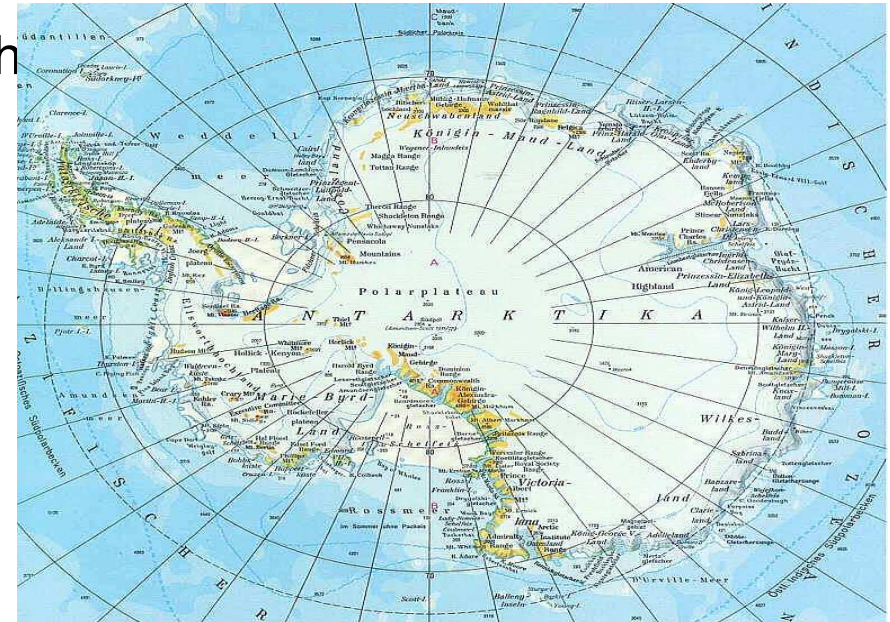


Osnova 3. přednášky

METODY

- 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 lepicí pásky ...
a pak vyšetří na Sabouraudův agar nebo bohaté médium → kultivace
2-7 dní při teplotách 22-42°C (37°C)

Lékařská mykologie – Bi3390

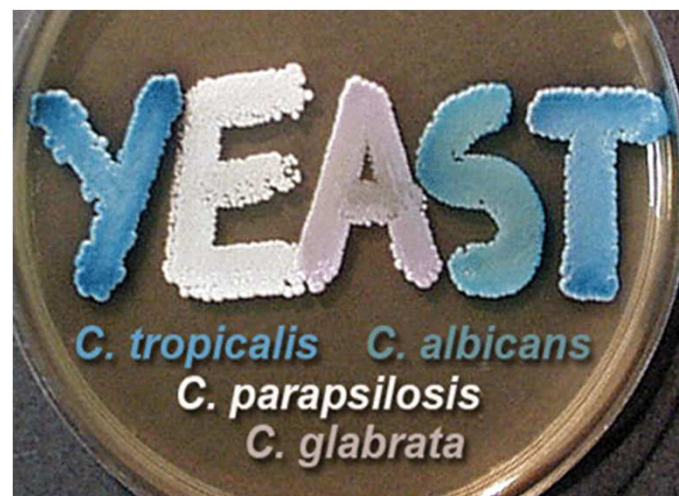


identifikace/analýza:

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

moderní metody

- PCR (nested, multiplex, RFLP),
- sekvenační (NGS 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 | chlamydozory artrospory mycelium/pseudomycelium |
| | | barvený preparát | askospory pouzdra |
| | biochemie | asimilace | Intenzita zůstatku barevná změna |
| | | fermentace | produkce CO ₂ |
| | molekulární biologie | analýza DNA | FISH (fluorescence) PCR |
| | | analýza RNA analýza proteinů | NASBA MALDI-TOF MS |
| FISH – fluorescenční hybridizace <i>in situ</i> , PCR – polymerázová řetězová reakce, NASBA – amplifikace založená na sekvencích nukleové kyseliny, MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrometrie „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight“ | | | |

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/identifikace-kvasinek-z-klinickeho-materialu-prehled-sucasnych-moznosti-se-zamerenim-na-fenotypove-metody-a-komerzni-produkty-455847>

doc. P. Hamal, UP Olomouc

Mikromorfologie - spory

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 |
| | serologie | monoklonální protilátky | aglutinace |
| | enzymatické testy | aktivita enzymů | barevná změna |
| podrobná | mikromorfologie | nativní preparát | chlamydospory artrospory mycelium/pseudomycellium |
| | | 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“

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

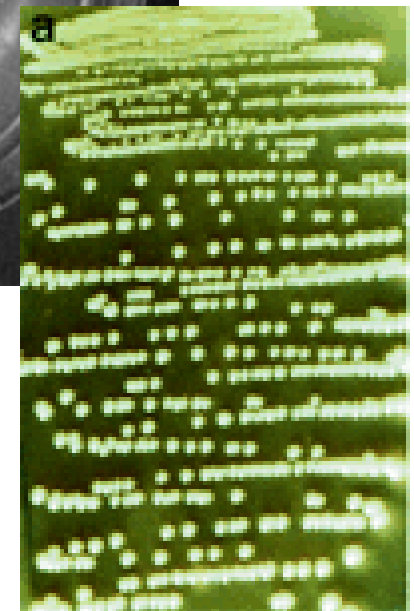
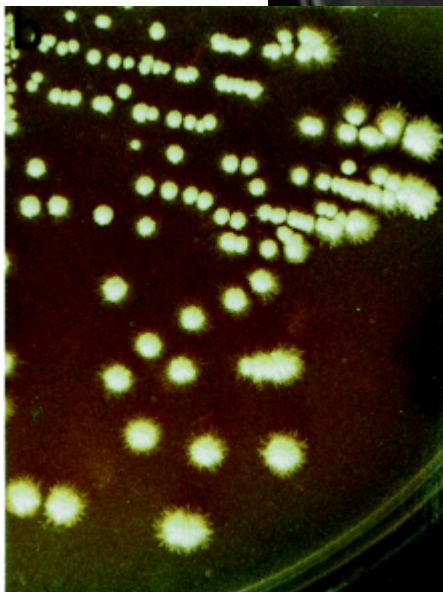
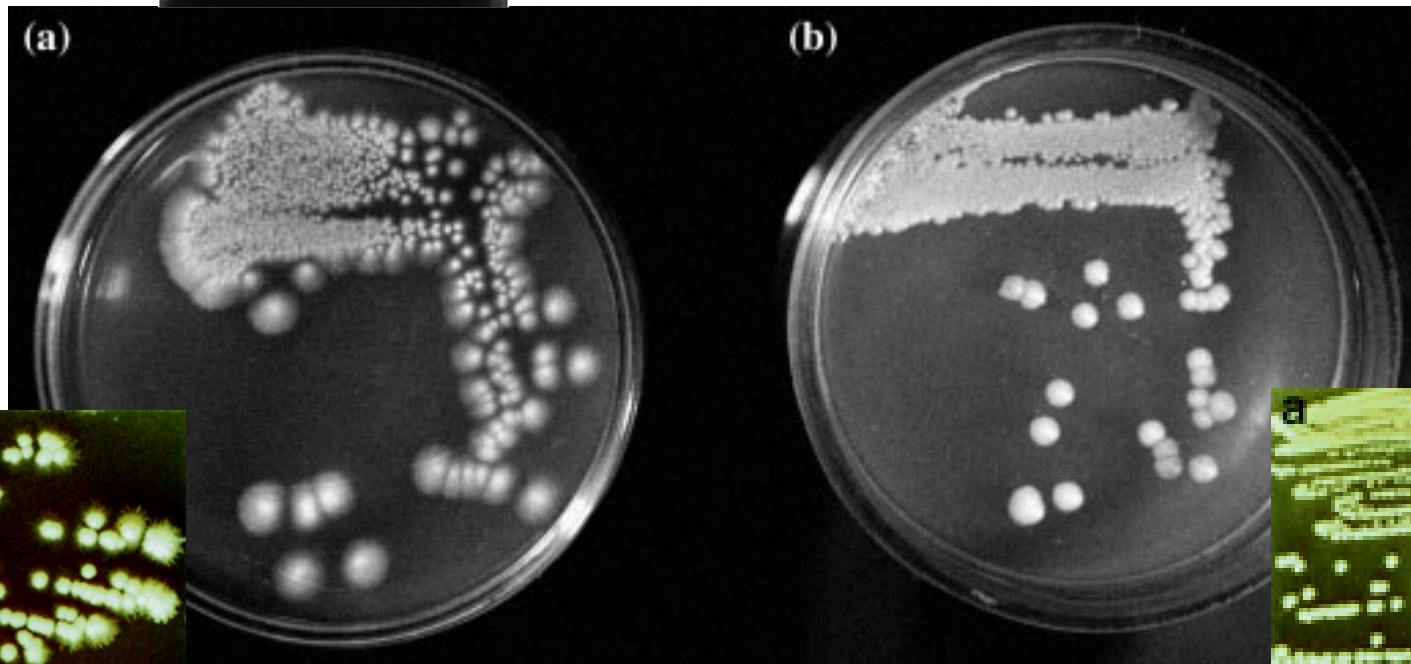
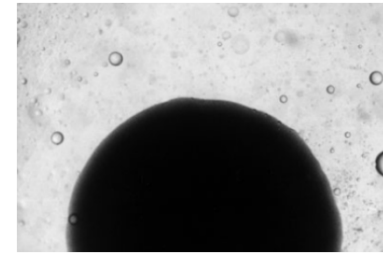
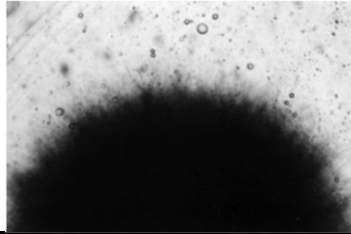


C. dubliniensis: nadbytek chlamydospor na koncích krátkých pseudohyf

- test klíčnicích hyf, *C. albicans* přímo z pozitivních hemokultur na kaseinový agar nebo kukuřičný agar (různý výsledek)

| 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



Staibûv agar (37°C)

C. dubliniensis

C. albicans

Sérologické testy

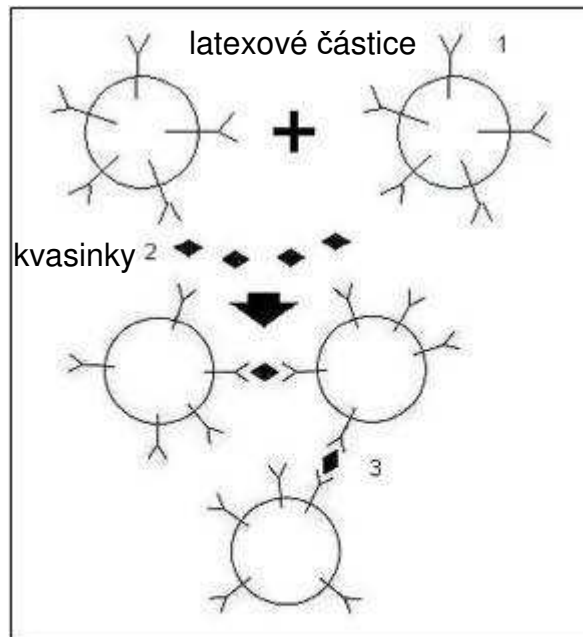
- souprava Iatron Serological Candida Check Kit (Iatron Laboratories) nebo Bichro-latex Albicans (Fumouze Diagnostics)

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 | křehní hyfy |
| | serologie | monoklonální protilátky | aglutinace |
| | enzymatické testy | aktivita enzymů | barevná změna |
| podrobná | mikromorfologie | nativní preparát | chlamydospory artrospory mycelium/pseudomycellium |
| | | 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 sekvenčních nukleové kyseliny, MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrometrie „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight“

Specifické protilátky proti antigenům buněčné stěny

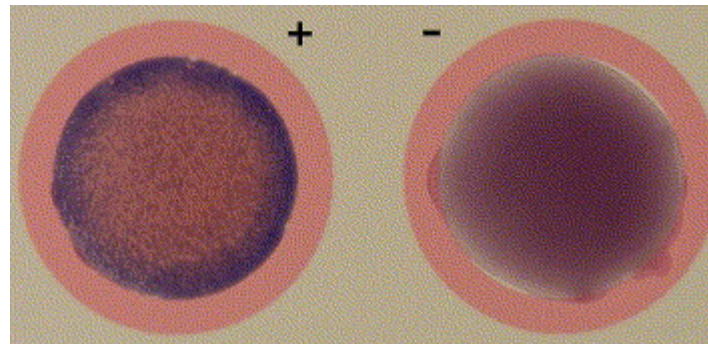


Obr. 2: 1 – latexová částice s navázanou specifickou protilátkou na povrchu; 2 – virová částice; 3 – shluk latexových částic s viry, který vytváří zákal ve vzorku Totéž platí pro kvasinky

Latexová aglutinace

C. dubliniensis

C. albicans



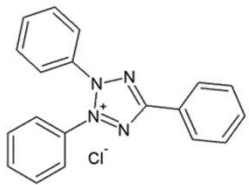
Teplotní test

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

Chromogenní testy

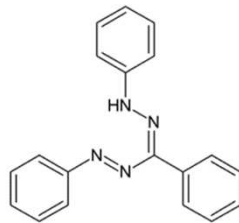
- test enzymových aktivit - chromogenní substráty – např. tetrazoliové soli

tetrazoliová sůl



TPH (White color)

electron donor (eg NADH)
Succinate dehydrogenase
redukce

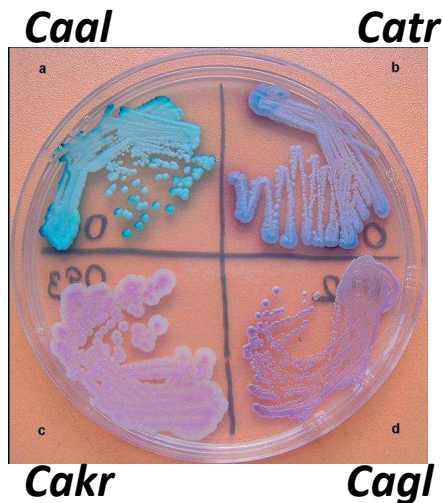


TPF (Red Color)

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 <u>tetrazolium salt</u> | Pale pink to whitish colonies | Red to maroon colonies |
| Chromagar Candida (Chromagar, Paris, France; M-Tech Diagnostics Ltd, Cheshire, UK) | Colony color determined by <u>β-N-acetylgalactosaminidase</u> activity | Light green, light-blue or blue green colonies | Dark green colonies |
| Candida ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) | Colony color determined by <u>hexosaminidase</u> activity and other chromogenic substrate | Blue-green colonies | Dark-bluish green colonies |

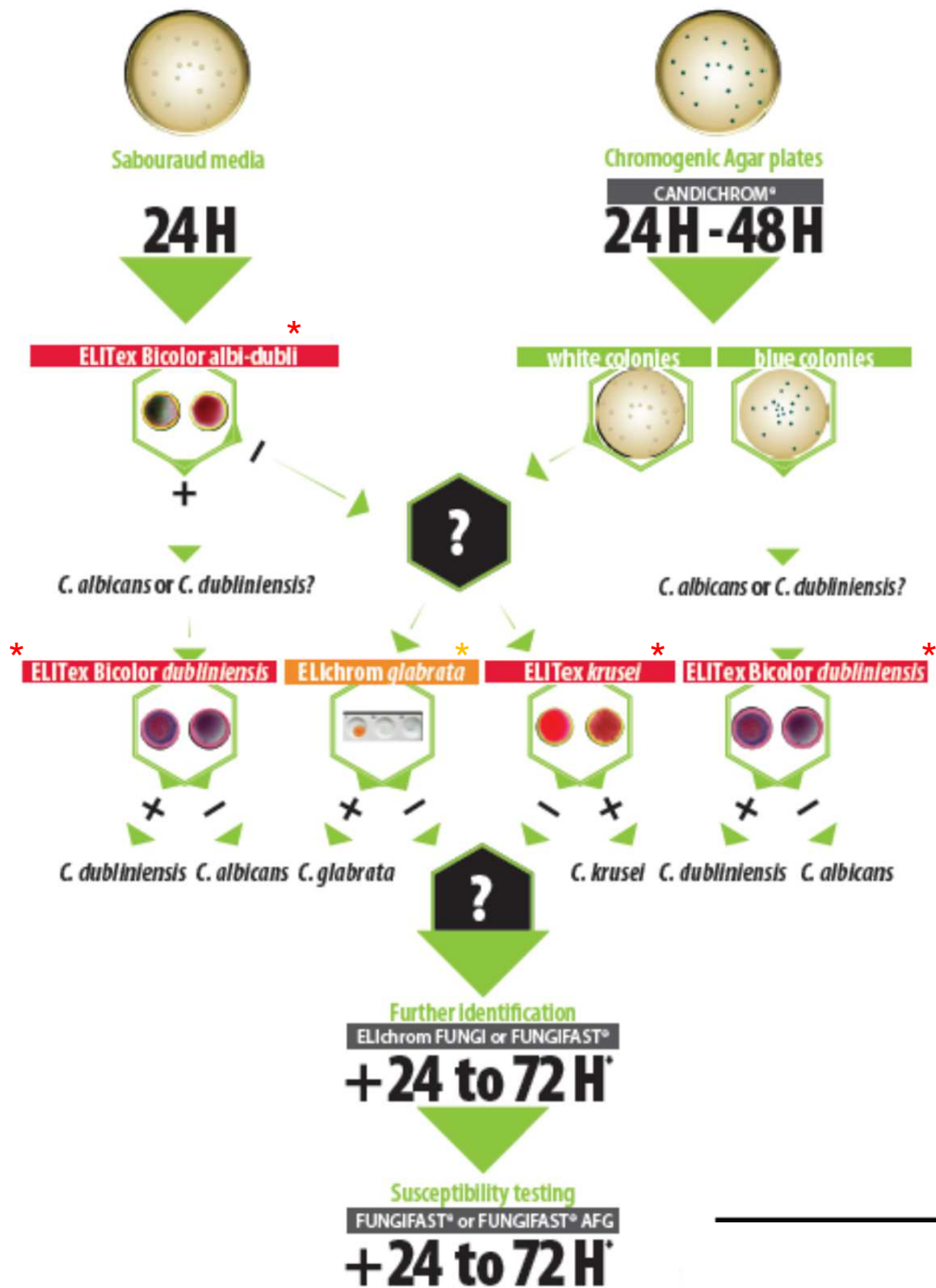
Chromogenní testy

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

| Tab. 2 - Selektivně diagnostické půdy pro předběžnou identifikaci kvasinek | | | |
|---|-------------|------------------------|---|
| Registrovaný název | Typ | Výrobce | Detekované druhy |
| CHROMagar Candida | chromogenní | CHROMagar Microbiology | CAAL, CATR, CAKR, CAGL |
| CandSelect 4 | chromogenní | Bio-Rad Laboratories | CAAL, CATR, CAKR, CAGL |
| HardyCHROM Candida | chromogenní | Hardy Diagnostics | CAAL, CATR, CAKR, CAGL |
| Brilliance Candida Agar | chromogenní | Oxoid | CAAL, CATR, CAKR, (skupina CAGL, CAPA, CALU, CAKE) |
| Candida Chromogenic Agar | chromogenní | Laboratorios Conda | CAAL, CATR, CAKR (CAPA, CALU) |
| BBL Chromagar Candida | chromogenní | BD Diagnostics | CAAL, CATR, CAKR |
| Candida ID 2 | chromogenní | bioMérieux | CAAL (skupina CATR, CALU, CAGU, CAKE) |
| Candichrom II | chromogenní | ELITech Group | CAAL |
| Fluoroplate Candida | fluorogenní | Merck Chemicals | CAAL |
| CAAL – <i>Candida albicans</i> , CATR – <i>Candida tropicalis</i> , CAKR – <i>Candida krusei</i> , CAGL – <i>Candida glabrata</i> , CAPA – <i>Candida parapsilosis</i> , CALU – <i>Candida lusitanae</i> , CAKE – <i>Candida kefyr</i> , CAGU – <i>Candida guilliermondii</i> | | | |

<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/identifikace-kvasinek-z-klinickeho-materialu-prehled-soucasnych-moznosti-se-zamerenim-na-fenotypove-metody-a-komerzni-produkty-455847>

doc. P. Hamal, UP Olomouc



Příklad analýzy:

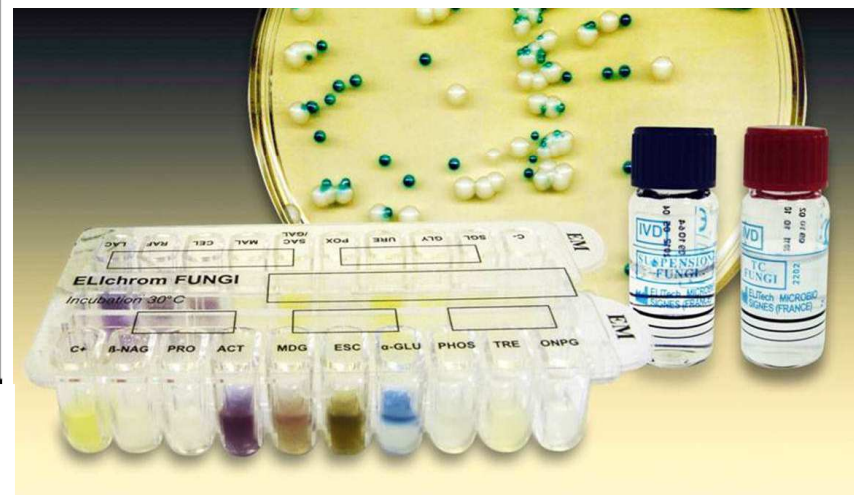
CANDIchrom – chromogenní metoda (enzymatická přeměna tetrazoliové soli) 1-2 dny

***ELITex** – latexové aglutinační metody (protilátky) 5 minut

***ELIchrom** – biochemický test (aktivita trehalasy) 20 minut

ELIchromFUNGI – biochemické testy 1-2 dny

Candida, Saccharomyces, Rhodotorula, Cryptococcus, Trichosporon, Geotrichum, Klueckera, Pichia

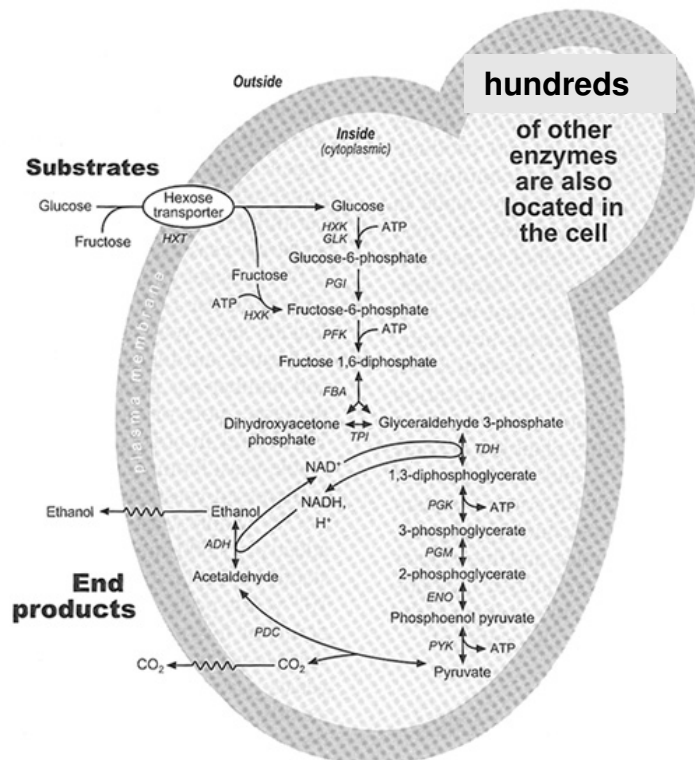


Biochemické testy

- Biochemické parametry – založeny na schopnosti utilizace uhlíkatých látek (cukrů), přeměnit dusíkaté látky (hydrolyza močoviny - ureasa)
- Tato schopnost se odvíjí od metabolických schopností daného druhu – přítomnosti specifických enzymů (především dehydrogenas, fosfatás, β -glukosidáza, β -N-acetylhexosaminidázy)

A.J. Kluyver – počátek 20. stol.

| | | |
|-----------|------------|-----------------------------------|
| 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-xylose | + | - |
| Growth on methyl- α -D-glucoside | + | - |
| Growth on D-trehalose | + | - |
| β -D-glucosidase activity | + | - |

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

Biochemická charakteristika

- Rhodotorula

- Ureáza +
- KNO₃ utilizace -
- Fermentace
 - Mal, Lac, Sac, Glc –
- Asimilace sacharidů
 - **Mal+** Sac+ Lac-
 - Raf+ Mlz+
 - Xyl+ **Ara+**
 - Inl- Aml-
 - Cel+ Tre+

- Sporidiobolus

- Ureáza +
- KNO₃ utilizace –
- Fermentace
 - Mal, Lac, Sac, Glc –
- Asimilace sacharidů
 - Mal- Sac+ **Lac+**
 - Raf+ Mlz+
 - Xyl+ Ara-
 - Inl- **Aml+**
 - Cel+ Tre+

Mal – maltosa, Lac – laktosa, Ara – arabinosa, Aml - amylosa

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

| | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--|---|--|--|--|--|--|--|--|---|-------------------------------------|
| 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 Turánose |
| 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 Turánose |
| 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



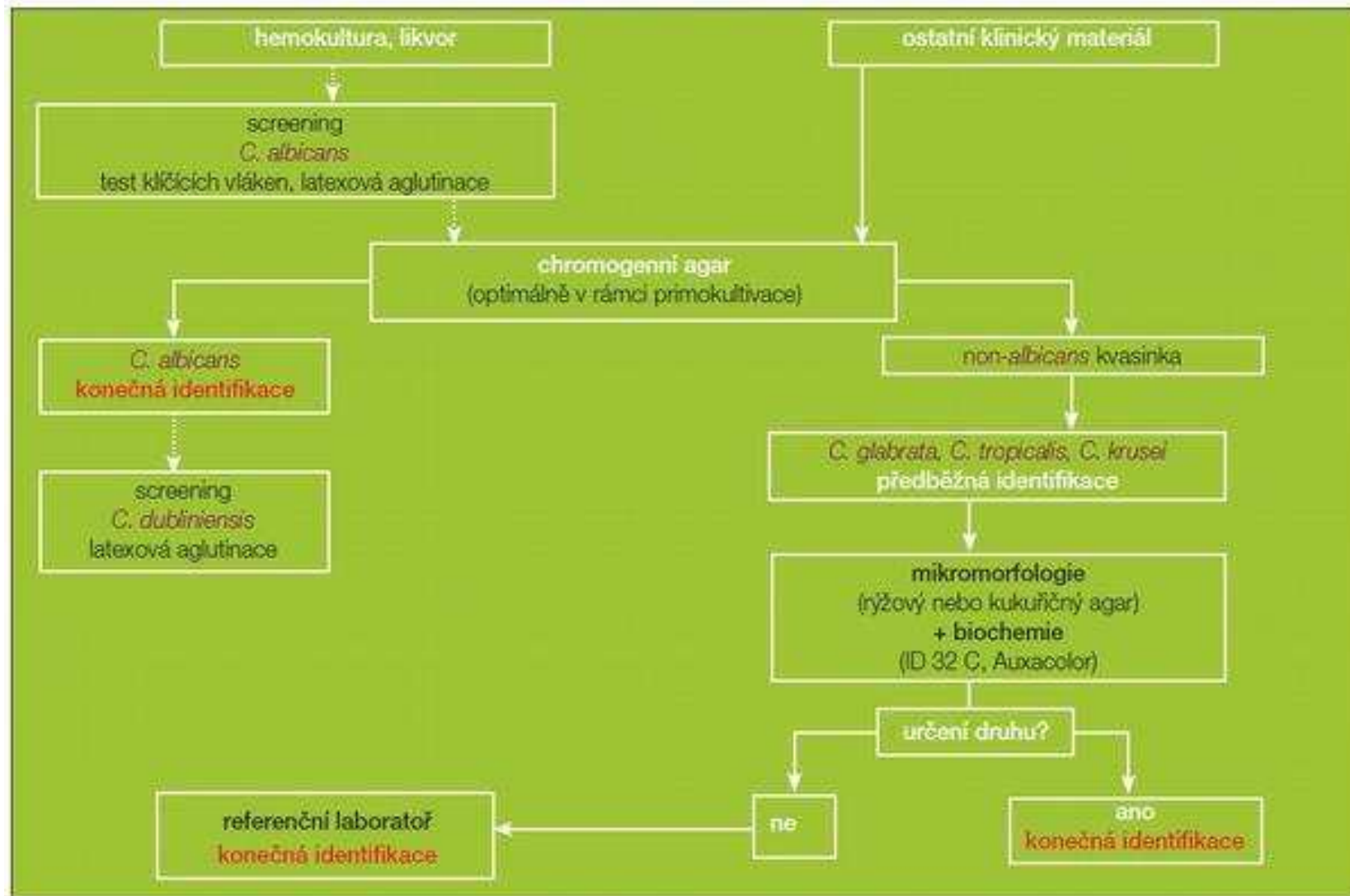
Oxidation Tests



Assimilation Tests

nárust kvasinek

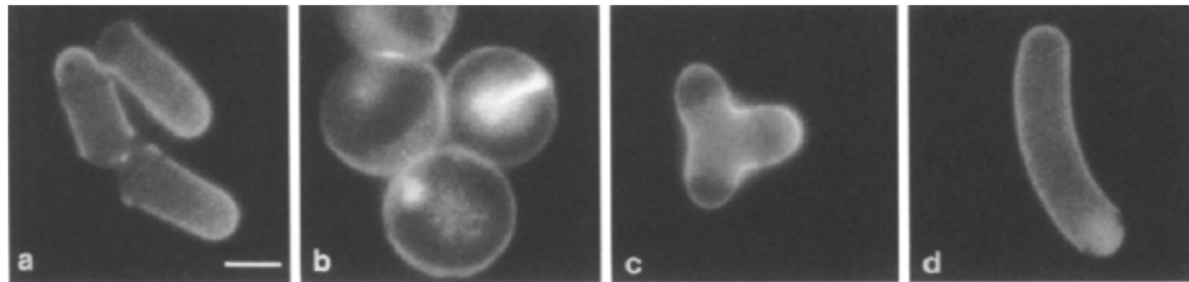
Postup klinického vyšetření



<http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/identifikace-kvasinek-z-klinickeho-materialu-prehled-sucasnych-moznosti-se-zamerenim-na-fenotypove-metody-a-komercni-produkty-455847>

Molekulární taxonomie

- konvenční taxonomie je problematická :
 - morfologie kvasinek není stabilní → roztěr a nárůst trvá několik dní (prodlužuje se včasná diagnóza ...) –
 - molekulární taxonomie (komerční účely - odlišit kmeny *S.c.*)
 - pulsní gelová elektroforéza (PFGE), FISH (karyotyp)
 - PCR, restrikční polymorfismus (odlišení druhů)
 - nejnověji MALDI-TOF (taxonomie)



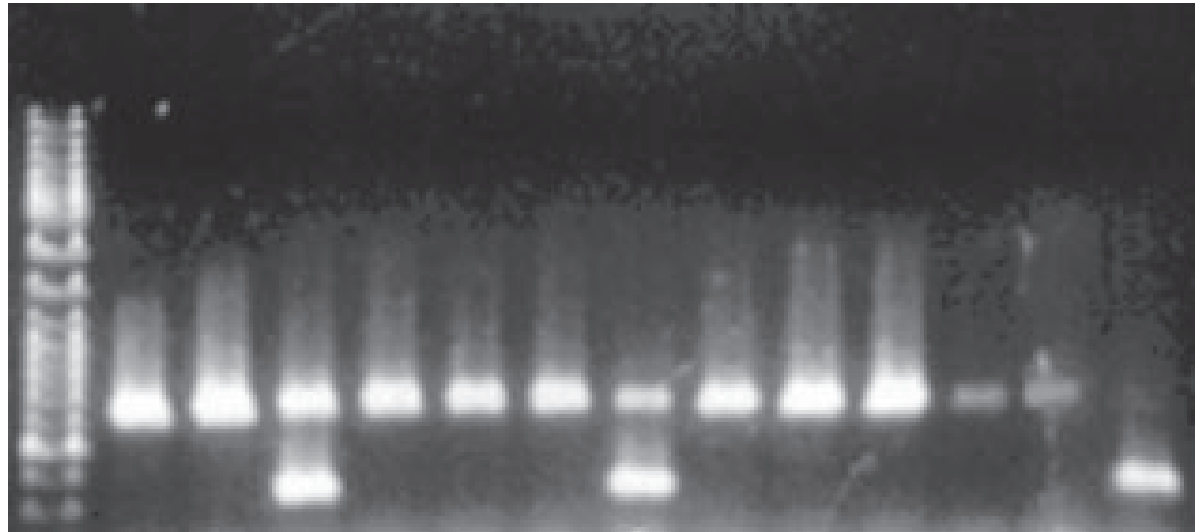
- většinu morfologických nebo enzymatických ... charakteristik lze zvrátit mutací (v jediném genu)

Identifikace založená na odlišnosti typických sekvencí DNA

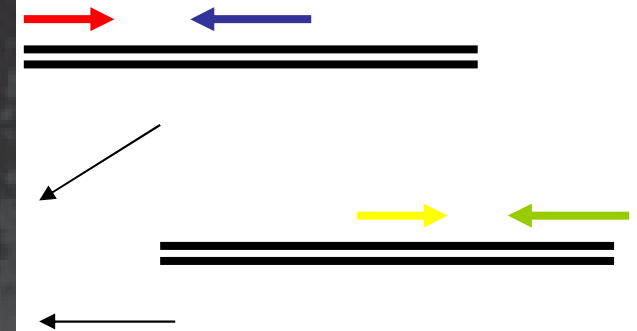
- obtížná izolace DNA, proteinů ... z kvasinek
- je třeba nejdříve narušit silnou buněčnou stěnu ... pomocí enzymů nebo mechanicky
- poté PFGE nebo dále extrahovat DNA (např. fenol-chloroform, poté srážení etanolem)
- specifické sekvence lze identifikovat pomocí Southern blotu nebo PCR
 - izolace DNA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



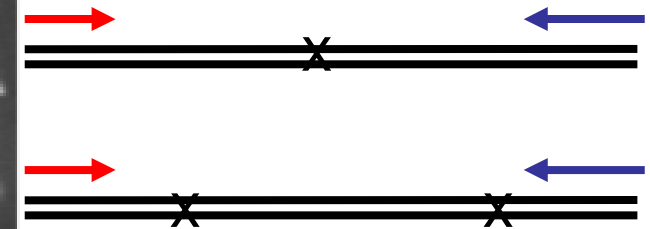
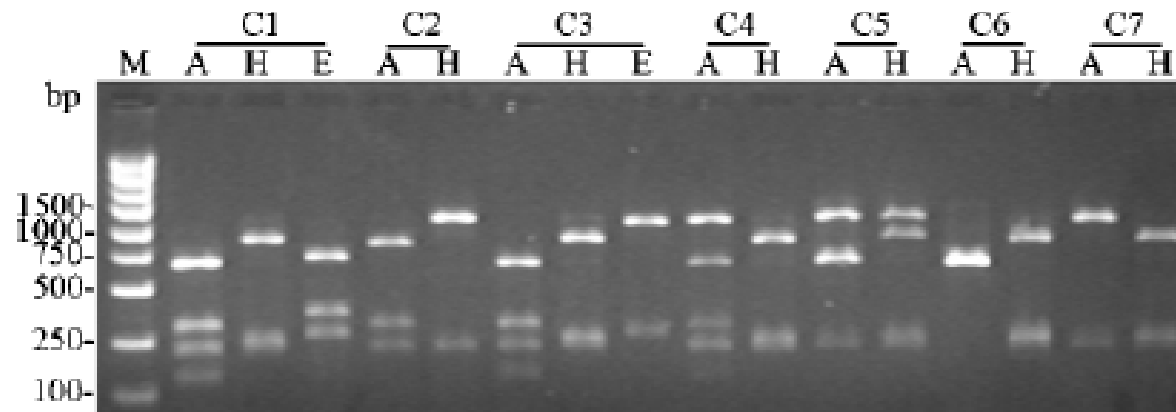
- 1. sada primerů je **universální** kvasinková (pozitivní kontrola, vyšší proužky) a 2. sada primerů je druhově **specifická** (méně konzervovaný úsek DNA) - separace gelovou elektroforézou (barvení ethidium bromidem, UV transiluminátor)



PCR

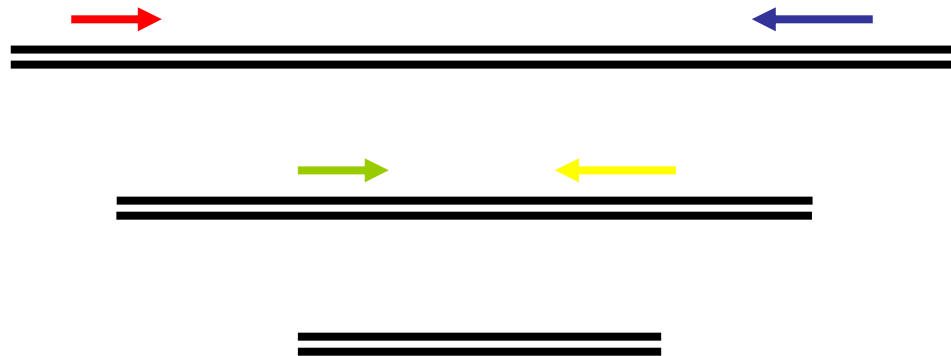


- po PCR může následovat štěpení restriční endonukleasou a odlišení druhů na základě odlišné délky štěpných produktů (tzv. **RFLP** – restriction fragment length polymorfism)



Nested („zahnížděná“) PCR

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



Multiplex PCR

- amplifikace se směsí primerů (jeden univerzální, další specifické)



Candida glabrata
397bp

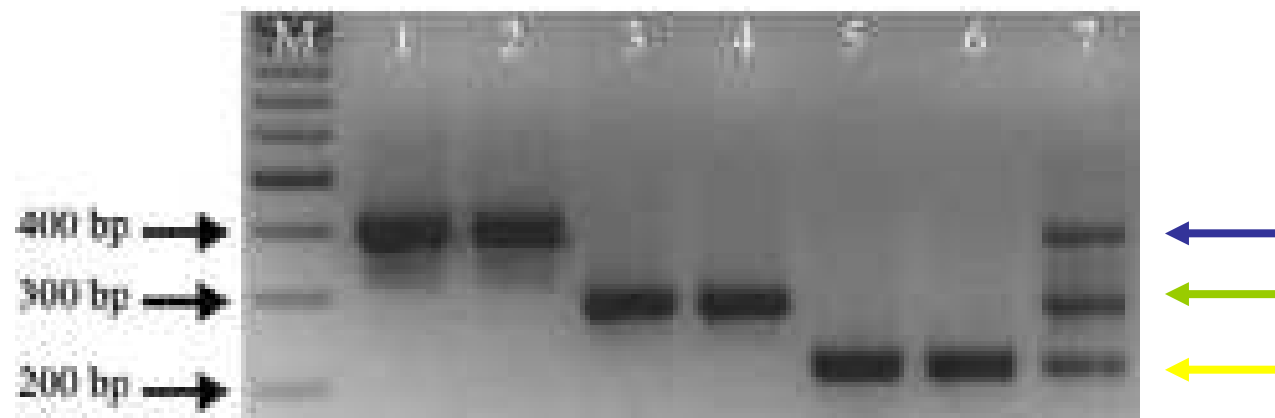


Candida nivariensis
293bp



Candida bracarensis
223bp

univerzální
primer (konzervativní oblast 5.8S rDNA)

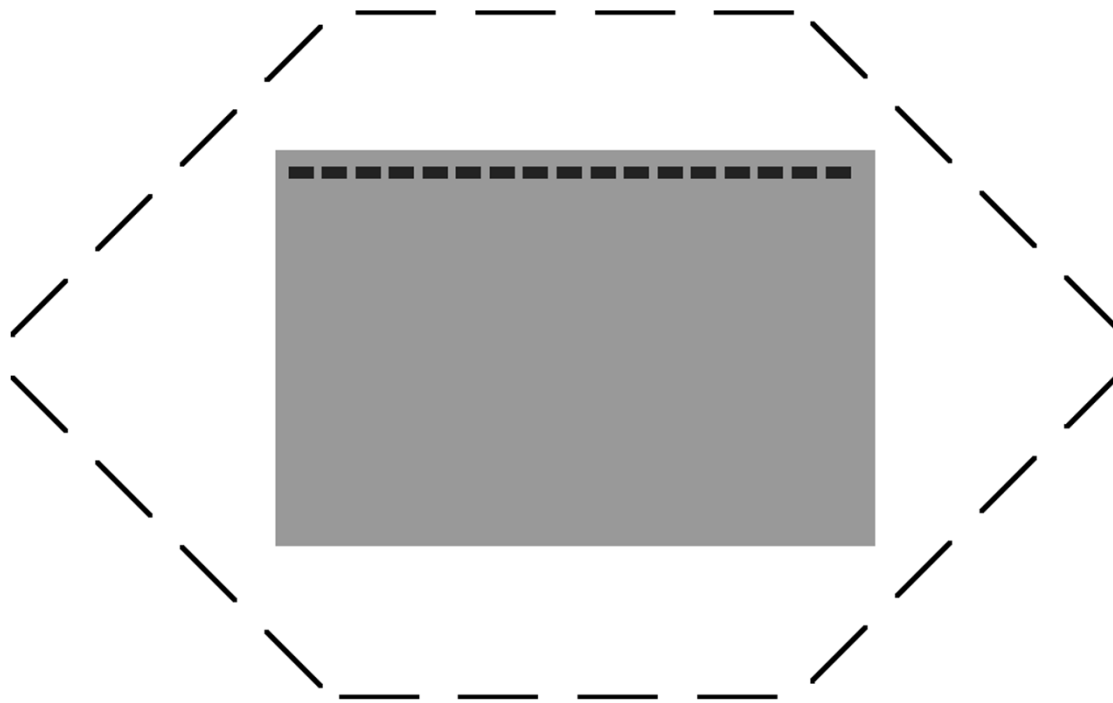


PFGE

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

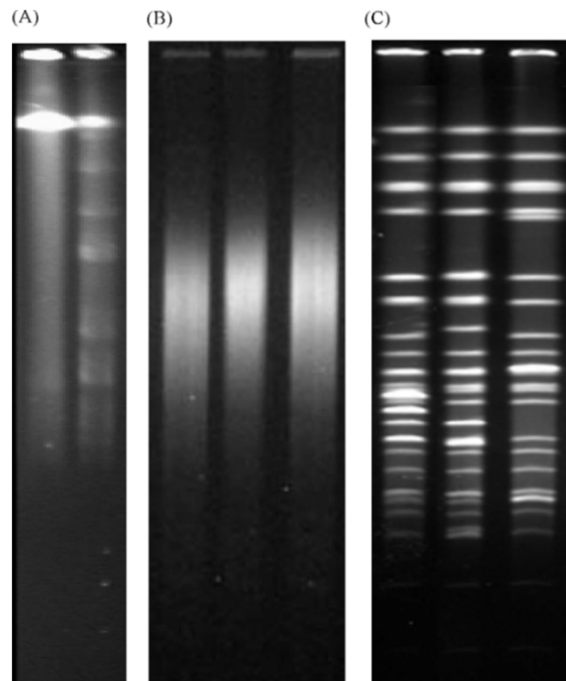
PFGE = pulse field gel electrophoresis (elektroforéza s měnícím se elektrickým polem, při změně směru elektrického pole trvá větším molekulám DNA déle, než se přeorientují - umožňuje separovat molekuly velké několik Mbp)

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



Karyotypizace

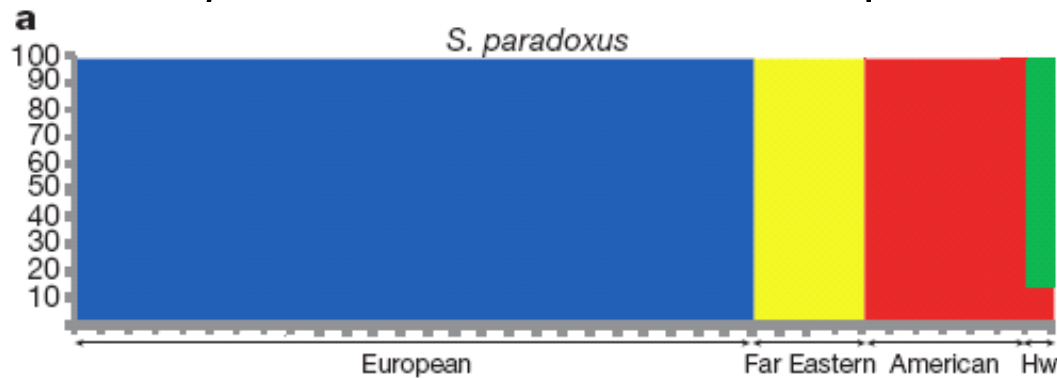
- *S.c.* kmeny mají podobný karyotyp – většinou se liší délkou chromosomu XII (podle počtu rDNA genů)
- **Průmyslové** (pivní) kvasinky jsou většinou polyploidní – homologní chromosomy mají odlišné velikosti
- Srovnání kmenů pro fylogenetické účely (intaktní nebo RE naštěpené chromosomy)
- Určení příbuznosti 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



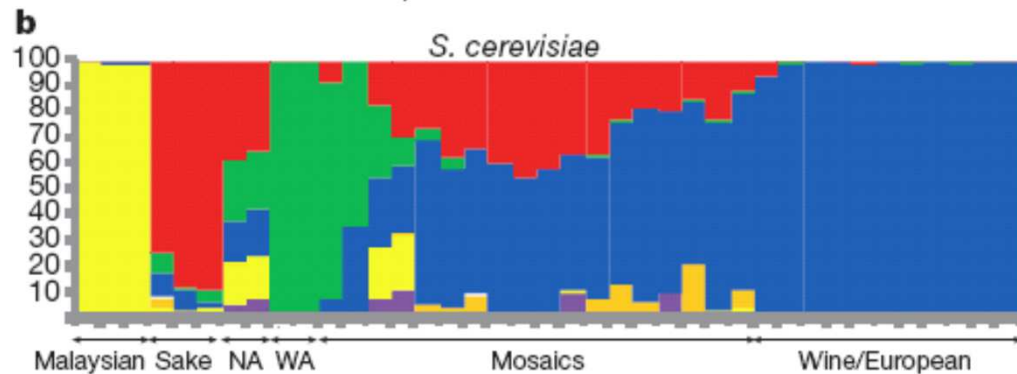
- (A) Nekompletní naštěpení RE
- (B) Degradace nukleázou
- (C) Oprava přidáním 75 mM thiomočoviny do pufru

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

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

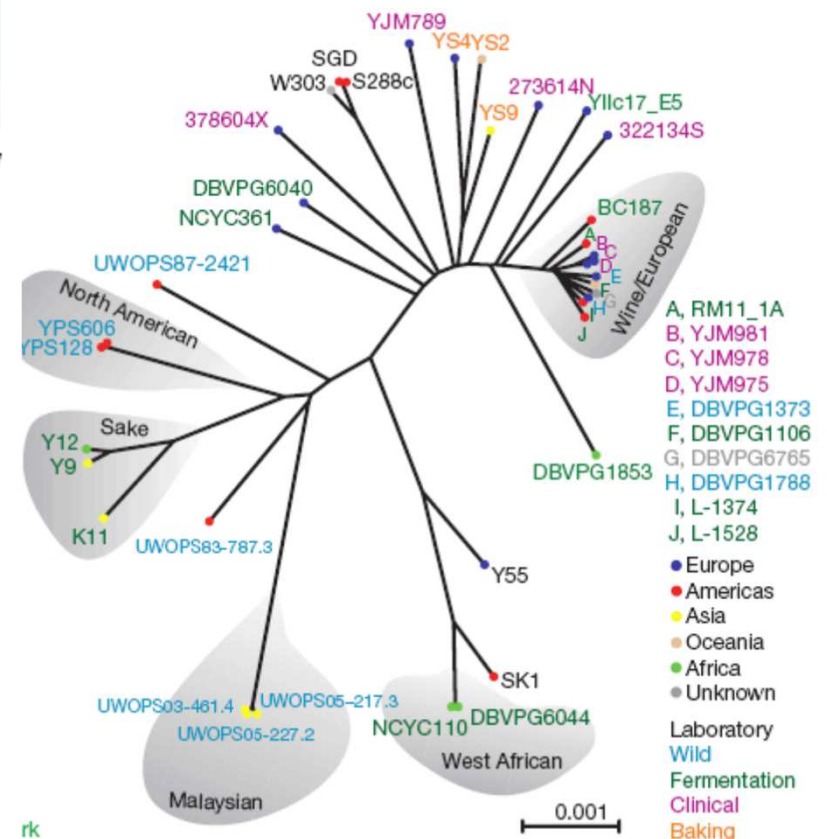


- *S. cerevisiae* - 3-4 původní linie, které se díky člověku křížily ...



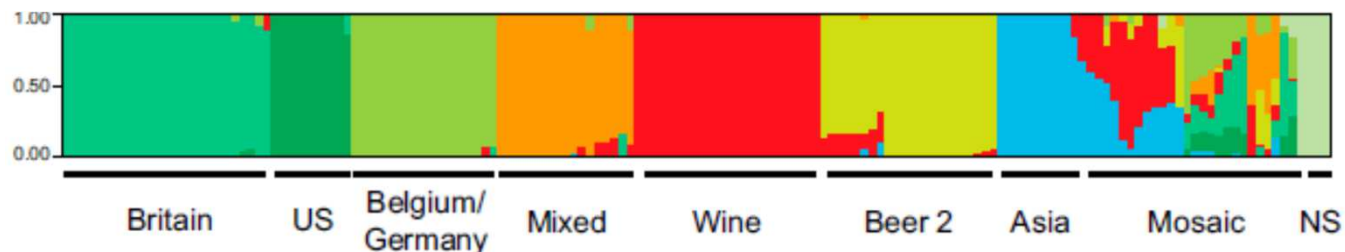
- ukazují na geografickou závislost

Nature 458, (2009), p337



Studie populací *S. cerevisiae*

- NGS sekvenace > 100 kmenů z různých koutů světa a různých biotechnologií
- (SNPs) ukazují na geografickou závislost

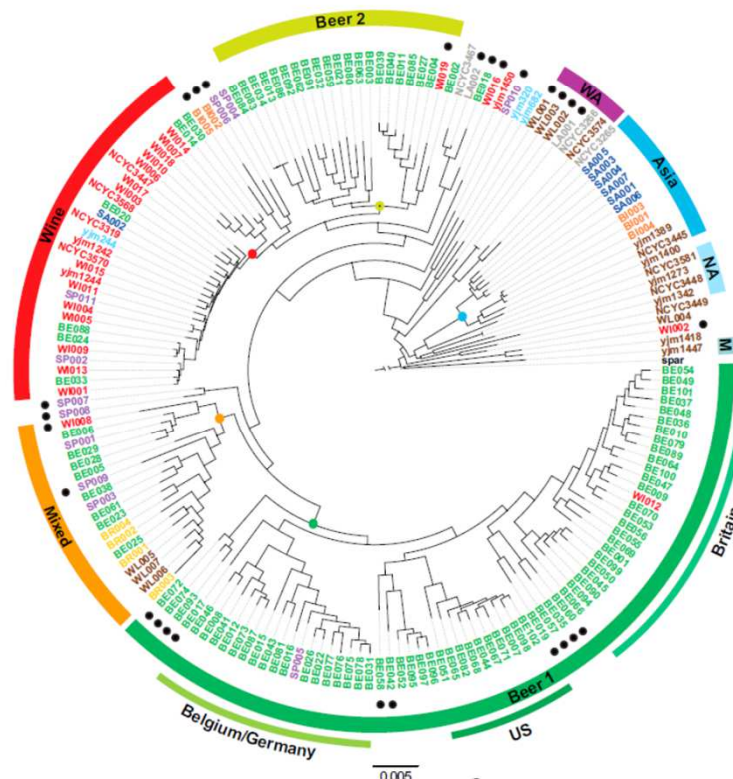


pivní linie ve VB, US, Belgii ... a další linie č.2

sake v Asii (i bioetanol v Číně)

mixed

- specifické silné belgické ales (refermentace v lahvích)
- chleba



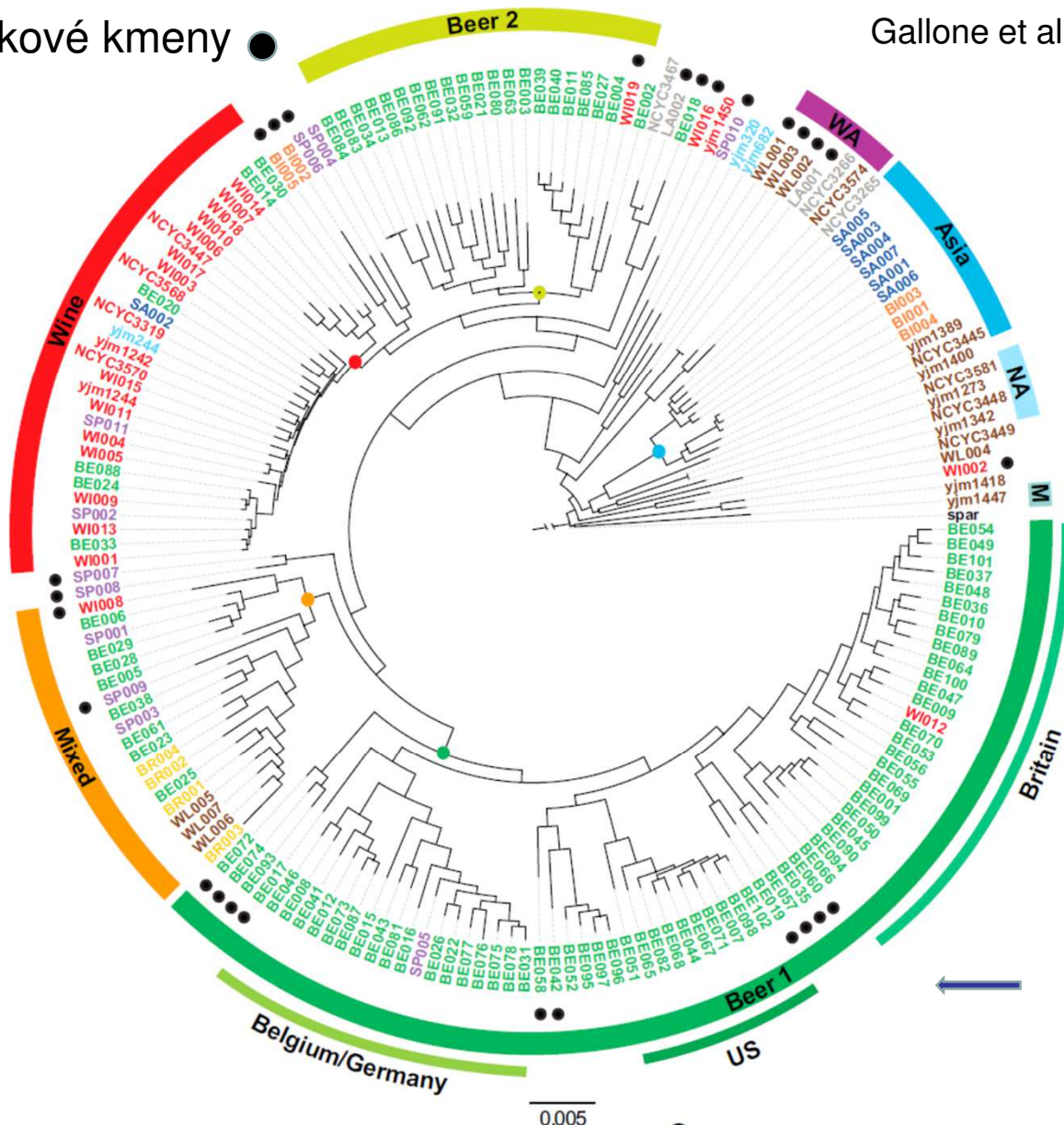
Mosaikové kmeny

Gallone et al, Cell, 2016

- Origin
- Beer
 - Wine
 - Spirits
 - Saké
 - Wild
 - Bio-ethanol
 - Bread
 - Laboratory
 - Clinical
 - S.paradoxus*

Lineage

- Beer 1
- Britain
- US
- Belgium/Germany
- Mixed
- Wine
- Beer 2
- West Africa (WA)
- Asia
- North America (NA)
- Malaysia (M)
- Mosaic



spirits – netvoří jednu linii (nepoužívají se opakovaně – není selektivní tlak – moderní technologie)

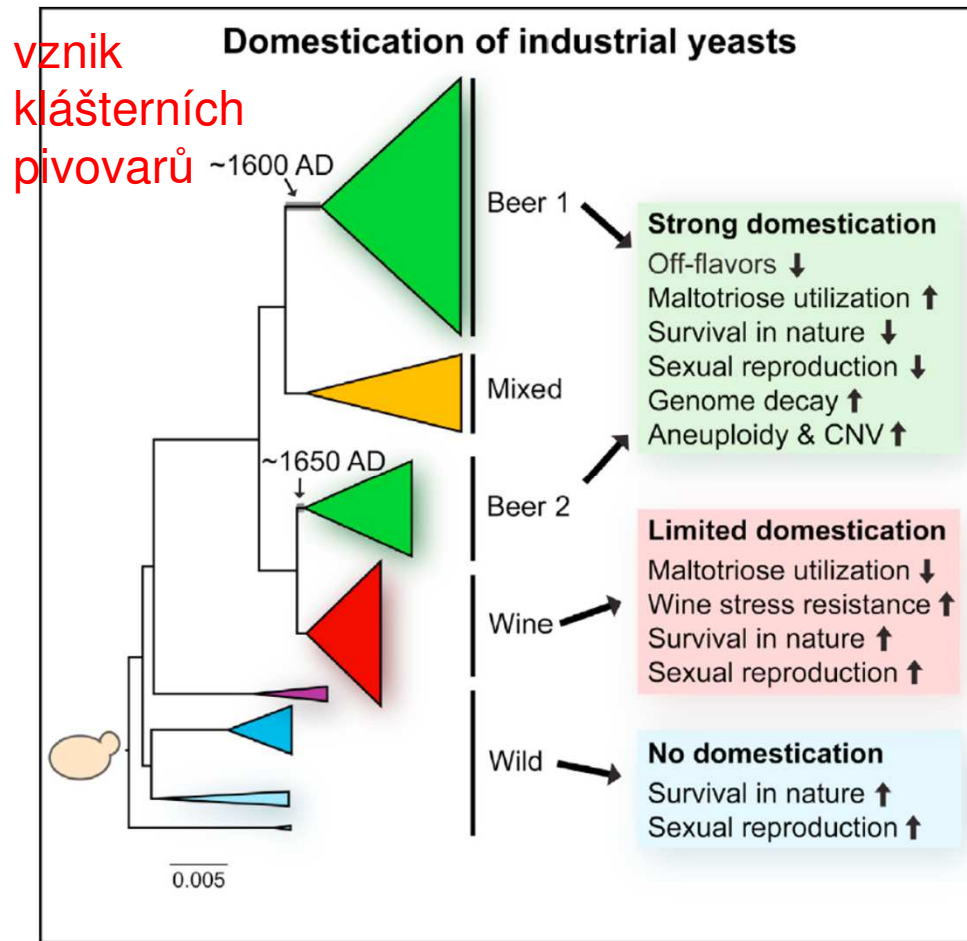
← *S. paradoxus* outgroup

← americké pivo má kořeny v Británii

• **pivo 1 a 2 - nové pivní linie** (evolučně izolované — 2 domestikací události - linie 2 domestikace s vinnými kmeny) - (geny podílející se na C a N metabolismu, flokulaci ... mají nejvíce (CNV – copy number) variací)

analýza genomu a fenomu:

průmyslově-specifická selekce na toleranci ke stresu (vyšší obsah etanolu 7-15%), využití cukru, specifické aroma, nižší schopnost reprodukce

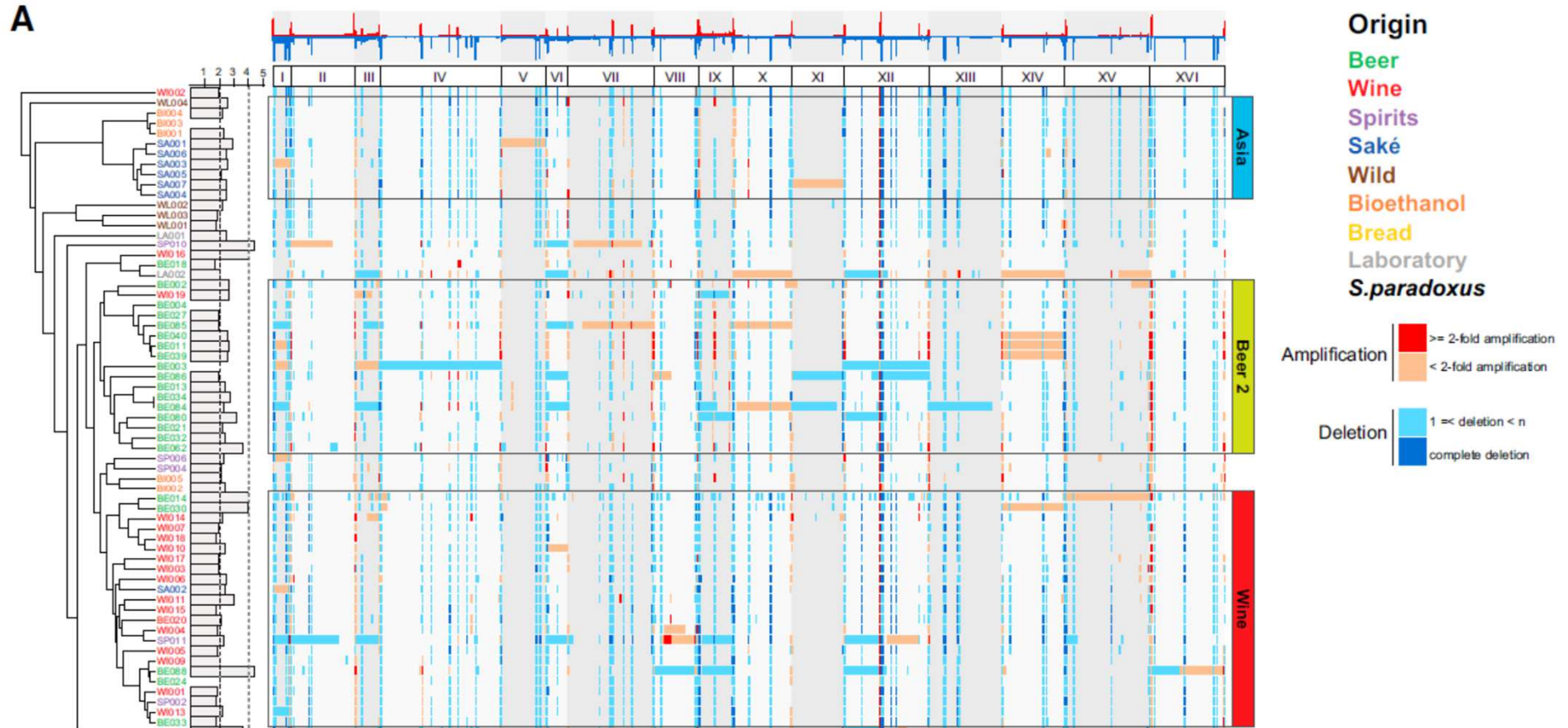


„očkovaním“ předchozích pivních kultur do nových kvasných procesů (ztráta kontaktu s přírodním prostředím - ~75 000 generací) – např. ztráta schopnosti sporulovat (stále bohaté médium), rychlejší evoluce ... nebo naopak zvýšení resistance vůči sulfátům (přidávaným kvůli konzervaci)

mutace a duplikace v MAL genech – zlepšení schopnosti utilizace maltosy

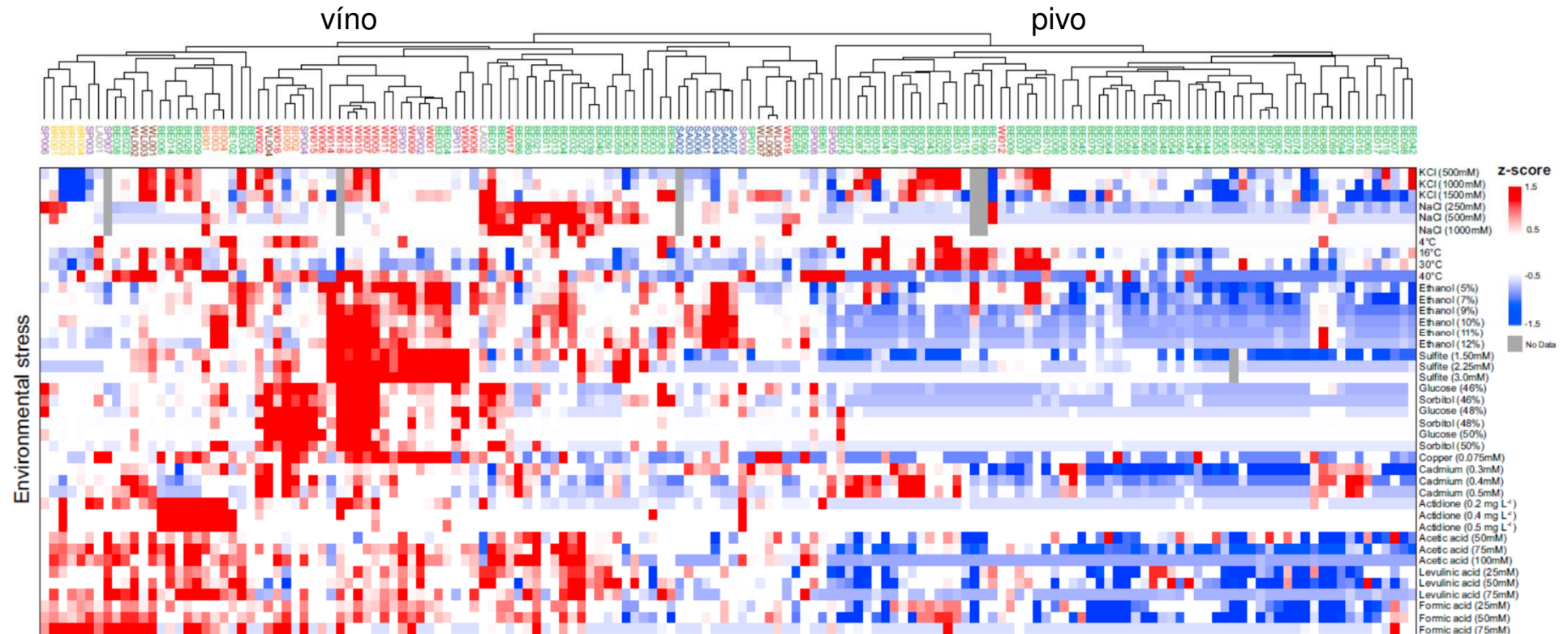
- nonsense mutace PAD1 a FDC1 (snížení produkce 4-vinyl guaiacolu odpovídajícího za nepříjemné aroma piva) ...

analýza genomu



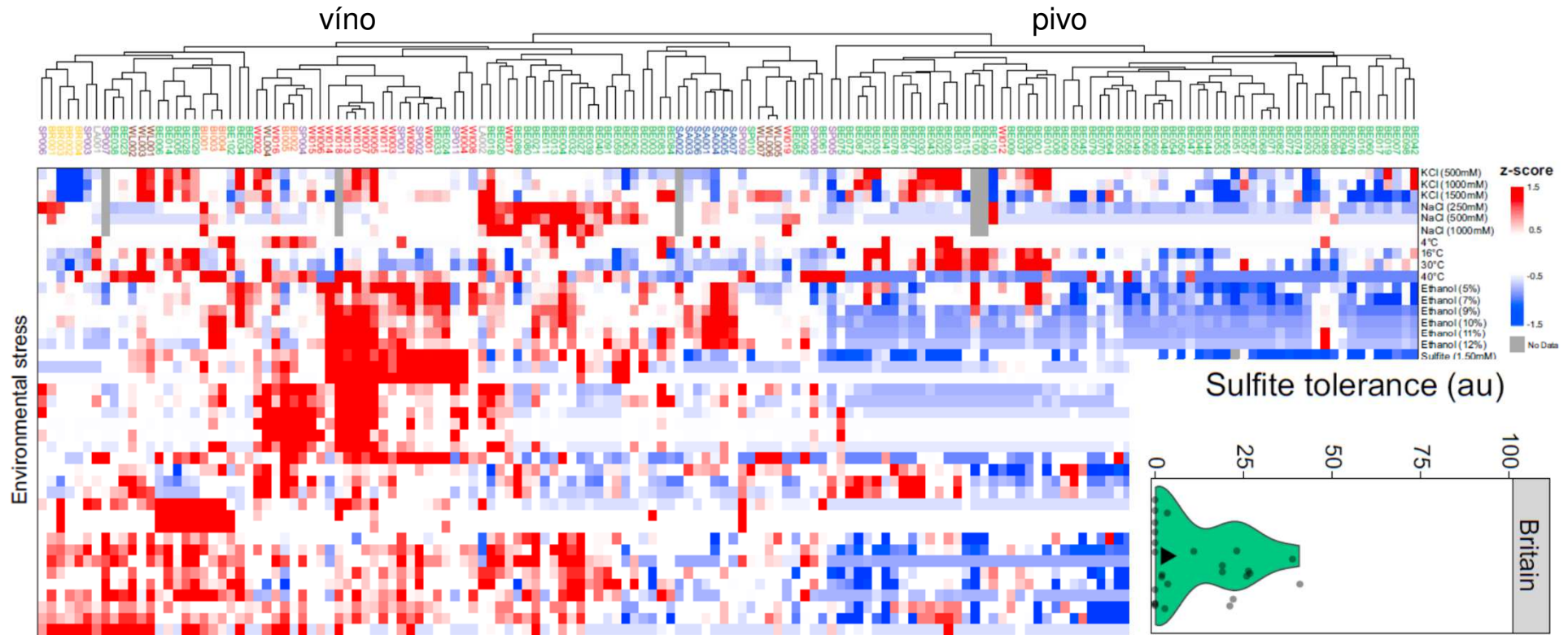
nejvíce amplifikací v MAL genech (IMA2, IMA3, MAL31, MAL33, MAL32) u pivních kvasinek (rostou na maltose), zatímco ve vinných kmenech došlo k mnoha delecím těchto genů (ve vinném moštu maltosa není) – obecně více delecí než amplifikací (v genomech analyzovaných kvasinek)

analýza fenomu

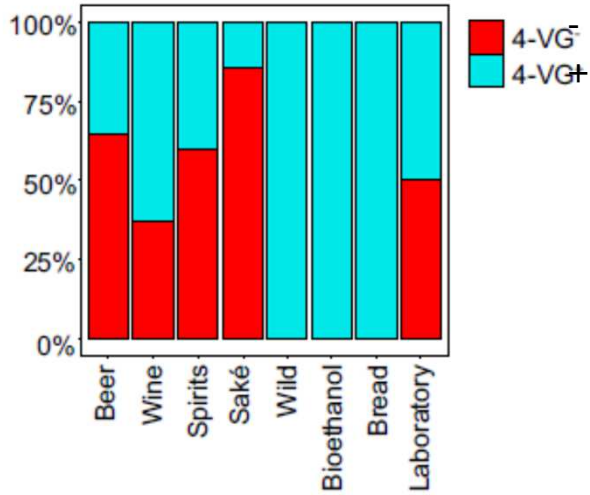


hierarchické členění výsledků analýzy fenotypu (fenomu) – určitá korelace s genomem ... - pivní linie (beer1) nejsou příliš odolné vůči stresu (nejsou mu vystaveny v pivovarech), zatímco vinné kvasinky jsou velice odolné (kvasné prostředí je bohaté na cukry a vyšší koncentrace alkoholu – hladina cukrů se v různých sezónách liší ... mimo sezonu přežívají v „přírodním“ prostředí – musí být adaptabilnější než pivní)

analýza fenomu

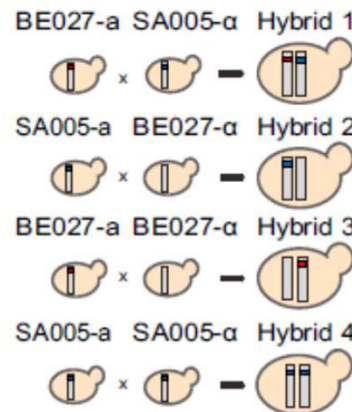
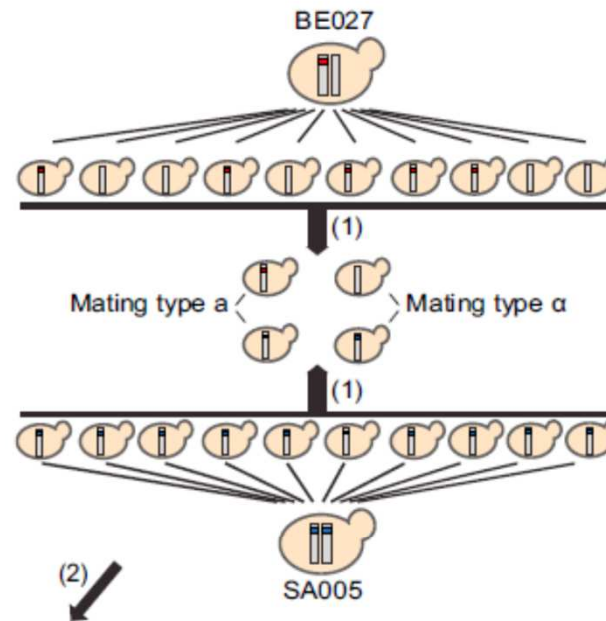


hierarchické členění výsledků analýzy fenotypu (fenomu) – určitá korelace s genomem ... - pivní linie (beer1) nejsou příliš odolné vůči stresu (nejsou mu vystaveny v pivovarech), zatímco vinné kvasinky jsou velice odolné ... zvýšení resistance vůči sulfátům (přidávaným kvůli konzervaci)

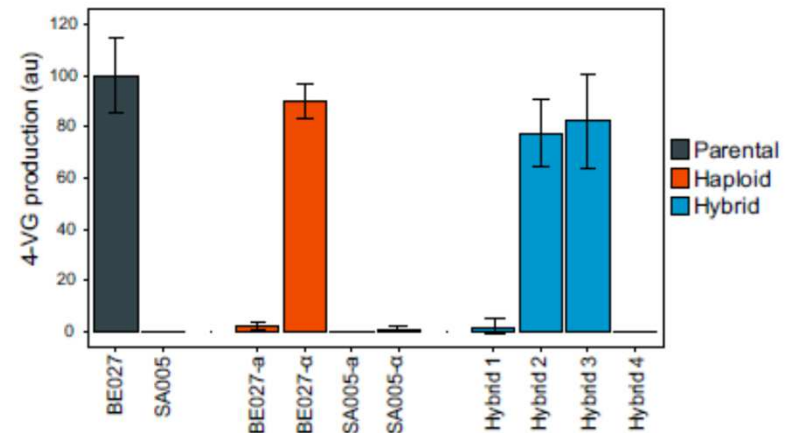


- divoké typy chrání před rostlinnými toxiny
- při pečení chleba jsou tyto látky zničeny
- pивní kmeny - nonsense mutace PAD1 a FDC1 (snížení produkce 4-vinyl guaiacolu odpovídajícího za nežádoucí aroma piva)

- křížily pивní kmen schopný produkce 4-vinyl guaiacolu s kmenem pro výrobu saké (vysoká produkce alkoholu)
- pивní produkt se specifickým aroma a vysokým obsahem alkoholu

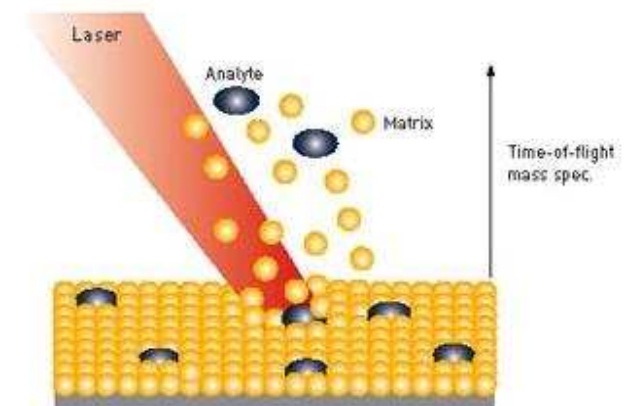
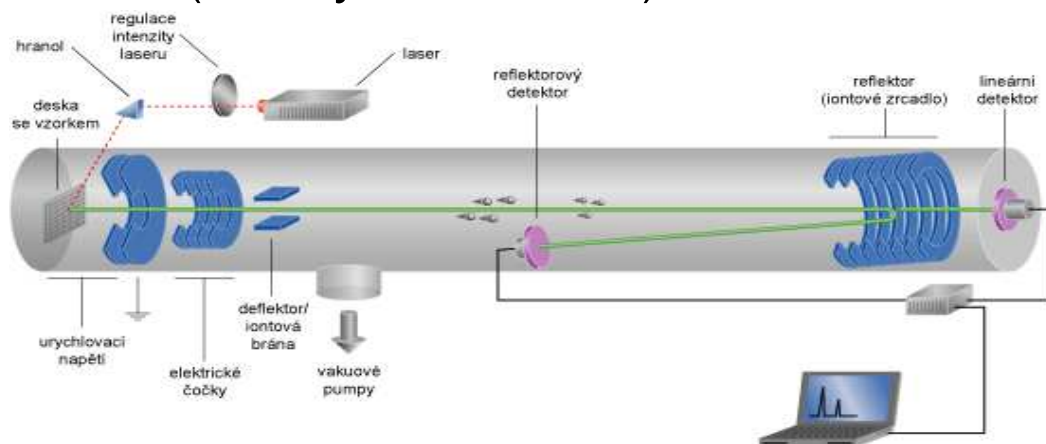


(3)



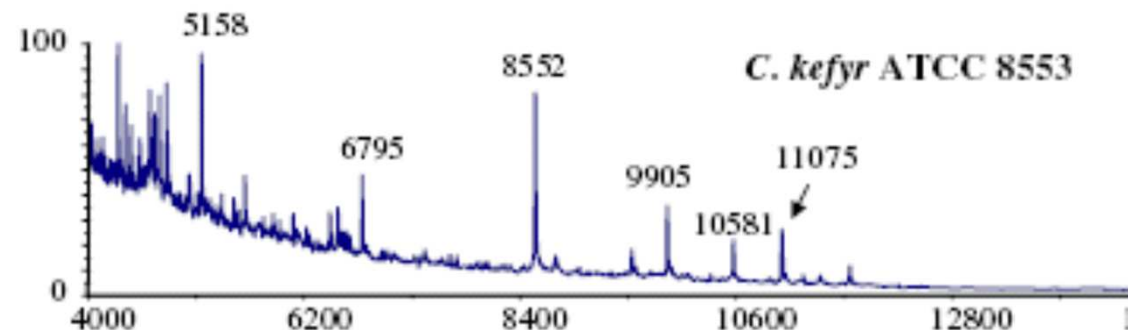
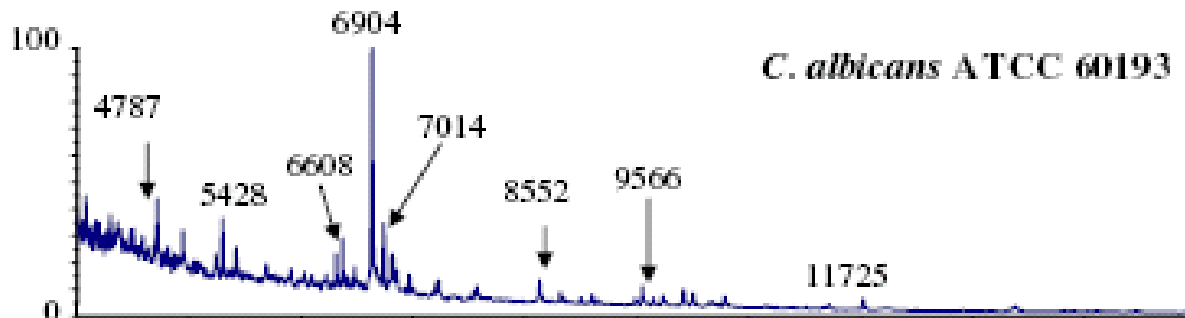
MALDI-TOF

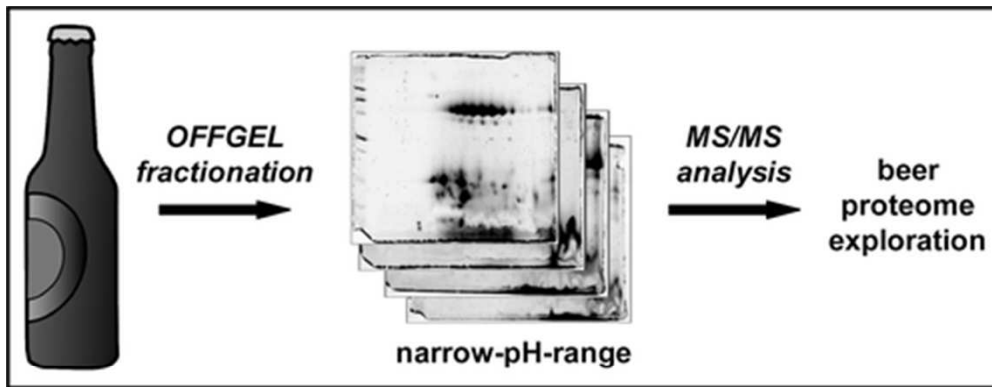
- hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry– MALDI-TOF)
- Umožňuje odpaření a ionizaci netěkavých biologických vzorků z pevné fáze přímo do plynné
- Vzorek je smíchán 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 vakuu v trubici detektoru - z jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje (z doby letu částice)



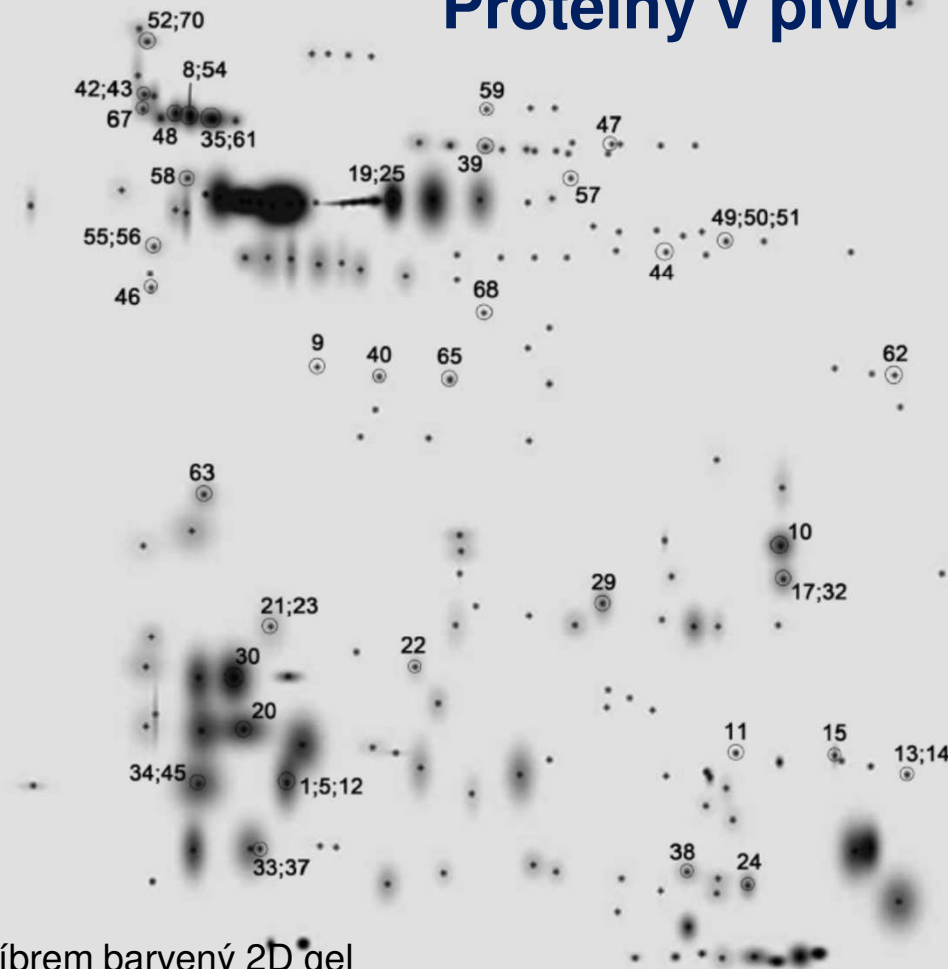
MALDI-TOF

- 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



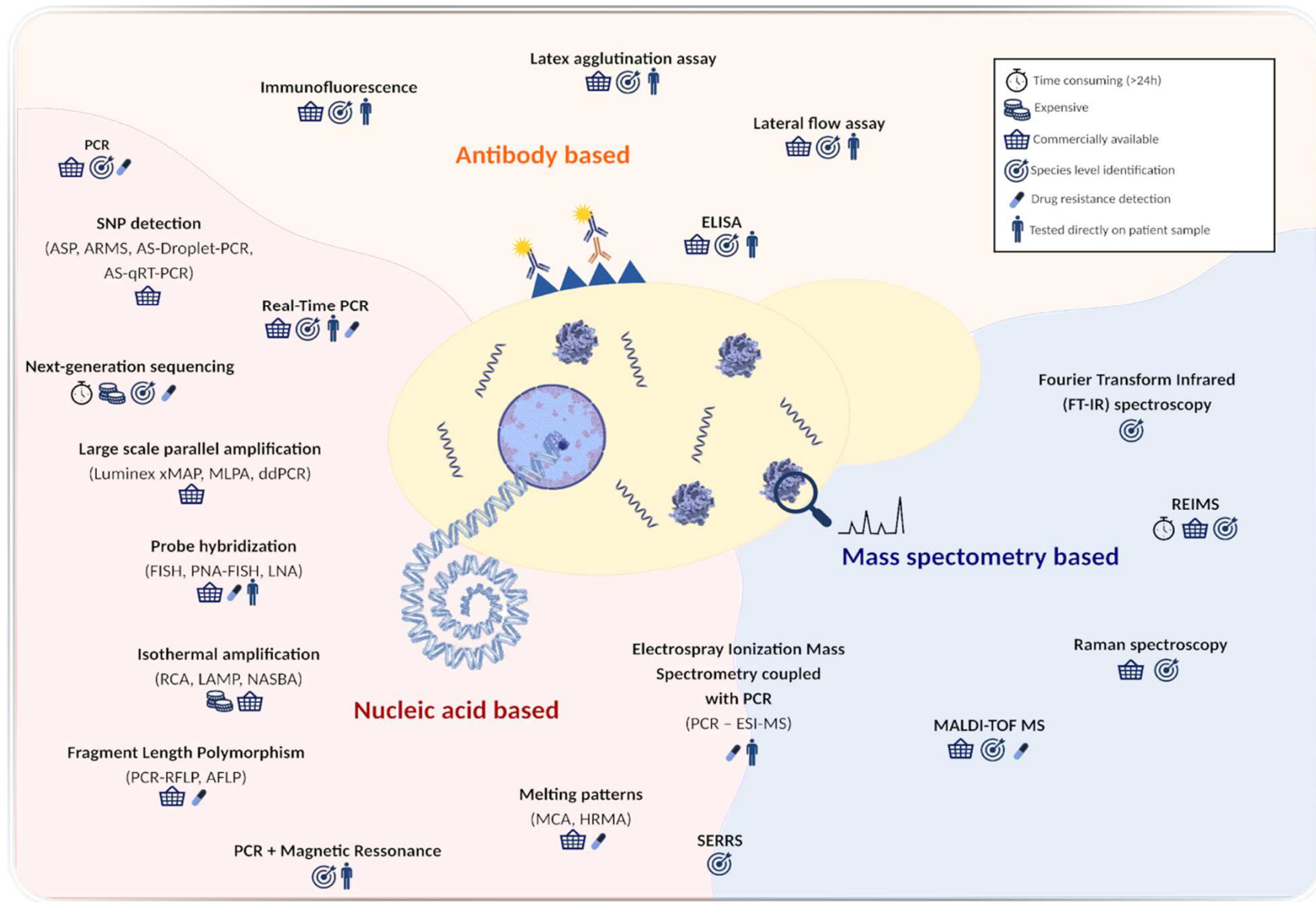


Proteiny v pivu



Stříbrem barvený 2D gel

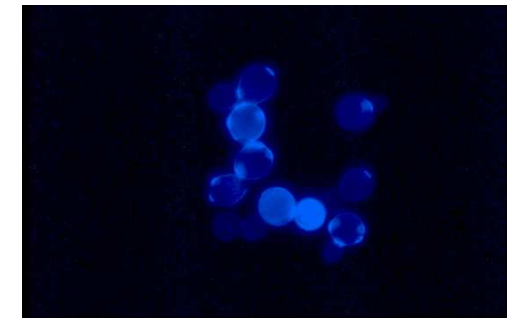
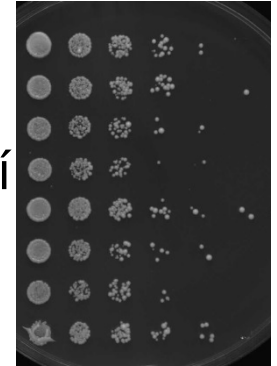
| no. | GI no. | protein name | score | pept |
|------------------------------|--------------|---|-------|------|
| <i>Saccharomyces</i> species | | | | |
| 39 | gil6321968 | 2-phosphoglycerate dehydratase | 1583 | 13 |
| 40 | gil10383781 | 3-phosphoglycerate kinase | 838 | 10 |
| 41 | gil48428723 | acyl-CoA-binding protein 2 | 72 | 3 |
| 42 | gil6323964 | cell wall protein, Scw10p | 644 | 8 |
| 43 | gil6321718 | cell wall protein, Scw4p | 298 | 7 |
| 44 | gil6320249 | coproporphyrinogen III oxidase | 105 | 5 |
| 45 | gil6321648 | cytoplasmic thioredoxin isoenzyme | 369 | 7 |
| 46 | gil6321721 | endo- β -1,3-glucanase | 797 | 7 |
| 47 | gil171455 | enolase | 1542 | 15 |
| 48 ^b | gil46395590 | glucan 1,3- β -glucosidase | 90 | 1 |
| 49 ^b | gil219564313 | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | 1111 | 13 |
| 50 | gil219564301 | glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase | 1190 | 14 |
| 51 | gil6322409 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, isozyme 1 | 708 | 8 |
| 52 | gil3730 | glycolipid-anchored surface protein | 195 | 8 |
| 53 | gil349747 | heat shock protein of HSP70 family | 88 | 2 |
| 54 | gil6323331 | major exo-1,3- β -glucanase | 491 | 9 |
| 55 | gil6322303 | mannose-containing glycoprotein | 75 | 4 |
| 56 | gil968906 | NCA3 | 299 | 5 |
| 57 ^b | gil6321973 | Oye2p | 82 | 1 |
| 58 | gil6325103 | Pep4p | 80 | 4 |
| 59 | gil6319673 | Pgi1p | 446 | 4 |
| 60 ^b | gil6324696 | profilin | 86 | 4 |
| 61 ^b | gil6322382 | Pry1p | 70 | 1 |
| 62 | gil6322697 | tetrameric phosphoglycerate mutase | 519 | 9 |
| 63 | gil6323138 | thioredoxin peroxidase | 757 | 4 |
| 64 ^b | gil6319638 | Tos1p | 132 | 1 |



Opathy, C., Gabaldón, T. (2019). Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS, *FEMS Microbiology Reviews*, 43 (5), 517–547. doi: 10.1093/femsre/fuz015

kvasinkové modelové organismy

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

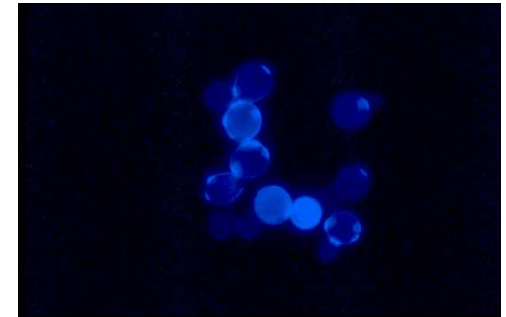


- Více v dalších přednáškách

kvasinkové modely

- *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, NGS - expresní profily za různých podmínek
- 6. FP – „3D Repertoire“ konsorcium (<http://www.3drepertoire.org>) - strukturu všech (cca800) komplexů *S. cerevisiae*

- Techniky synchronizace buněk
- Techniky barvení (např. aktinový cytoskelet = phalloidin, buněčná stěna = calcofluor)



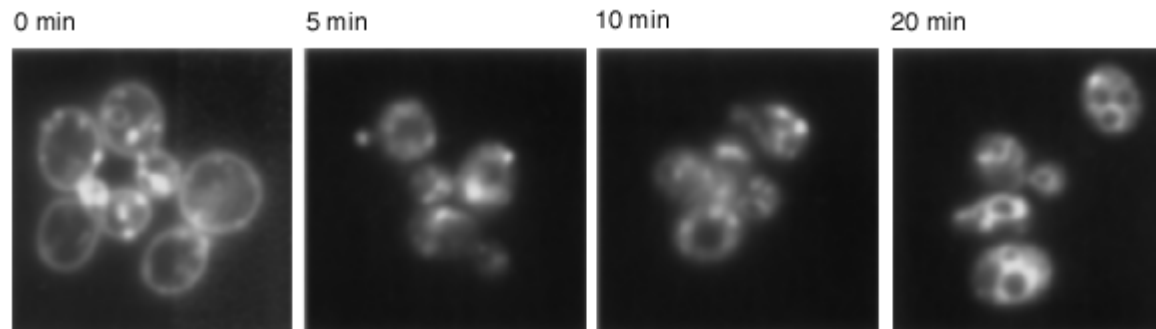
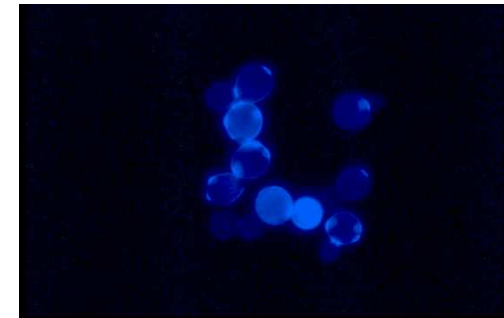
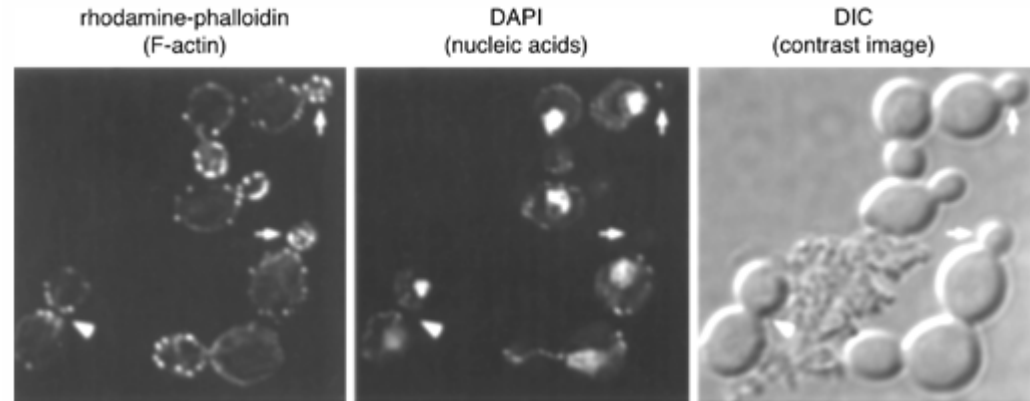
- Řada životních dějů má analogii v procesech v savčích buňkách (lidské geny testovány v kvasinkách - nemoci, metabolismus, regulační mechanismy)

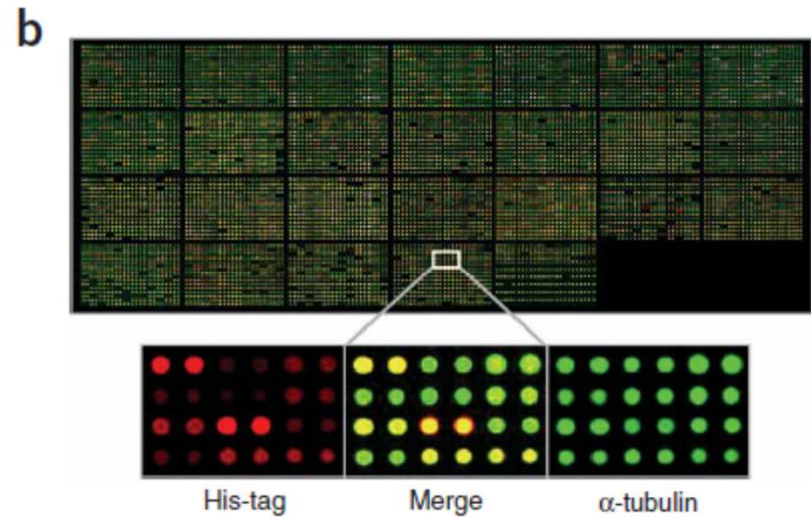
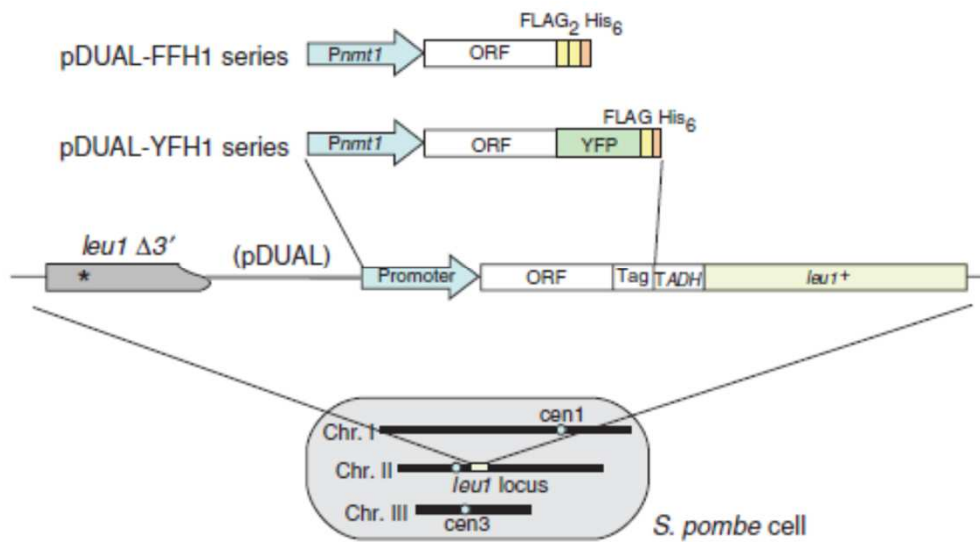
Table 1. MOD access and NIH grant data from 2020 for biomedical research

| Database | Page views | Sessions | Users | Number of NIH grants |
|--------------------------------|------------|----------|-------|----------------------|
| SGD (<i>Saccharomyces</i>) | 6100K | 1708K | 872K | 797 |
| WormBase (<i>C. elegans</i>) | 4352K | 1328K | 607K | 744 |
| FlyBase (<i>Drosophila</i>) | 7464K | 1644K | 612K | 1111 |
| ZFIN (Zebrafish) | 3884K | 721K | 313K | 1044 |
| Xenbase (<i>Xenopus</i>) | 967K | 107K | 19K | 304 |
| MGI (Mouse) | 7993K | 1880K | 1051K | 14,606 |
| RGD (Rat) | 828K | 368K | 308K | 2846 |
| Total: | 31,200K | 7756K | 3782K | 21,452 |

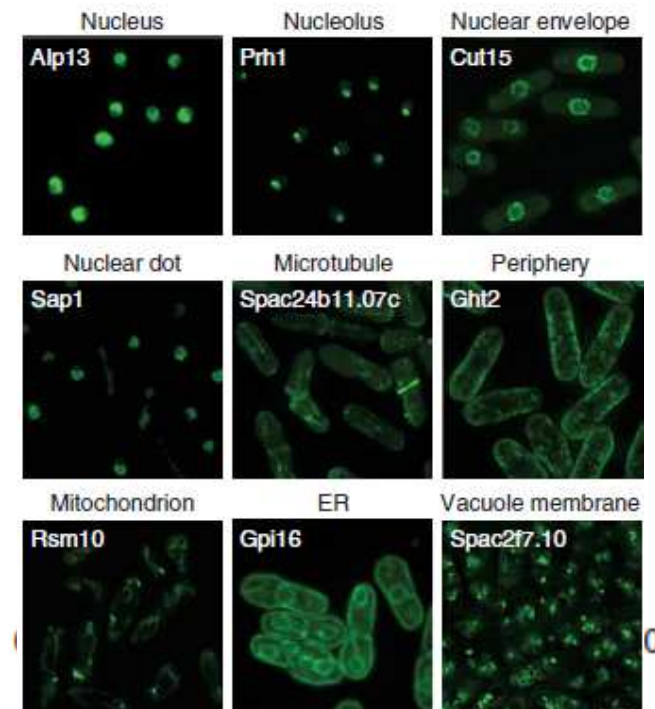
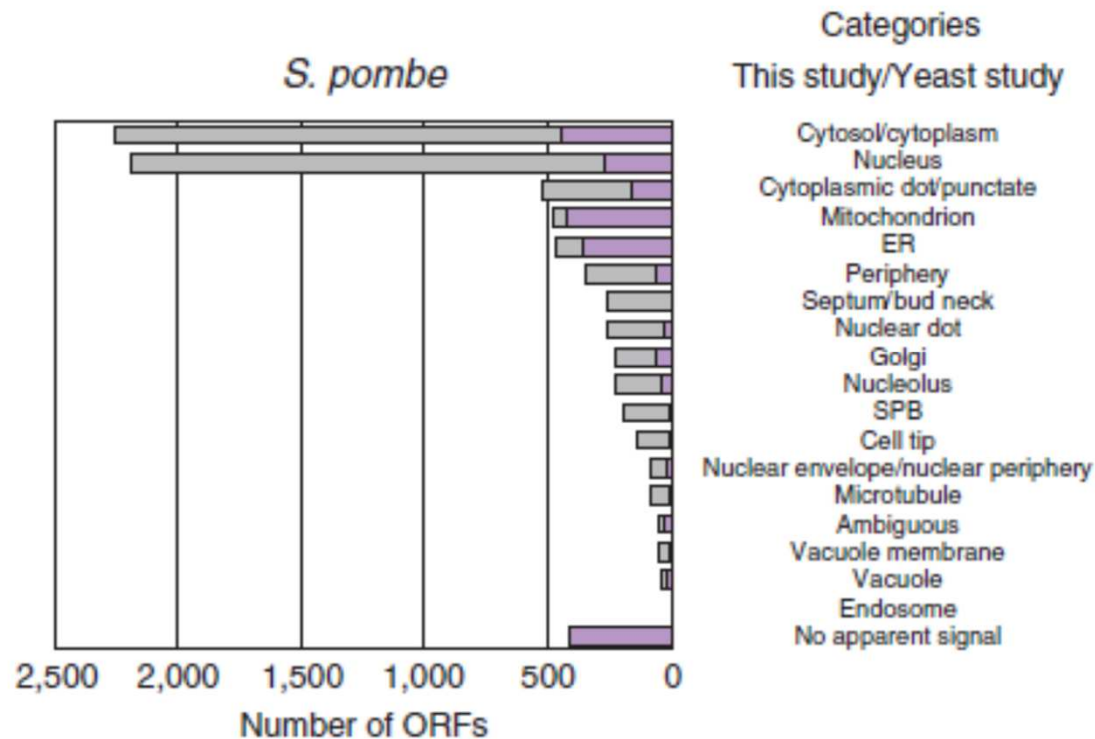
... metody studia – fluorescenční ...

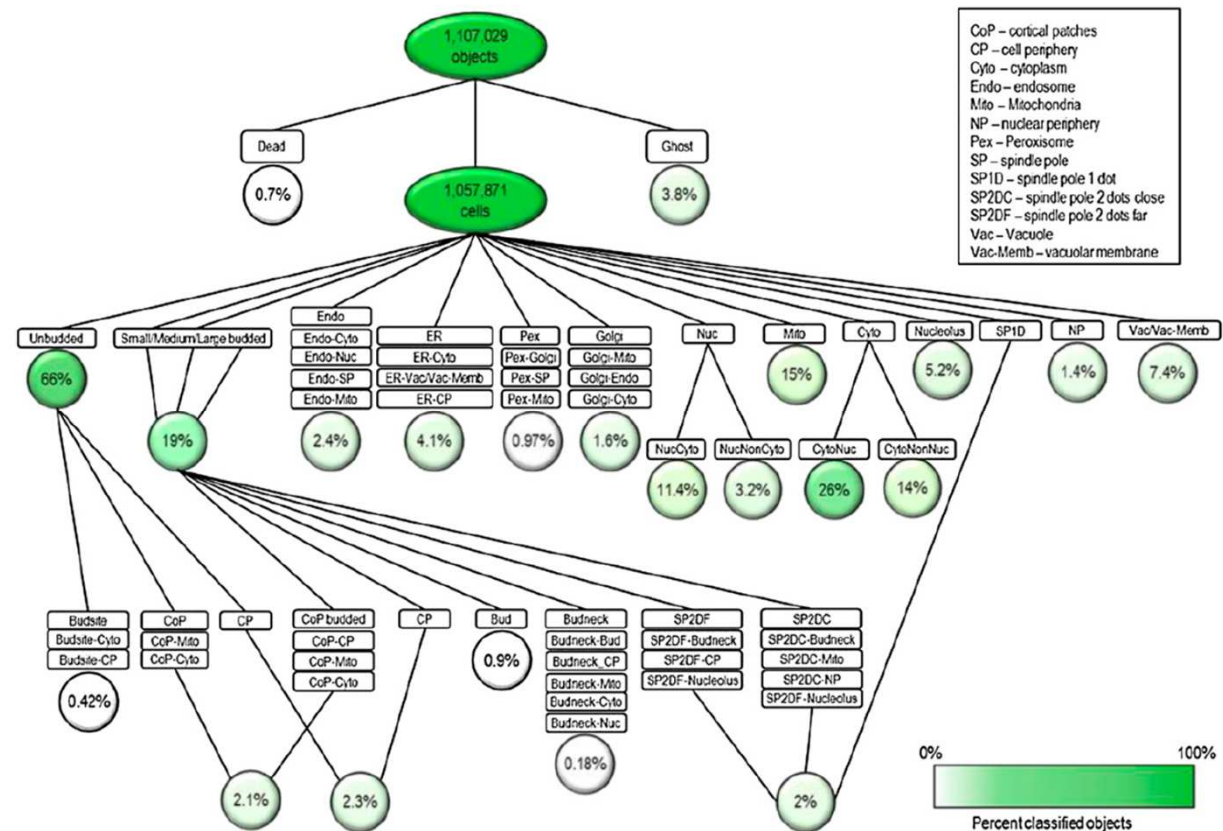
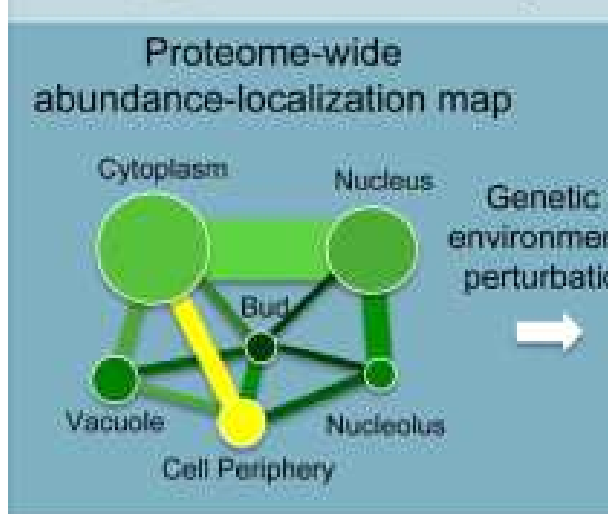
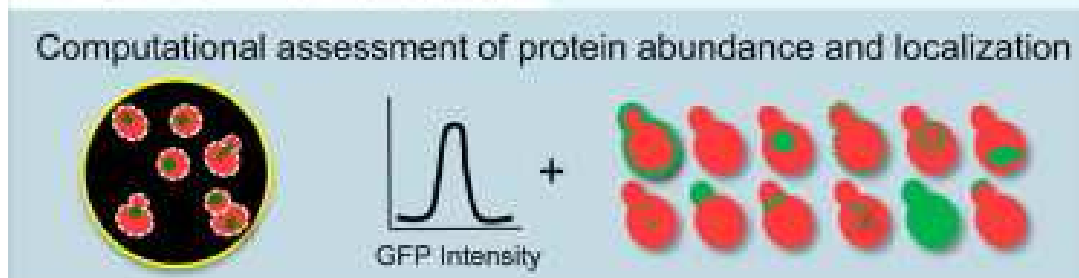
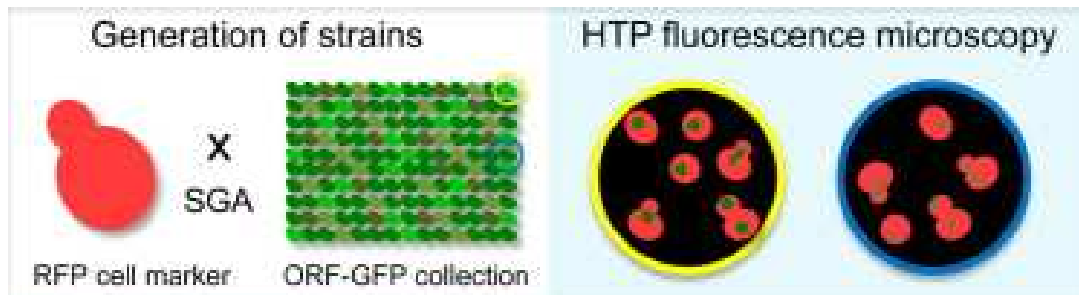
- Techniky barvení
 - FISH – lokalizace spec. sondy
 - DNA/jádro – **DAPI**
(4',6-diamidin-2-fenylindol)
 - aktin – **phalloidin**
 - buněčná stěna – **calcofluor**
 - Endocytóza ->vakuoly – **FM4-64**
 - Mitochondrie, ER - **DiOC₆**
(3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide)
 - proteiny tagované GFP (*in vivo*)





Určení lokalizace





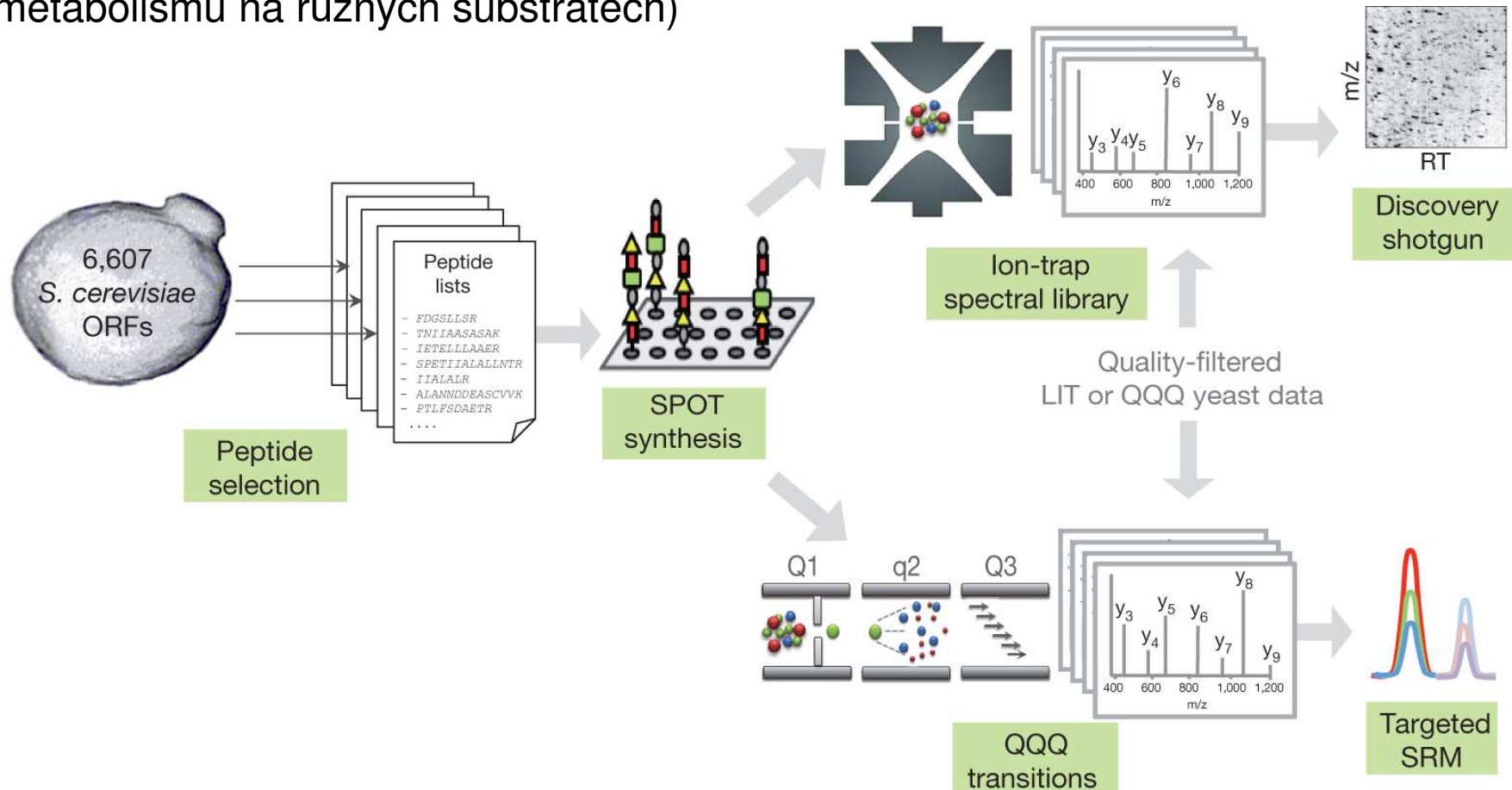
Chong et al., Cell, 2015

Koh et al., G3, 2015

<http://cyclops.ccbr.utoronto.ca/>

MALDI-TOF

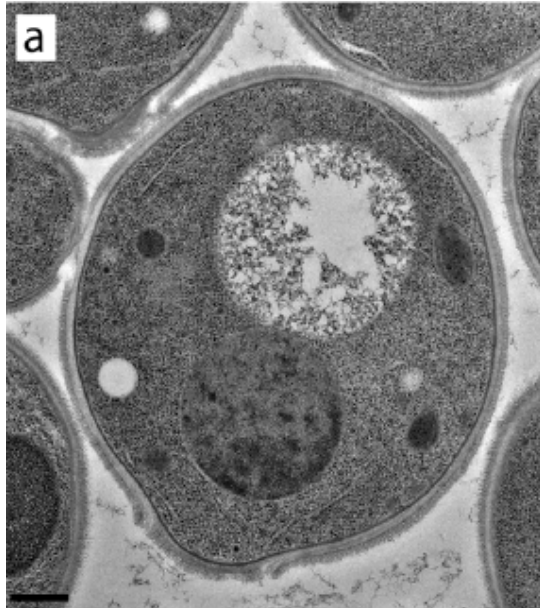
Vygenerování referenční „mass-spectrometric“ mapy pro kvasinkový proteom
Tak jako se sekvenoval kvasinkový genom (první eukar.), tak se „sekvenuje“ proteom – slouží ke sledování exprese/přítomnosti proteinů v kvasinkové buňce za různých podmínek/situací (např. změny proteomu v průběhu buněčného cyklu, změny metabolismu na různých substrátech)



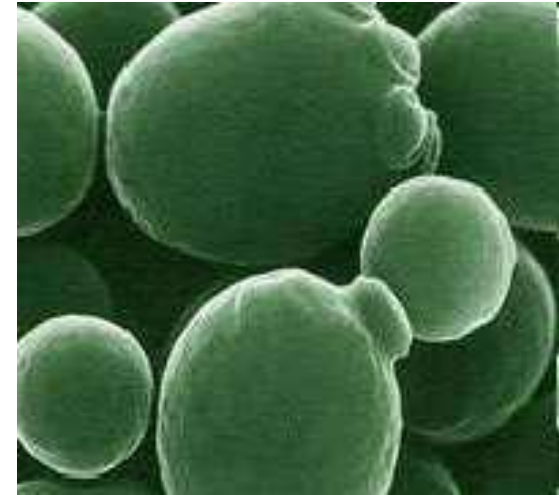
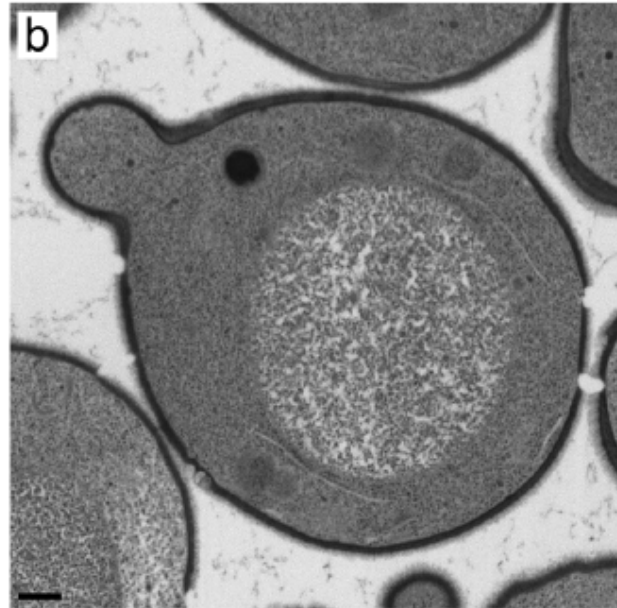
Elektronová mikroskopie

Wei, et al., BioTechniques, 2012

TEM

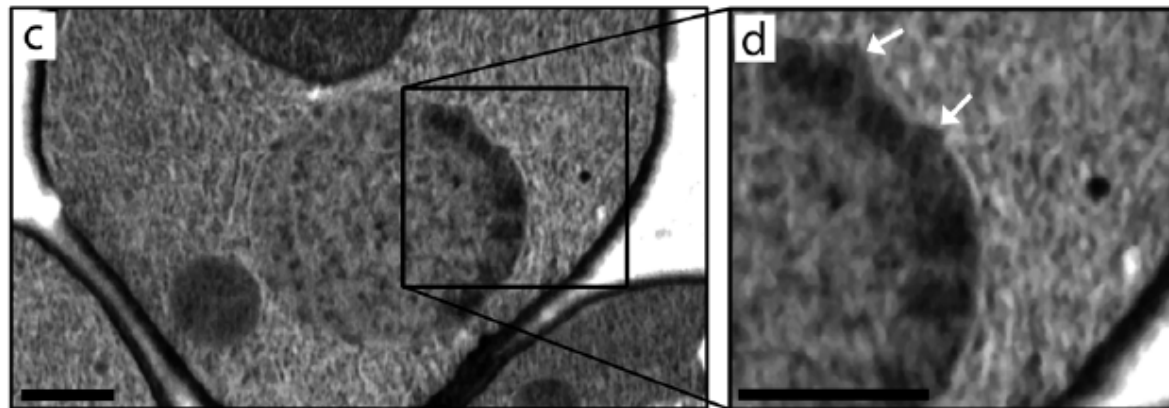


FIB - SEM



- studium buněčné stěny
... organel (sekrece ...)

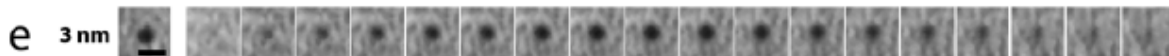
více Dr. Špirek



- šipky ukazují na jaderné póry

- vzorek „prosáknut“
epoxypryskyřicí a osmiem

- „focused-ion beam
scanning“ 3nm/pixel



cryoEM tomografie

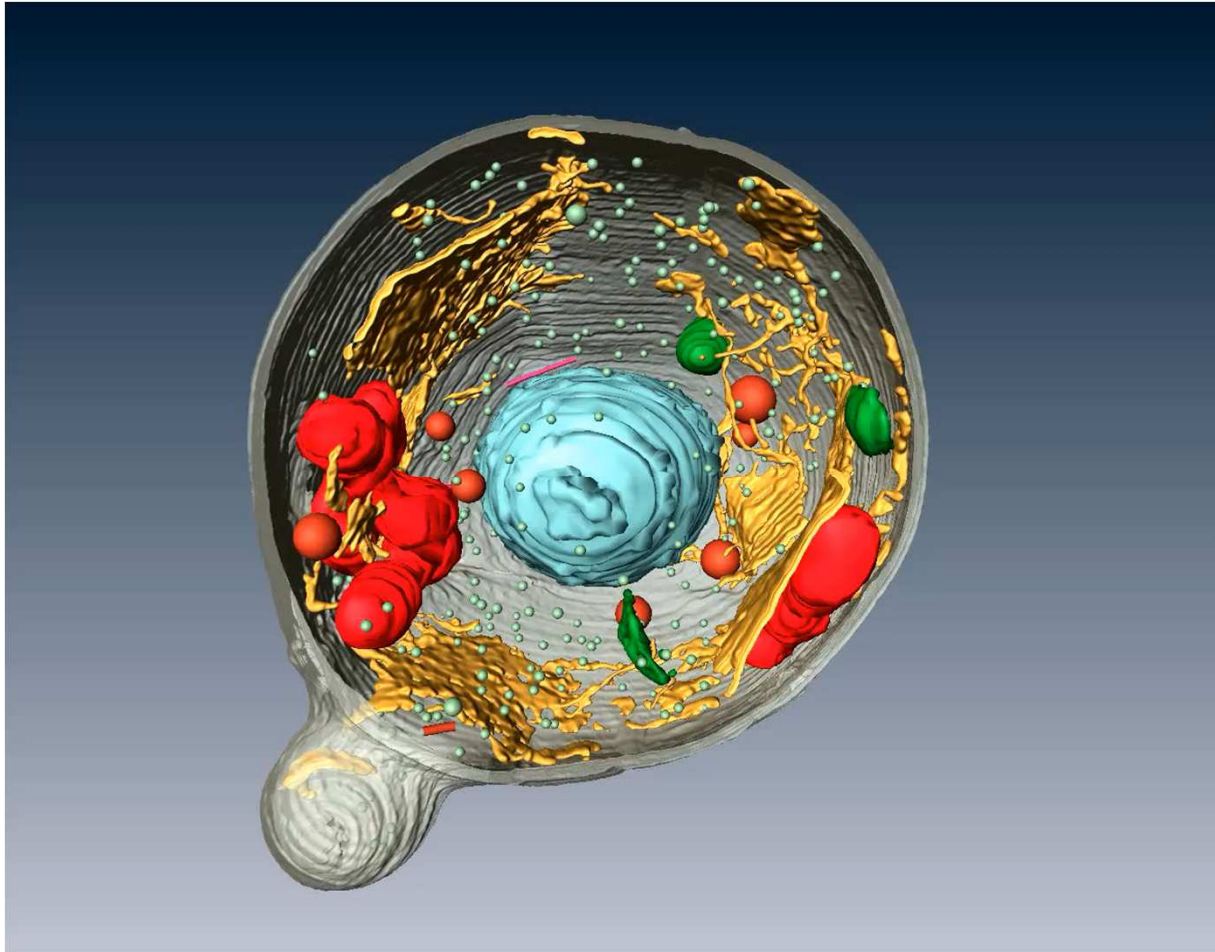
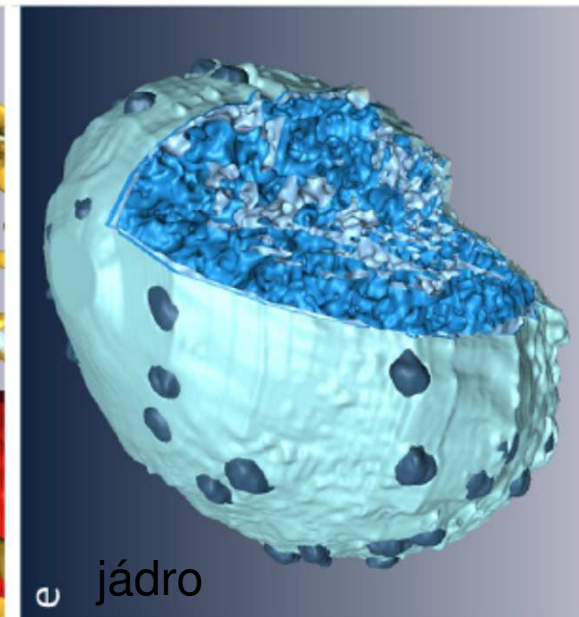
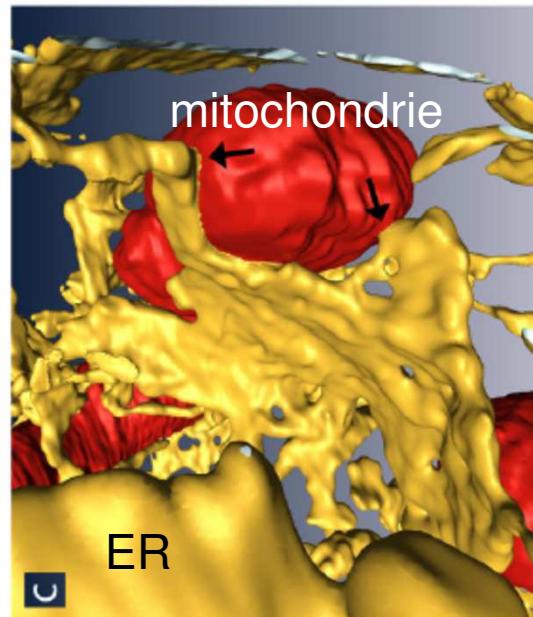
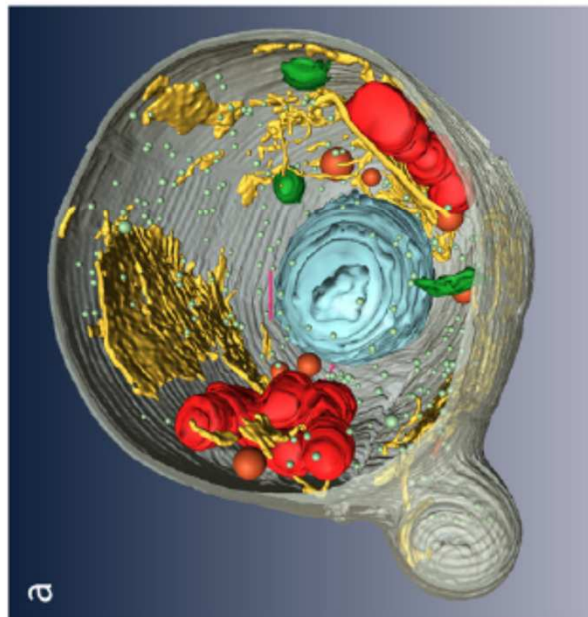
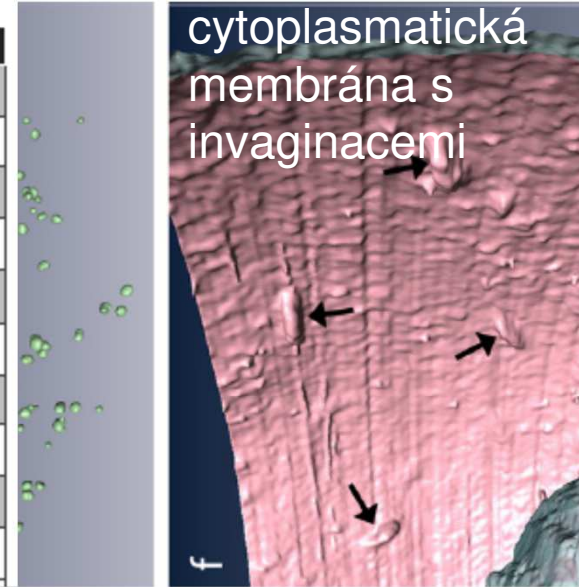


Figure 2. 3D segmentation. (A) 3D 3.72 nm × 3.72 nm × 15 nm anisotropic FIB data set showed endoplasmic reticulum (ER; yellow), nucleus (light blue), cisternae (green), vesicles (light green), lipid droplets (orange), microtubules (pink), mitochondria (red) and cell wall (gray). (B) 3D segmentation of ER (yellow), mitochondria (red) and nucleus (blue) of a whole yeast cell at 5 nm isotropic voxels. Cell

http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00182/Cyzmmek_Supplementa_182027a.mpg

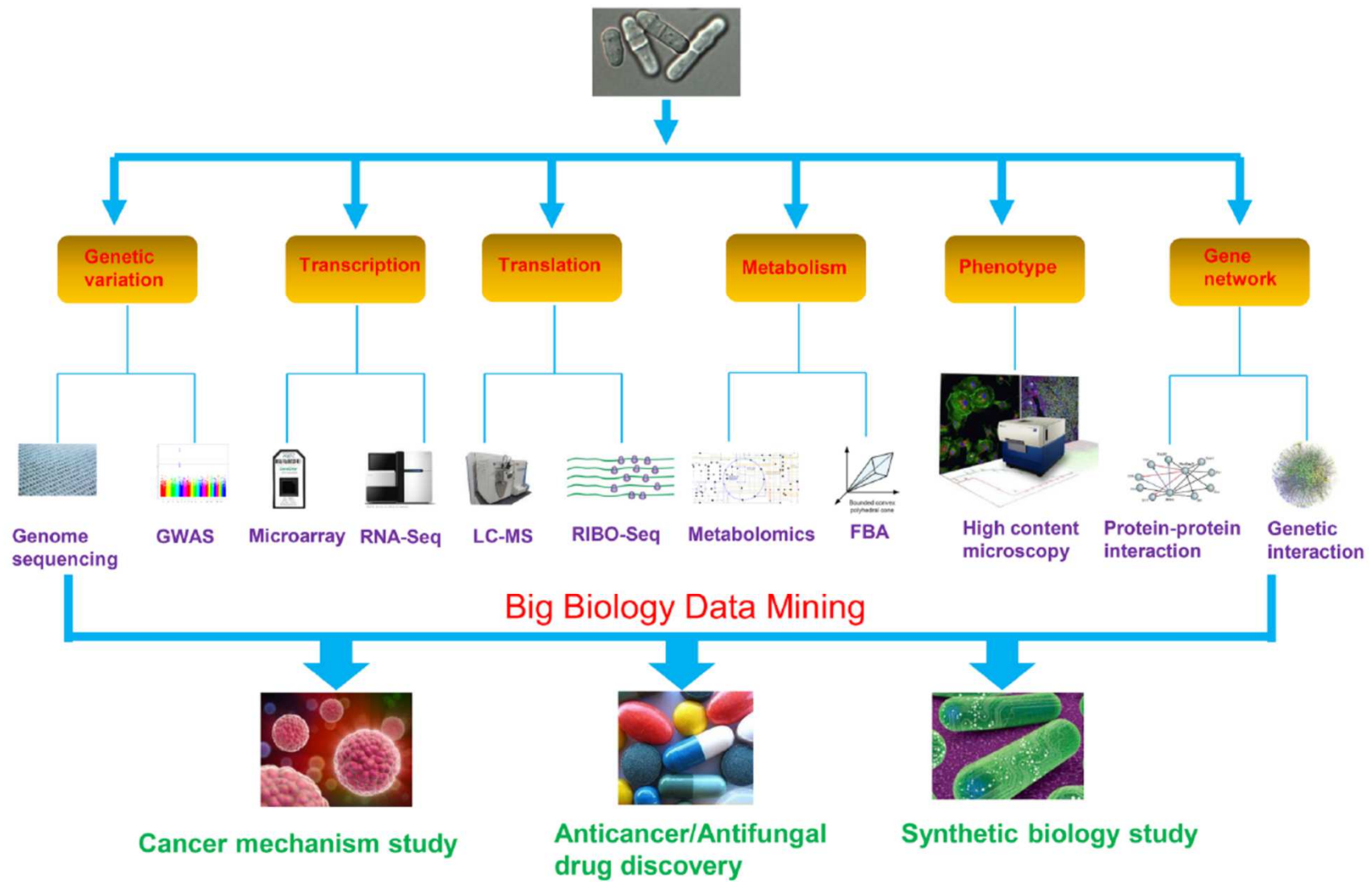
Table 1. Quantitative Analysis of Cellular Components.

| 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 |



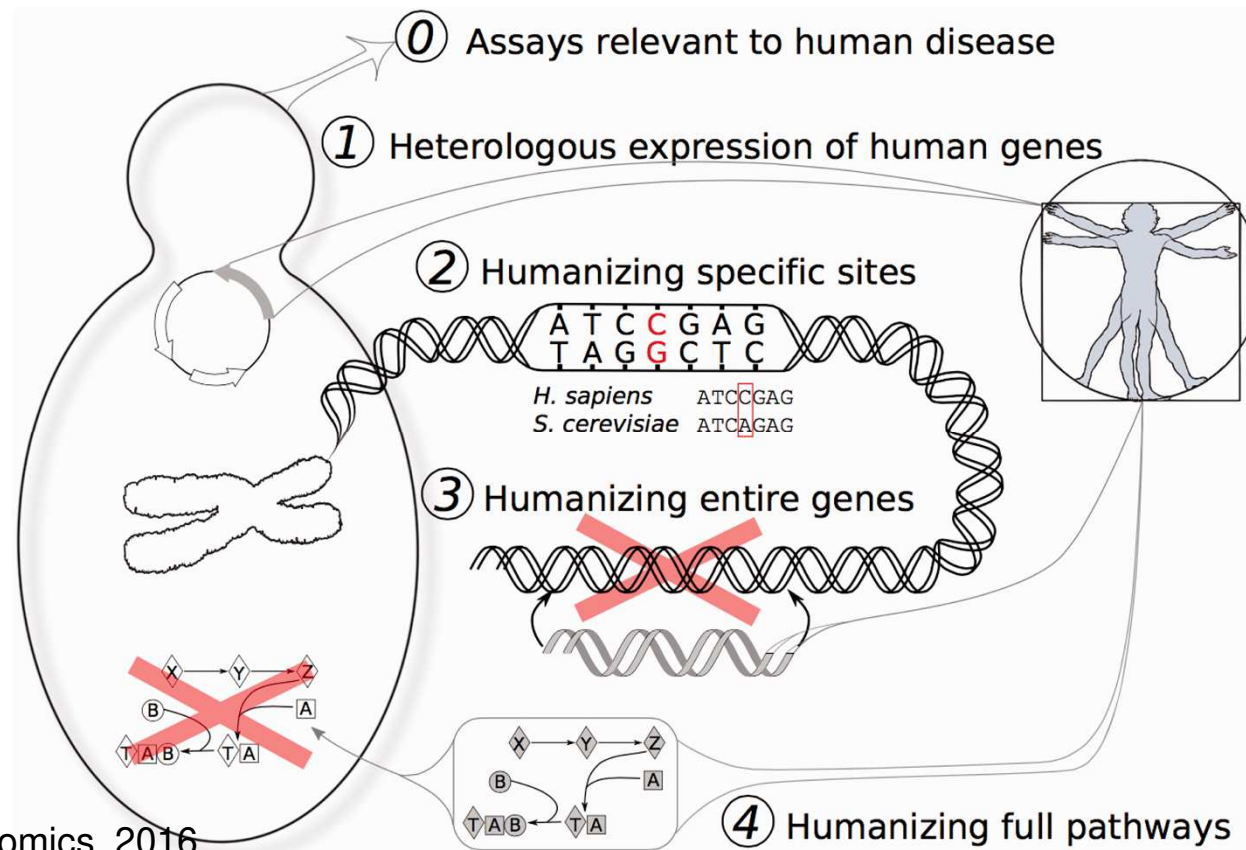
Wei, et al., BioTechniques, 2012

http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00182/Cyzmmek_Supplementa_182027a.mpg



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 2300 z 6000 genů má ortology v genomu člověka)
 - 1/2 z 550 esenciálních genů je komplementována lidskými ortology



Kim et al., J Microb, 2020

Laurent et al, Brief in Funct Genomics, 2016

- Více v dalších přednáškách

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.

[research group leader in t...](#) [ScholarOne Manuscripts](#) [Osobní stránka MUDr. Len...](#) [Klinika nemocí plicních a ...](#) [The Deubiquitinase USP37...](#) [Cohesin recruits the Escol... YeastMine: Template que...](#)
[Soubor Úpravy Zobražit Obilíbené položky Nástroje nápověda](#) [x EndNote 3.10 Capture ? Help](#) [Zprávy IDNES.cz - Přehled...](#) [Vltava - Klasická hudba, lit...](#) [Internet - Radio Proglas](#) [Po dlouhé nemoci zemřel ...](#)
 Search and retrieve S. cerevisiae data with YeastMine, populated by SGD and powered by InterMine.
YeastMine
 Data Updated on: Aug-24-2015
[Home](#) [Templates](#) [Lists](#) [QueryBuilder](#) [Tools](#) [Regions](#) [Data Sources](#) [API](#) [MyMine](#) [Log in](#)
 Search:

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](#)
 Search:

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 | Complement Publication . Pub Med Id | Complement Source | Complement 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 |

Výzkum

- sekrece, endocytóza, buněčná stěna (prof. Schekman ...)
- mechanismy opravy poškozené DNA (nádorové syndromy)
- metody využívající kvasinky (např. 2-H, reporterové systémy ...)

| 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 |

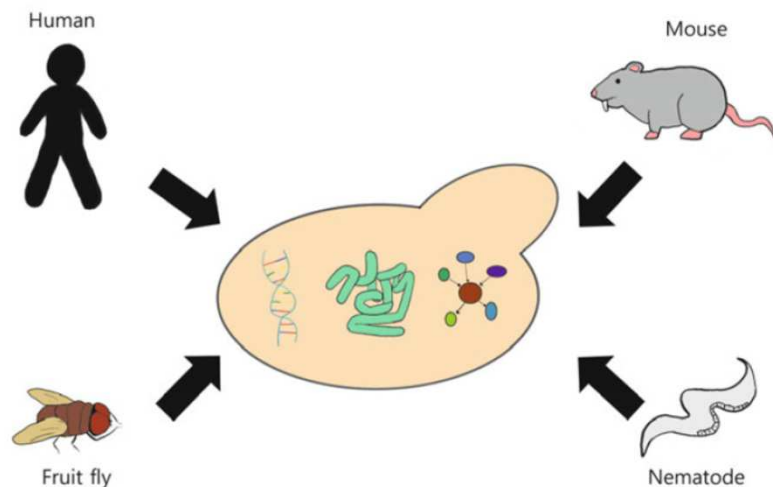


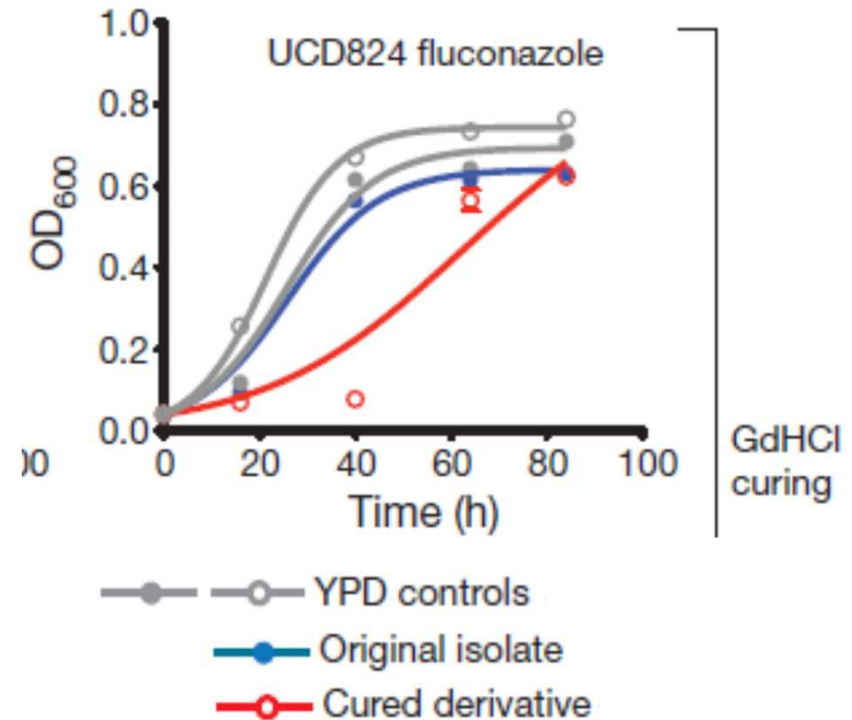
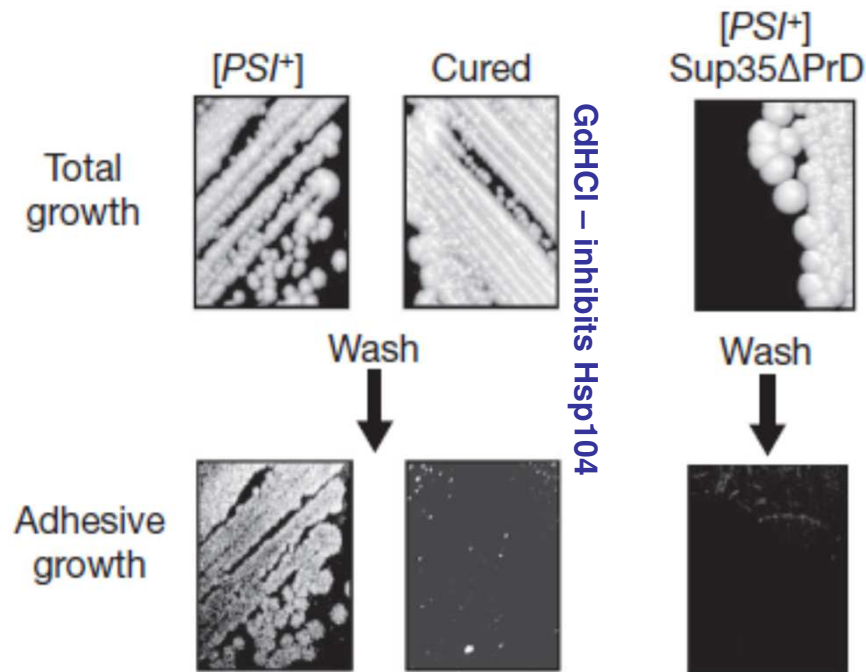
Table 4 *Schizosaccharomyces pombe* genes related to h

| Human cancer gene | <i>S. pombe</i> gene/product |
|--|------------------------------|
| Xeroderma pigmentosum D; <i>XPD</i> | rad15, rhp3 |
| Xeroderma pigmentosum B; <i>ERCC3</i> | rad25 |
| Hereditary non-polyposis colorectal c | msh2 |
| Xeroderma pigmentosum F; <i>XPF</i> | rad16, rad10, rad20, swi9 |
| Immunodeficiency; DNA ligase 1 | cdc17 |
| HNPCC; <i>PMS2</i> | pms1 |
| HNPCC; <i>MSH6</i> | msh6 |
| HNPCC; <i>MSH3</i> | swi4 |
| HNPCC; <i>MLH1</i> | mlh1 |
| Haematological Chediak–Higashi syr | – |
| Darier–White disease; <i>SERCA</i> | pgak |
| Bloom syndrome; <i>BLM</i> | hus2, rqh1, rad12 |
| Ataxia telangiectasia; <i>ATM</i> | tel1 |
| Xeroderma pigmentosum G; <i>XPG</i> | rad13 |
| Tuberous sclerosis 2; <i>TSC2</i> | – |
| Immune bare lymphocyte; <i>ABCB3</i> | – |
| Downregulated in adenoma; <i>DRA</i> | – |
| Diamond–Blackfan anaemia; <i>RPS19</i> | rps19 |
| Cockayne syndrome I; <i>CKN1</i> | – |
| <i>RAS</i> | ste5, ras1 |
| Cyclin-dependent kinase 4; <i>CDK4</i> | cdc2 |
| CHK2 protein kinase | cds1 |
| <i>AKT2</i> | pck2, sts6, pkc1 |

* Scores are: +++, 1×10^{-100}; +, 1×10^{-40} to 1×10^{-100}.

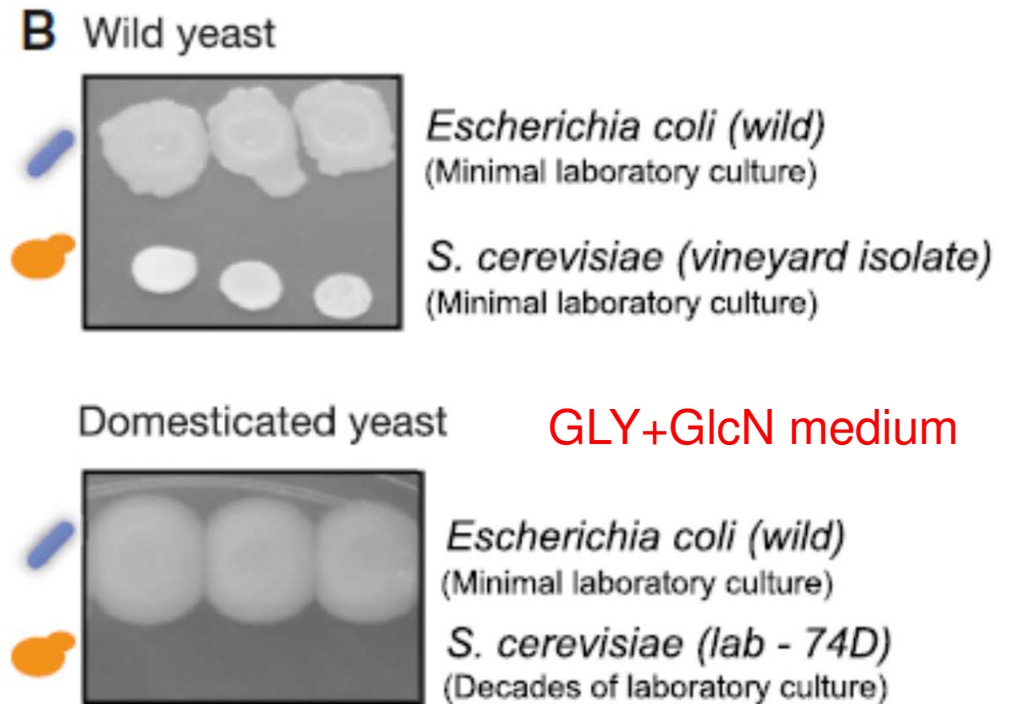
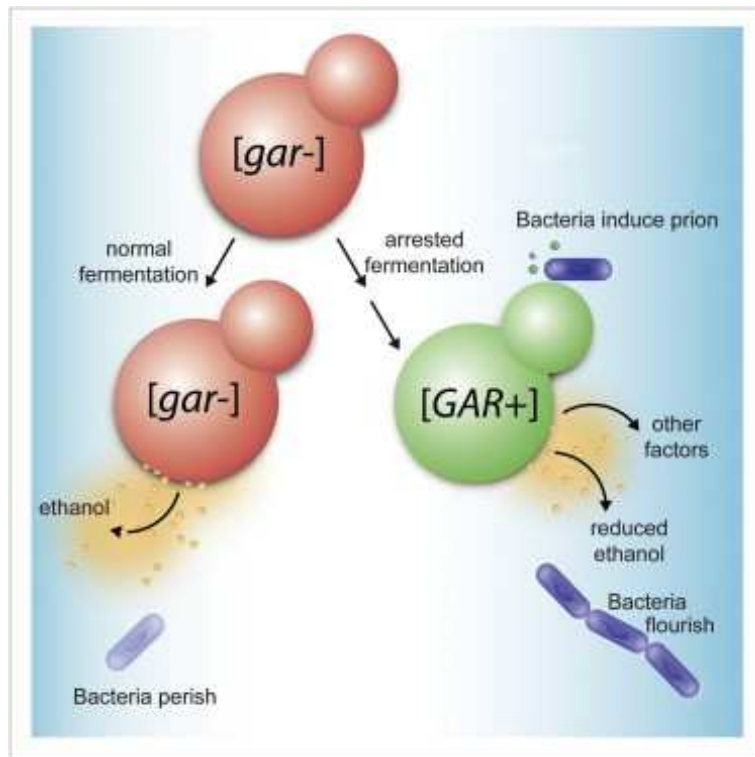
Priony – epigenetická informace kvasinek

Adhesivní vlastnosti mohou být ovlivněny přítomností prionů [PSI⁺] kódovaných Sup35 genem - jeho PrD doména spouští tvorbu amyloidových agregátů)



Sup35 je translační terminační faktor (zastavuje translaci na STOP kodonu) – pokud agreguje/nefunguje, dochází k read-through genů tj. vznikají proteiny s delší sekvencí a novými vlastnostmi (záleží na genomu dané kvasinky jaké) – mohou dát kvasince nové výhody (např. zvýšenou rezistenci k fluconazolu)

Priony – epigenetická informace kvasinek



Kvasinkový [GAR] prion je indukován některými bakteriálními toxiny – způsobuje potlačení glukosové represe a „přepnutí“ kvasinkového metabolismu na ostatní cukry – kvasinky tak získávají schopnost využít větší spektrum substrátů a nemění je striktně na alkohol – díky nižšímu množství alkoholu uvolněnému do prostředí mohou lépe přežít i bakterie (pro něž jsou vyšší koncentrace etanolu toxické) – vzájemně výhodné pro oba mikroorganismy

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)

