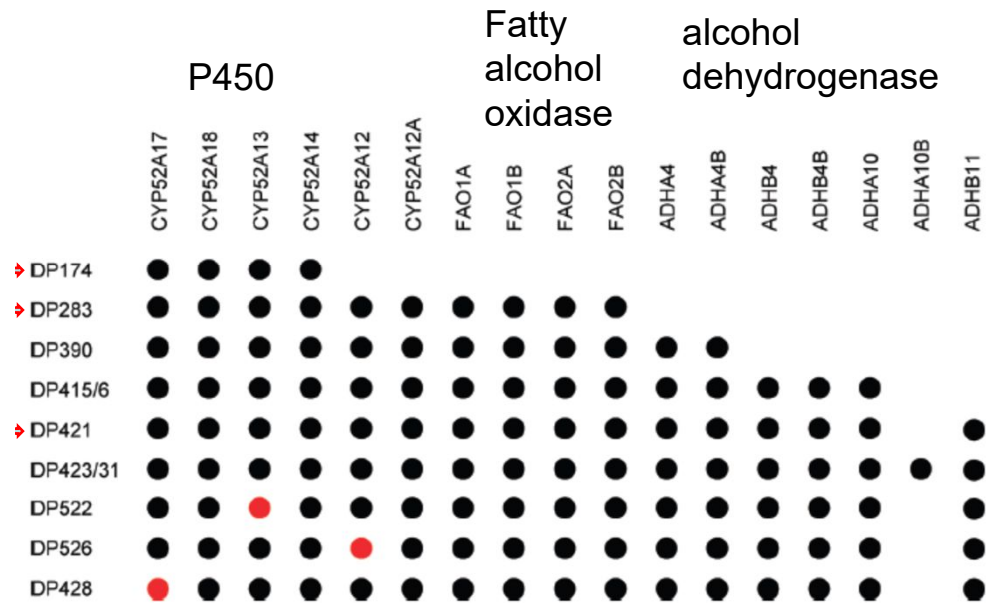
$\omega$ -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenům, bio-odbouratelné na bio-palivo)

- další modifikace kmene (integrace genů pro lipázy) by umožnilo přímé odbourávání odpadních olejů ...

Lu et al., JACS (2010)

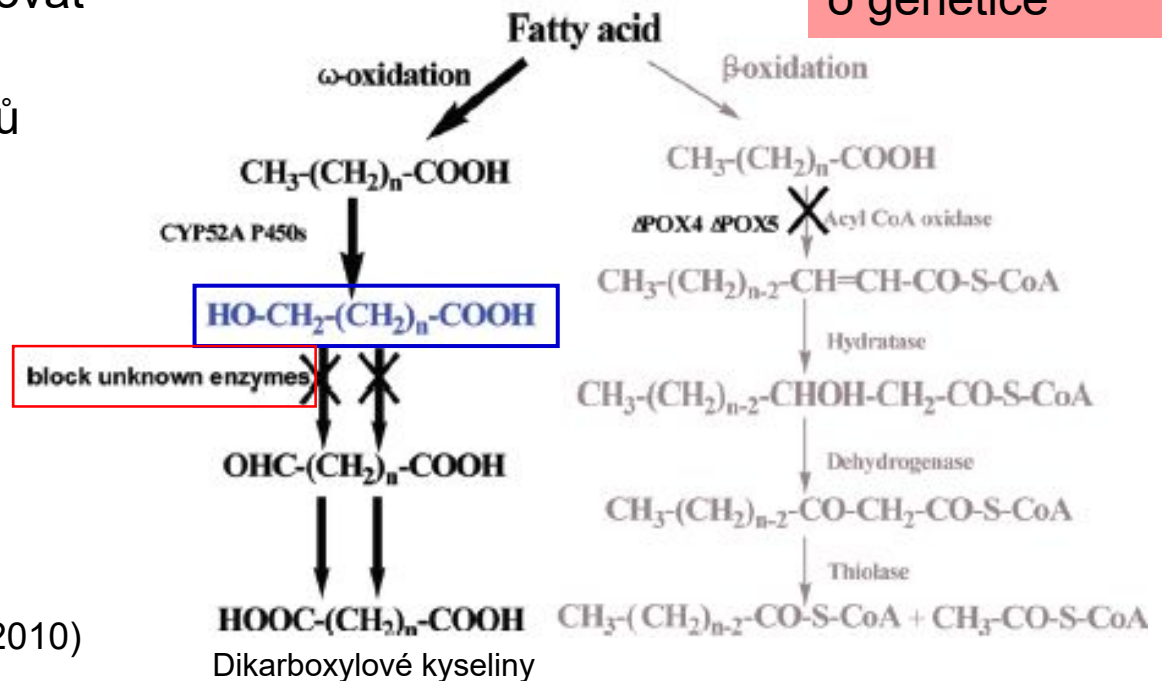


Přednáška  
o genetice



- nový kmen je schopen produkovat  $\omega$ -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 ...

Lu et al., JACS (2010)



Přednáška o genetice

# Výzkum

- Je třeba kvasinkám rozumět (na molekulární úrovni), aby bylo možné je využít např. pro biotechnologie, výzkum (od jednoduchých základních mechanismů ke studiu složitějších ... až k objasňování lidských nemocí)
- *S. cerevisiae* a *S.pombe* jsou modelovými organismy
  - jednoduchá eukaryotní buňka (základní procesy jako u vyšších eukar.)
  - 1. osekvenovaný eukaryotní genom, 1. syntetický eukar. chromosom (cca 3000 z 5000 genů je konservováno v eukaryotech)
  - buněčný cyklus (sir P. Nurse)
  - sekrece, endocytóza, buněčná stěna (prof. Schekman, prof. A. Svoboda)
  - chromosomy a evoluce (např. projekt syntetického chromosomu)
  - mechanismy opravy poškozené DNA (nádorové syndromy)

Human homologs		
Yeast	Human	Cancer syndrome
MEC1/TEL1	ATR/ATM	Ataxia telangiectasia
MRE11	MRE11	Ataxia telangiectasia-like disorder
XRS2	NBS1	Nijmegen breakage syndrome
RAD53/DUN1	hCHK2	Li-Fraumeni syndrome
SGS1	BLM/WRN/RTS	Bloom, Werner & Rothmund-Thomson syndromes

Srovnání 250 sekvencí lidských genů, jejichž mutace vedou ke vzniku onemocnění – cca 90 genů má S.c. homology

- Metody využívající kvasinek (např. 2-H, reporterové systémy)

# Výzkum

- buněčný cyklus, ... mechanismy opravy poškozené DNA

**Table 4 *Schizosaccharomyces pombe* genes related to human cancer genes**

Human cancer gene	<i>S. pombe</i> gene/product	Systematic name
Xeroderma pigmentosum D; <i>XPB</i>	rad15, rhp3	SPAC1D4.12
Xeroderma pigmentosum B; <i>ERCC3</i>	rad25	SPAC17A5.06
Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC); <i>MSH2</i>	msh2	SPBC24C6.12C
Xeroderma pigmentosum F; <i>XPF</i>	rad16, rad10, rad20, swi9	SPCC970.01
Immunodeficiency; DNA ligase 1	cdc17	SPAC57A10.13C
HNPCC; <i>PMS2</i>	pms1	SPAC19G12.02C
HNPCC; <i>MSH6</i>	msh6	SPCC285.16C
HNPCC; <i>MSH3</i>	swi4	SPAC8F11.03
HNPCC; <i>MLH1</i>	mlh1	SPBC1703.04
Haematological Chediak–Higashi syndrome; <i>CHS1</i>	–	SPBC28E12.06C
Darier–White disease; <i>SERCA</i>	pgak	SPBC31E1.02C
Bloom syndrome; <i>BLM</i>	hus2, rqh1, rad12	SPAC2G11.12
Ataxia telangiectasia; <i>ATM</i>	tel1	SPCC23B6.03C
Xeroderma pigmentosum G; <i>XPG</i>	rad13	SPBC3E7.08C
Tuberous sclerosis 2; <i>TSC2</i>	–	SPAC630.13C
Immune bare lymphocyte; <i>ABCB3</i>	–	SPBC9B6.09C
Downregulated in adenoma; <i>DRA</i>	–	SPAC869.05C
Diamond–Blackfan anaemia; <i>RPS19</i>	rps19	SPBC649.02
Cockayne syndrome I; <i>CKN1</i>	–	SPBC577.09
<i>RAS</i>	ste5, ras1	SPAC17H9.09C
Cyclin-dependent kinase 4; <i>CDK4</i>	cdc2	SPBC11B10.09
CHK2 protein kinase	cds1	SPCC18B5.11C
<i>AKT2</i>	pck2, sts6, pkc1	SPBC12D12.04C

\* Scores are: +++++,  $<1 \times 10^{-100}$ ; +++,  $1 \times 10^{-40}$  to  $1 \times 10^{-100}$ .

# Výzkum

## - Buněčné mechanismy ...

**Table 5** *Schizosaccharomyces pombe* genes related to human disease genes

Human disease gene	Disease	Score*	<i>S. pombe</i> gene/product
Wilson disease; <i>ATP7B</i>	Metabolic	++++	P-type copper ATPase
Non-insulin-dependent diabetes; <i>PCSK1</i>	Metabolic	++++	krp1, kinesin related
Hyperinsulinism; <i>ABCC8</i>	Metabolic	++++	ABC transporter
G6PD deficiency; <i>G6PD</i>	Metabolic	++++	zwf1 GP6 dehydrogenase
Citrullinaemia type I; <i>ASS</i>	Metabolic	++++	Argininosuccinate synthase
Wernicke–Korsakoff syndrome; <i>TKT</i>	Metabolic	+++	Transketolase
Variagate porphyria; <i>PPOX</i>	Metabolic	+++	Protoporphyrinogen oxidase
Maturity-onset diabetes of the young (MODY2); <i>GCK</i>	Metabolic	+++	hxx1, hexokinase
Gitelman’s syndrome; <i>SLC12A3</i>	Metabolic	+++	CCC Na-K-Cl transporter
Cystinuria type 1; <i>SLC3A1</i>	Metabolic	+++	α-glucosidase
Cystic fibrosis; <i>ABCC7</i>	Metabolic	+++	ABC transporter
Bartter’s syndrome; <i>SLC12A1</i>	Metabolic	+++	CCC Na-K-Cl transporter
Menkes syndrome; <i>ATP7A</i>	Neurological	++++	P-type copper ATPase
Deafness, hereditary; <i>MYO15</i>	Neurological	++++	myo51 class V myosin
Zellweger syndrome; <i>PEX1</i>	Neurological	+++	AAA-family ATPase
Thomsen disease; <i>CLCN1</i>	Neurological	+++	ClC chloride channel
Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6); <i>CACNA1A</i>	Neurological	+++	ClC sodium channel
Myotonic dystrophy; <i>DM1</i>	Neurological	+++	orb6 Ser/Thr protein kinase
McCune–Albright syndrome; <i>GNAS1</i>	Neurological	+++	gpa1 guanine nucleotide binding
Lowe’s oculocerebrorenal syndrome; <i>OCRL</i>	Neurological	+++	PIP phosphatase
Dents; <i>CLCN5</i>	Neurological	+++	ClC chloride channel
Coffin–Lowry; <i>RPS6KA3</i>	Neurological	+++	Ser/Thr protein kinase
Angelman; <i>UBE3A</i>	Neurological	+++	Ubiquitin-protein ligase
Amyotrophic lateral sclerosis; <i>SOD1</i>	Neurological	+++	sod1, superoxide dismutase
Oguchi type 2; <i>RHKIN</i>	Neurological	+++	Ser/Thr protein kinase
Familial cardiac myopathy; <i>MYH7</i>	Cardiac	++++	myo2, myosin II
Renal tubular acidosis; <i>ATP6B1</i>	Renal	++++	V-type ATPase

\*Scores are: +++++, <math>1 \times 10^{-100}</math>; +++, <math>1 \times 10^{-40}</math> to <math>1 \times 10^{-100}</math>.

Wood et al, Nature, 2002



Search and retrieve *S. cerevisiae* data with YeastMine, populated by SGD and powered by InterMine.

Data Updated on: Aug-24-2015

Contact Us Video Tutorials Help Log in

Home Templates Lists QueryBuilder Tools Regions Data Sources API MyMine

Search: e.g. act1 GO



### Human Gene → Functional Complementation

For a given human gene(s), enter gene name or Entrez GeneID and retrieve information about cross-species functional complementation between yeast and humans.



Search and retrieve *S. cerevisiae* data with YeastMine, populated by SGD and powered by InterMine.

Data Updated on: Aug-24-2015

Contact Us Video Tutorials Help Log in

Home Templates Lists QueryBuilder Tools Regions Data Sources API MyMine

Search: e.g. act1 GO

Trail: Query

### Human Gene → Functional Complementation

For a given human gene(s), enter gene name or Entrez GeneID and retrieve information about cross-species functional complementation between yeast and humans.

Manage Columns Manage Filters Manage Relationships

Save as List Generate Python code Export

Showing 1 to 3 of 3 rows

Complement Standard Name	Complement Organism . Short Name	Complement Cross References	Gene Primary DBID	Gene Systematic Name	Gene Standard Name	Gene Organism . Short Name	Complementation Direction	Complements Publication . Pub Med Id	Complements Source	Complements Notes
CCND1	H. sapiens	6 Cross References	S000000038	YAL040C	CLN3	S. cerevisiae	human gene complements S. cerevisiae mutation	1833066	P-POD	NO VALUE
CCND1	H. sapiens	6 Cross References	S000004812	YMR199W	CLN1	S. cerevisiae	human gene complements S. cerevisiae mutation	1833066	P-POD	NO VALUE
CCND1	H. sapiens	6 Cross References	S000006177	YPL256C	CLN2	S. cerevisiae	human gene complements S. cerevisiae mutation	1833066	P-POD	NO VALUE

Powered by



# Analýza polyQ (glutaminové repetice) v kvasinkách

- polyglutaminové repetice (CAG triplet slipage) v proteinech (huntingtin - Ht) způsobují závažné neurodegenerativní onemocnění (Huntingtonovu nemoc)
- Ht-GFP (s různě dlouhými polyQ) byly exprimovány v *S. cerevisiae* a sledován vznik agregátů/nerozpustných proteinů – závislost na chaperonech (delece

Hsp104 snižovala agregaci a zvyšovala rozpustnost)

