

C9045 - Biologie kvasinek



Hustopeče u Břeclavi



doc. Jan Paleček
jpalecek@sci.muni.cz
(garant – C02, 214)



Dr. Mário Špirek

O čem se dozvíte?

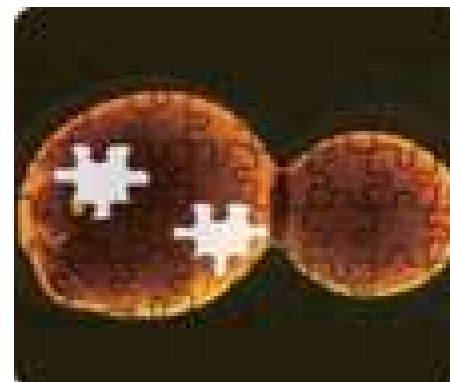
- Význam – výskyt, využití, výzkum ...
- Mikrobiologie - základní charakteristiky
- *Biotechnologie - metody*
- Genetika - metody
- Klinické aspekty – patogenní kmeny
- Buněčná biologie – buněčná stěna ...
- Molekulární biologie – buněčný cyklus, transkripce, chromosomy, evoluce

Rozvrh přednášek

05.10.2023	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam, základní charakteristiky kvasinek
12.10.2023	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Mitochondrie, chromosomy
19.10.2023	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Diagnostické a molekulárně biologické metody
26.10.2023	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
02.11.2023	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
09.11.2023	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
16.11.2023	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
23.11.2023	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
30.11.2023	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
07.12.2023	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Organizace genomu a evoluce kvasinek
14.12.2023	8-12hod	B07-2.17	Paleček+Špirek	Cvičení k přednáškám
21.12.2023	9-12hod	C02-211	Doc. Paleček	test + předtermín zkoušky

Přednášky – PDF na IS po přednášce
Cvičení – blokově
2-3 termíny zkoušení
(na čem studenti pracují?)

test a přednáška



Osnova 1. přednášky

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

ÚVOD



Hustopeče u Břeclavi

Informační zdroje

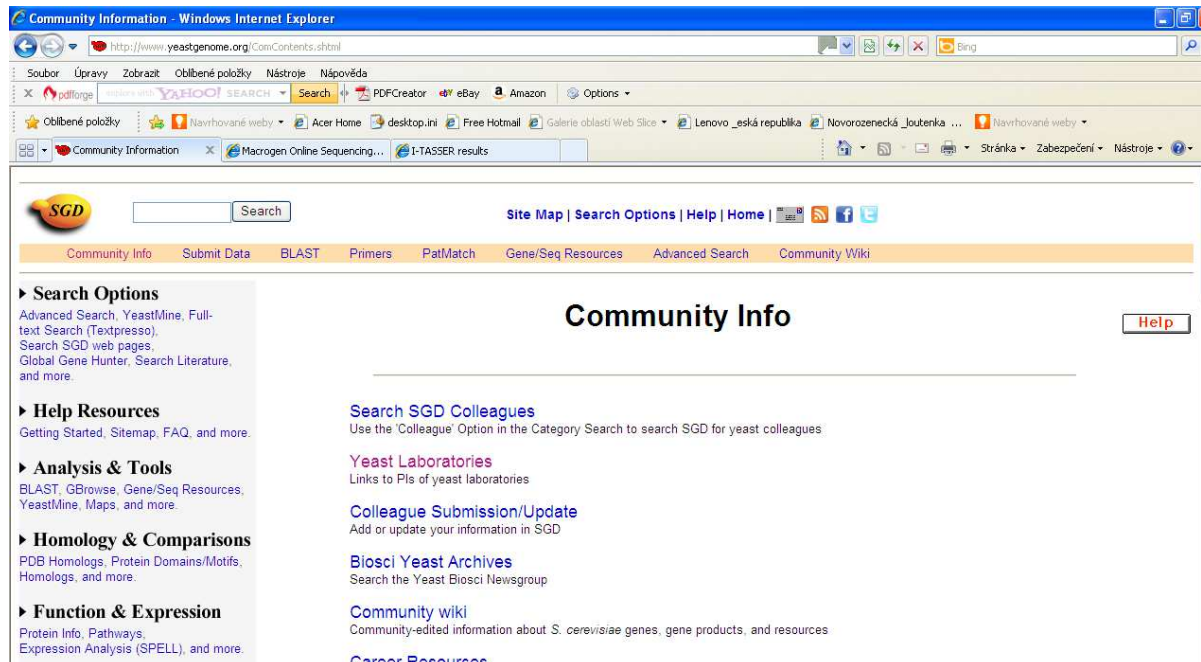
Janderová & Bendová: Úvod do biologie kvasinek, nakladatelství Karolinum (1999)

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

F. Sherman: Getting started with yeast, *Methods Enzymol.* **350**, 3-41 (2002):

... 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



smc5 / SPAC14C4.02c details

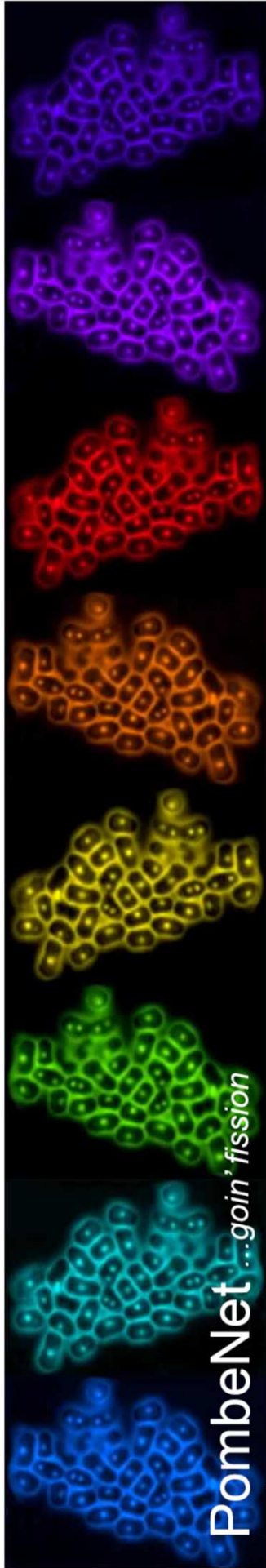
Gene standard name	smc5	Characterisation status	published
Product	Smc5-6 complex SMC P-loop ATPase subunit Smc5	Feature type	protein coding
Systematic ID	SPAC14C4.02c	Product size	1076 aa, 124.26 kDa

Single allele phenotype <https://dornsife.usc.edu/pombenet/working-with-pombe/>



USC Dornsife

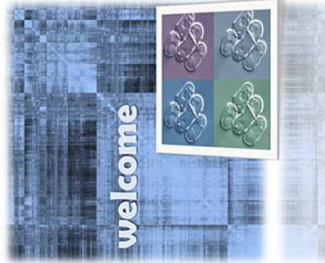
Dana and David Dornsife
College of Letters, Arts and Sciences



bählerlab

Genome Regulation

UCL Home > Research Department of Genetics, Evolution and Environment > Bähler Lab Genome Regulation > Home



- Home
- People
- Research
- Publications
- Resources
- Contact

The Bähler laboratory studies cellular quiescence, ageing and long non-coding RNA function using fission yeast and Turquoise Killfish as model systems. We apply diverse genetic, cellular, and systems-level approaches to analyse the regulation and evolution of genomes, complex ageing-associated processes, and relationships between genotype, phenotype and environment.

We are also associated with the **UCL Cancer Institute**, the **UCL Genetics Institute**, and the **Institute of Structural and Molecular Biology**. Our research is mainly funded by a Wellcome Trust Senior Investigator Award, BBSRC Project grants, and a Cancer Research UK Pioneer Award.

Selected Publications:

Kanrad S, Grossbach J, Rodriguez-Lopez M, Townsend SD, Müllerer N, Cappelletti V, Stojanowski G, Plochl P, Beyer A, Raiser M, Bähler J (2020). Pyruvate kinase variant of fission yeast reprograms energy metabolism triggering systemic changes in cell regulation, growth and stress resistance. *Molecular Systems Biology* 16, e9270

Ellis DA, Mustonen V, Rodriguez-Lopez M, Rallis C, Malecki M, Jeffares DC, Bähler J (2019). Uncovering natural longevity alleles from intercrossed pools of aging fission yeast cells. *Genetics* 210, 733

Ahkinson SR*, Marguerat S*, Bitton DA*, Rodriguez-Lopez M, Rallis C, Lemay J-F, Cotobal C, Malecki M, Mata J, Bachand F, Bähler J (2018). Long noncoding RNA repertoire and targeting by nuclear exosome, cytoplasmic exonuclease, and RNAi in fission yeast. *RNA* 24, 1195

Malecki M, Bitton DA, Rodriguez-Lopez M, Rallis C, Garcia Calavia N, Smith GC, Bähler J (2016). Functional and regulatory profiling of energy metabolism in fission yeast. *Genome Biology* 17, 240

Jeffares DC, Rallis C et al. (2015). The genomic and phenotypic diversity of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature Genetics* 47, 235-241

Marguerat S, Schmidt A, Codlin S, Chen W, Abersold R, Bähler J (2012). Quantitative analysis of fission yeast transcriptomes and proteomes in proliferating and quiescent cells. *Cell* 151, 671-683

Wilhelm BT, Marguerat S, Watt S, Schubert F, Wood V, Goodhead J, Penkett C, Rogers J, Bähler J (2009). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 453, 1239-1243

... 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 kvasili 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*

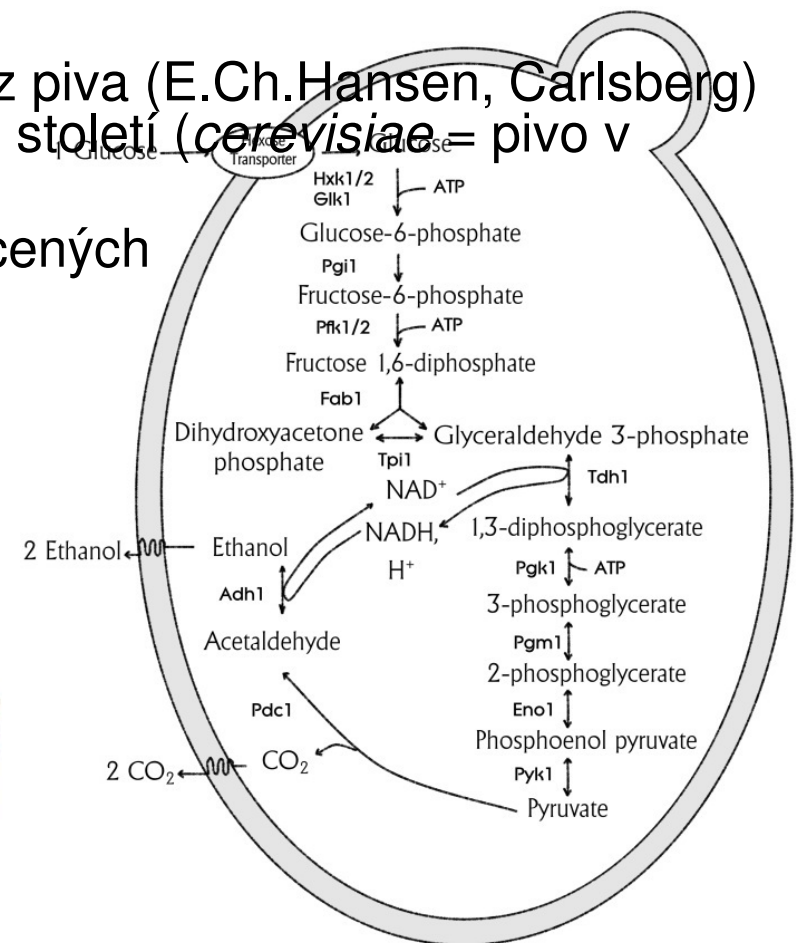
Monerawela a Bond, Biotech Adv, 2017



... trochu (experimentální) historie



- poprvé kvasinky pozoroval A. van Leeuwenhoek v roce 1680 (nepovažoval je za buňky – buňka popsána až později)
- 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

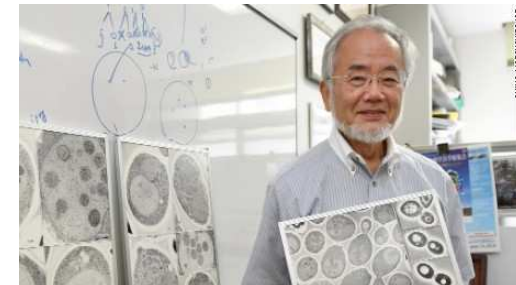


... trochu (vědecké) historie

- 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



Přirozený výskyt

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



- izolovány 2x asco- a 16x basidiomyceta (7x nové druhy) - basidiomyceta lépe adaptovány na chlad než ascomycota
- Psychrotolerantní převažovaly – větší flexibilita nutná k přežití ve fluktuujících teplotách Antarktidy

Conell et al., Microb Ecol, 2008

Ruisi et al., Rev Envir Sci Biotech, 2007

Table 2 Species isolated from Southern Victoria Land soil

Species	Site isolated	Isolate number	GenBank accession	Closest match	Percent match
<i>Clavispora lusitaniae</i> ^a	03YB2				
<i>Cryptococcus nyarrowii</i>	03T21				
	03T23				
	03YB2				
<i>Cryptococcus saitoi</i>	03YB2				
	03DJI				
	03Lab1				
	03Lab2				
	03Lab6				
* <i>Cryptococcus</i> sp 1	03YB1				
<i>Cryptococcus carnescens</i>	03G5				
	03CW1				
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	03Lab8				
<i>Cryptococcus vishniacii</i>	03Lab3				
<i>Debaryomyces hansenii</i> ^a	03Lab1				
	03Lab4				
	03T23				
* <i>Dioszegia</i> sp 1	03CW2				
	03YB1				
* <i>Dioszegia</i> sp	2 03CW2				
* <i>Leucosporidium</i> sp 1	03MD3				
	03T14				
	03T30				
* <i>Leucosporidium</i> sp 2	03MD3				
	03CW1				
* <i>Leucosporidium</i> sp 3	03MD3				
* <i>Leucosporidium</i> sp 4	03MD3				
	03YB2				
<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		

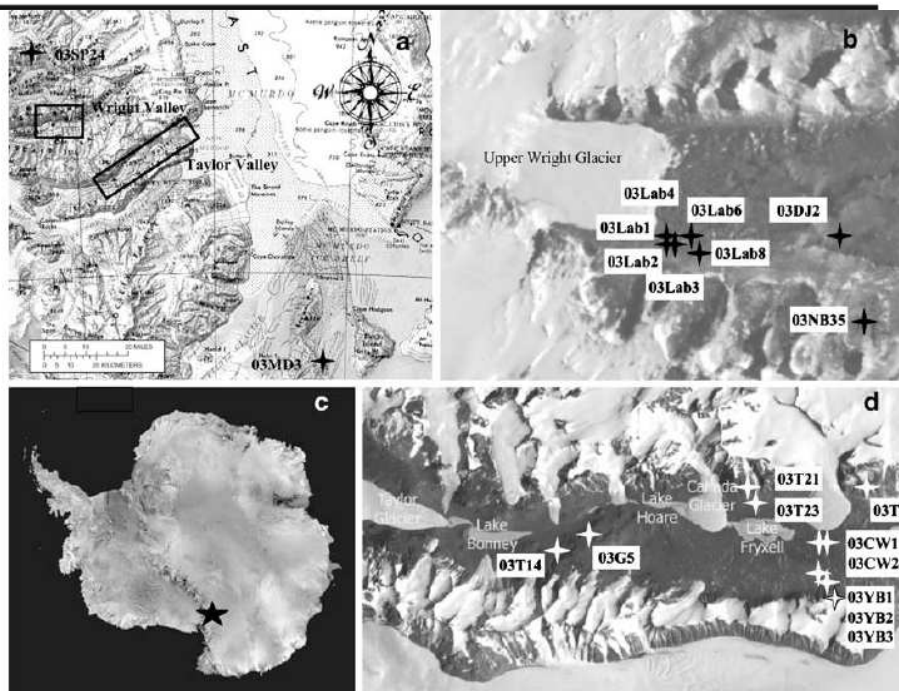


Figure 1 Sample site locations in South Victoria Land, Antarctica (2003–2004). Sites are identified by stars and labels. The entire study area with specific sites 03SP24 and 03MD3 is shown in (a). Sites in Wright Valley are shown in (b) and Taylor Valley in (d). The location of the study area on the Antarctic continent is indicated with a star in (c)

- izolovány 2x asco- a 16x basidiomyceta (7x nové druhy) - basidiomyceta lépe adaptovány na chlad než ascomycota

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

Půda a kvasinky

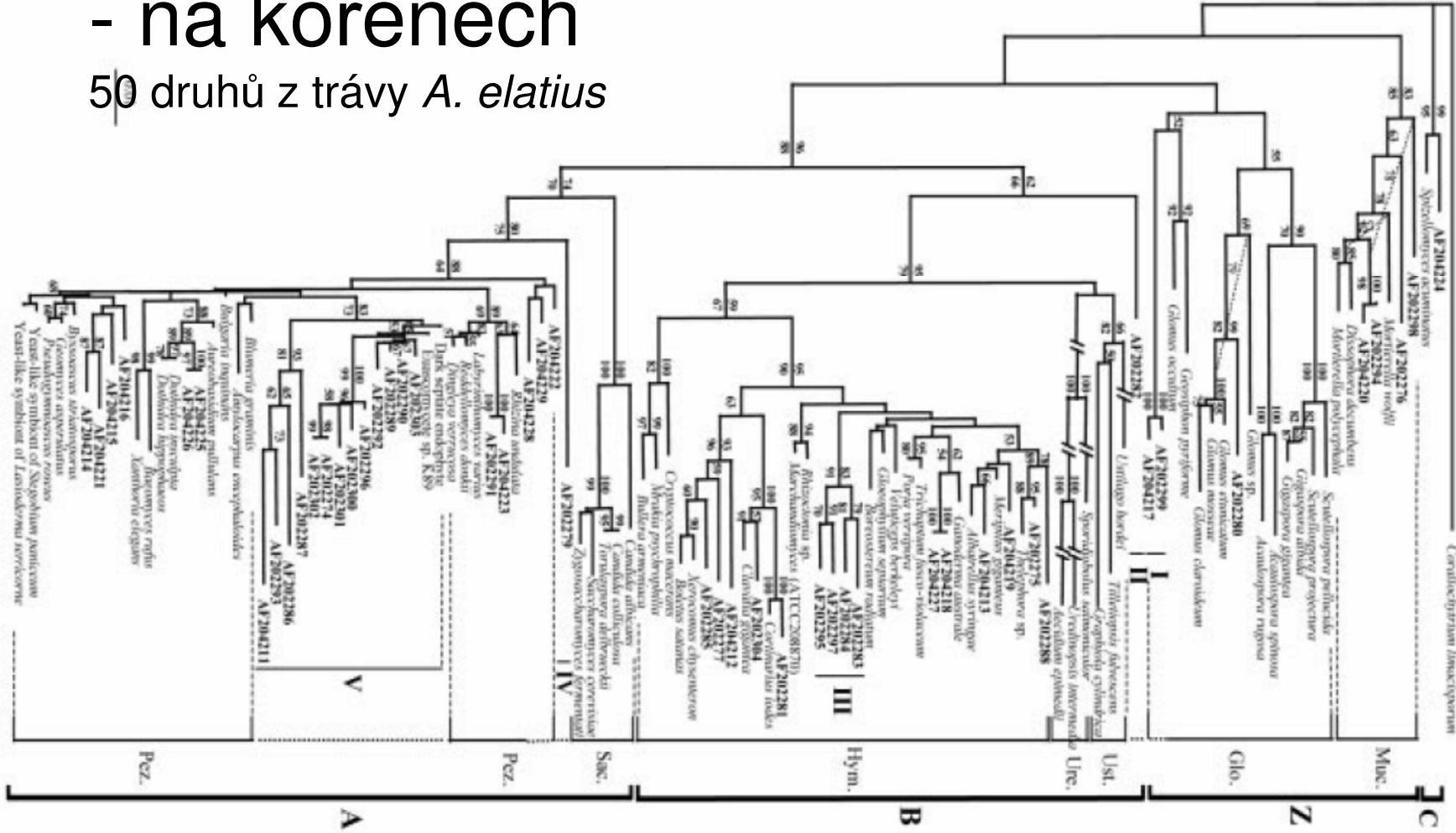
- Typ vegetace → složení půdních mikrobiálních komunit
- Kvasinky jsou kosmopolitní (většinou autochtonní, kromě kmenů výrobních)
- Množství a druhové složení kvasinek v půdách je nerovnoměrné (více v asociaci s rostlinami) – ovlivňuje mnoho faktorů
- Nejsou primárními degradátory těžko rozložitelných 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



Rostliny a kvasinky

- na listech rostlin, květech (nektar palmy Bertramové ... červené kvasinky rodu *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *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 - zahnívající kaktusy => pektolytické bakterie => kvasinky *Pichia cactophila*, *P. opuntiae* => přenos a výživa drosofila)



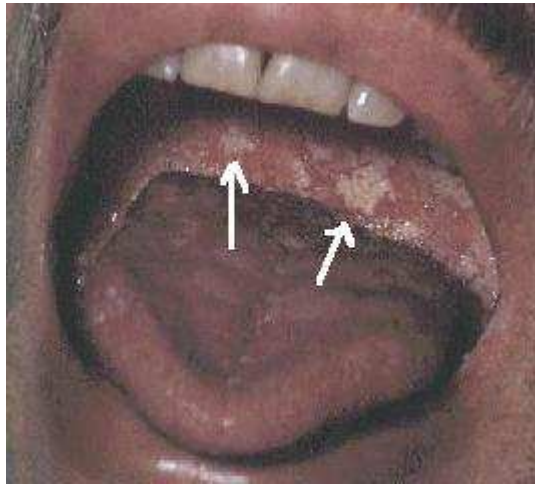
Hmyz a kvasinky

- 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



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

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

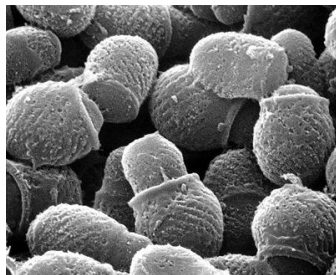
- **Kandidózy** (*C. albicans*, *dublinskiensis*, *krusei*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *glabrata*, *utilis*, *lipolytica*)

- *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)



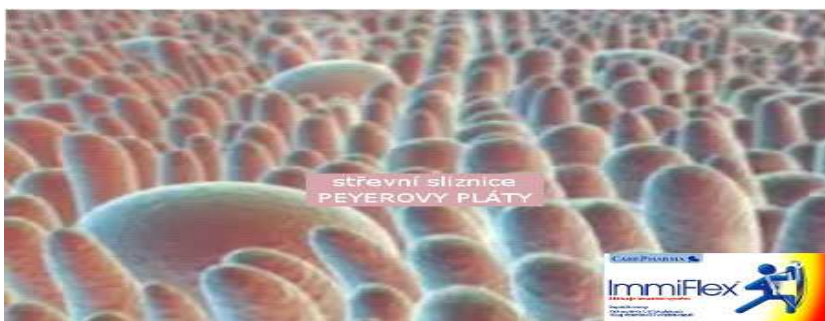
Malassezia furfur
pityriasis versicolor



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*)

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.kudriavzevi*)
- 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)

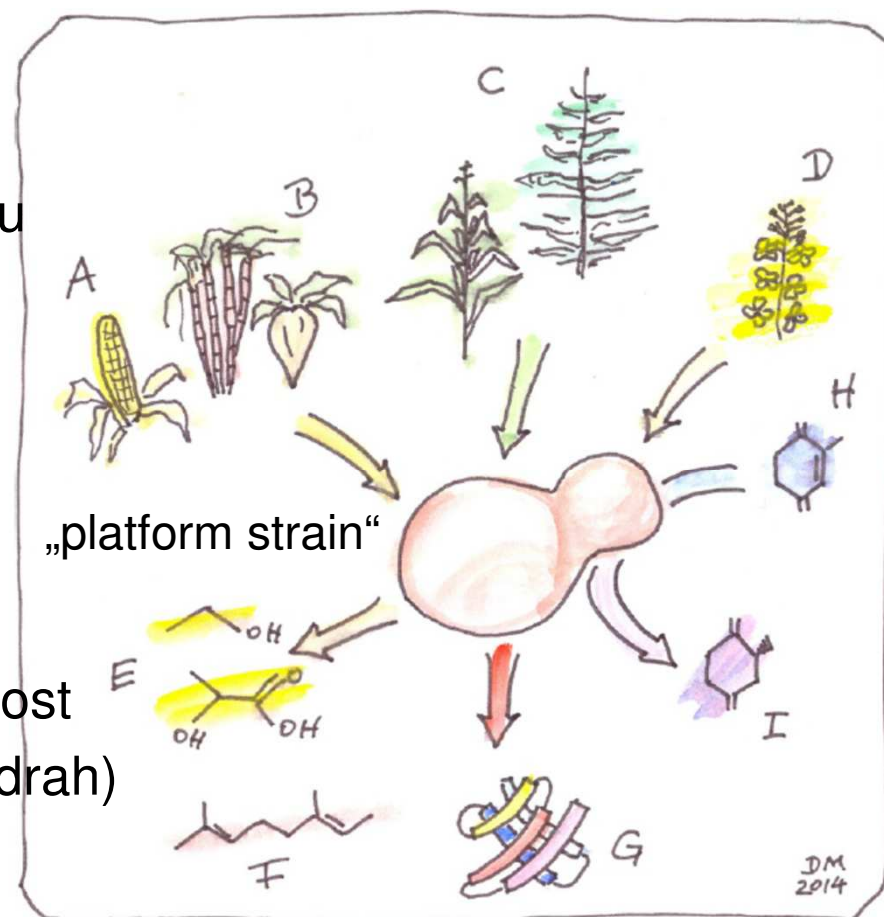
Kov	Biosorpční kapacita (mg kovu/g suché hmotnosti biomasy)
Zn ²⁺	<i>A.nodosum</i> (25.6)> <i>P. chrysogenum</i> > (19.2)> <i>F. vesiculosus</i> (17.3)> aktivovaný kal(9,7)> <i>S. rimosus</i> (6.63)> <i>S. cerevisiae</i> (3.45)
Cu ²⁺	<i>S. rimosus</i> (9.07)> <i>P. chrysogenum</i> (8.62)> <i>F. vesiculosus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

- kvasinky byly po tisíciletí mikroorganismem mnoha „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

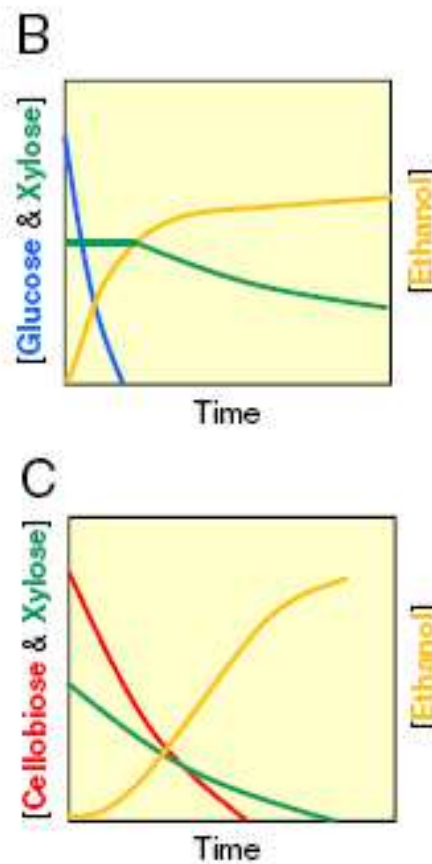
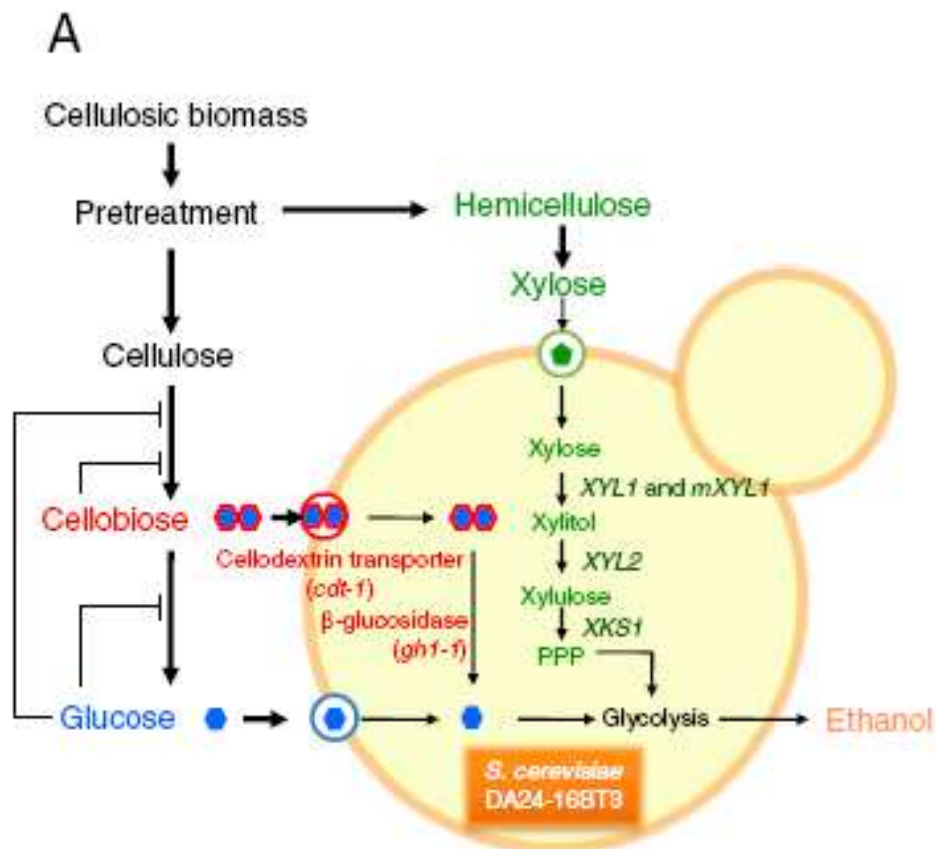
- butanol (lepší než etanol), kyselina mléčná, isoprenoidy (Artemisinin – antimalarikum)

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



Využití *S. cerevisiae* pro výrobu biopaliv

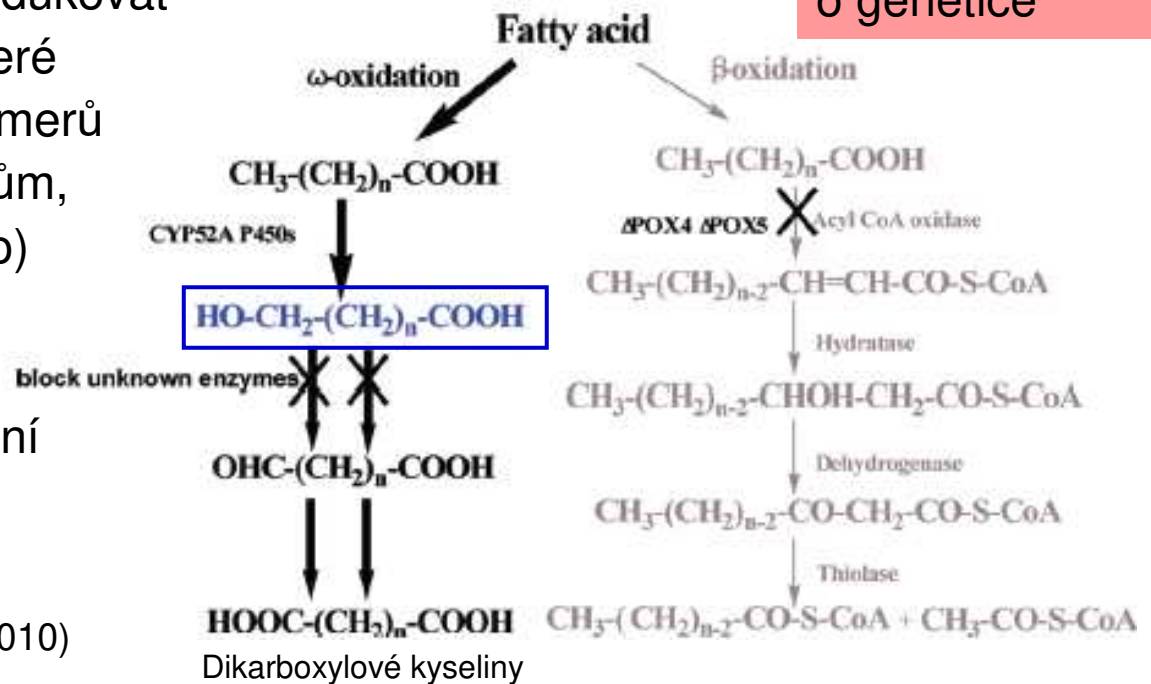
- Nemají přirozenou metabolickou dráhu pro odbourání celobiosy a xylozy
- Vloženy geny *XYL1* and *XYL2* kódující xylózovou reduktázu (XR) a xylitolovou dehydrogenázu (XDH) z kvasinky *Pichia stipitis*
- Přednostní využívání glukózy (*glukózová represe v dalších přednáškách*)
- Transport celobiosy do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



Příprava monomerů pro výrobu plastů – využití *Candida tropicalis*

- *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- mutantní kmen (P450: Δ POX4 ...) není schopen β -oxidace a přeměňuje je oxidací na di-karboxylové kyseliny (Picataggio et al, Biotechnology, 1992)
- další mutagenézí (pomocí flp rekombinasy – viz genetika) odstranili geny dalších oxidás (alkohol oxidázy) a dehydrogenás (alkohol dehydrogenás) aby eliminovali ω -oxidaci
- nový kmen je schopen produkovat ω -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenům, bio-odbouratelné na bio-palivo)
- další modifikace kmene (integrace genů pro lipázy) by umožnilo přímé odbourávání odpadních olejů ...

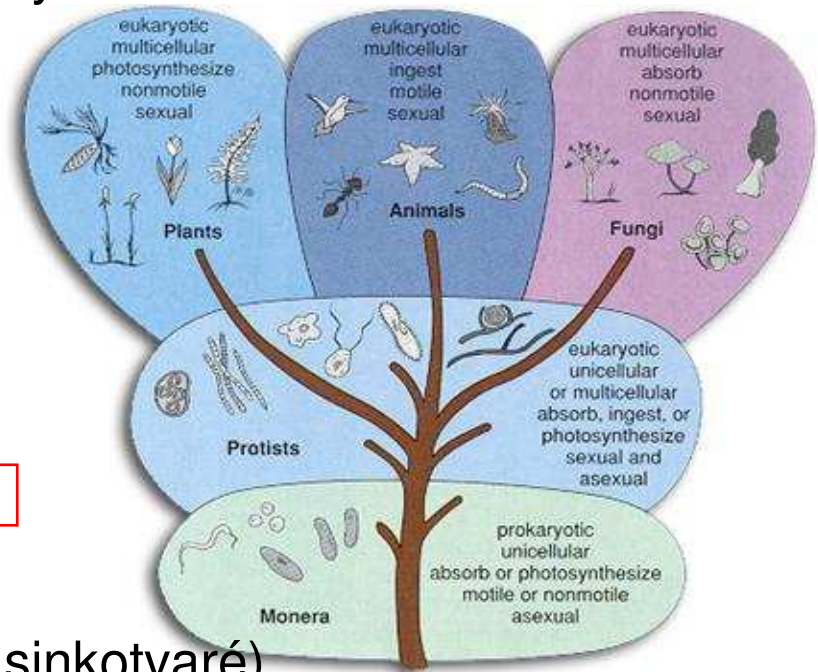
Přednáška
o genetice



Lu et al., JACS (2010)

Taxonomie kvasinek

- Kvasinky se řadí do domény (nadříše) [Eukaryota](#), říše [hub](#) (ačkoliv jsou to **mikroskopické jednobuněčné organizmy**)
- netvoří žádnou přirozenou taxonomickou skupinu (nemožné je jednotně definovat)
- roztroušeny ve dvou odděleních hub: houby [vřeckovýtrusé](#) nebo [stopkovýtrusé](#) (asko-, basidio- a deuteromycetes + kvasinkové mikroorganismy)
- 1500 identifikovaných (odhad o několik řádů vyšší)



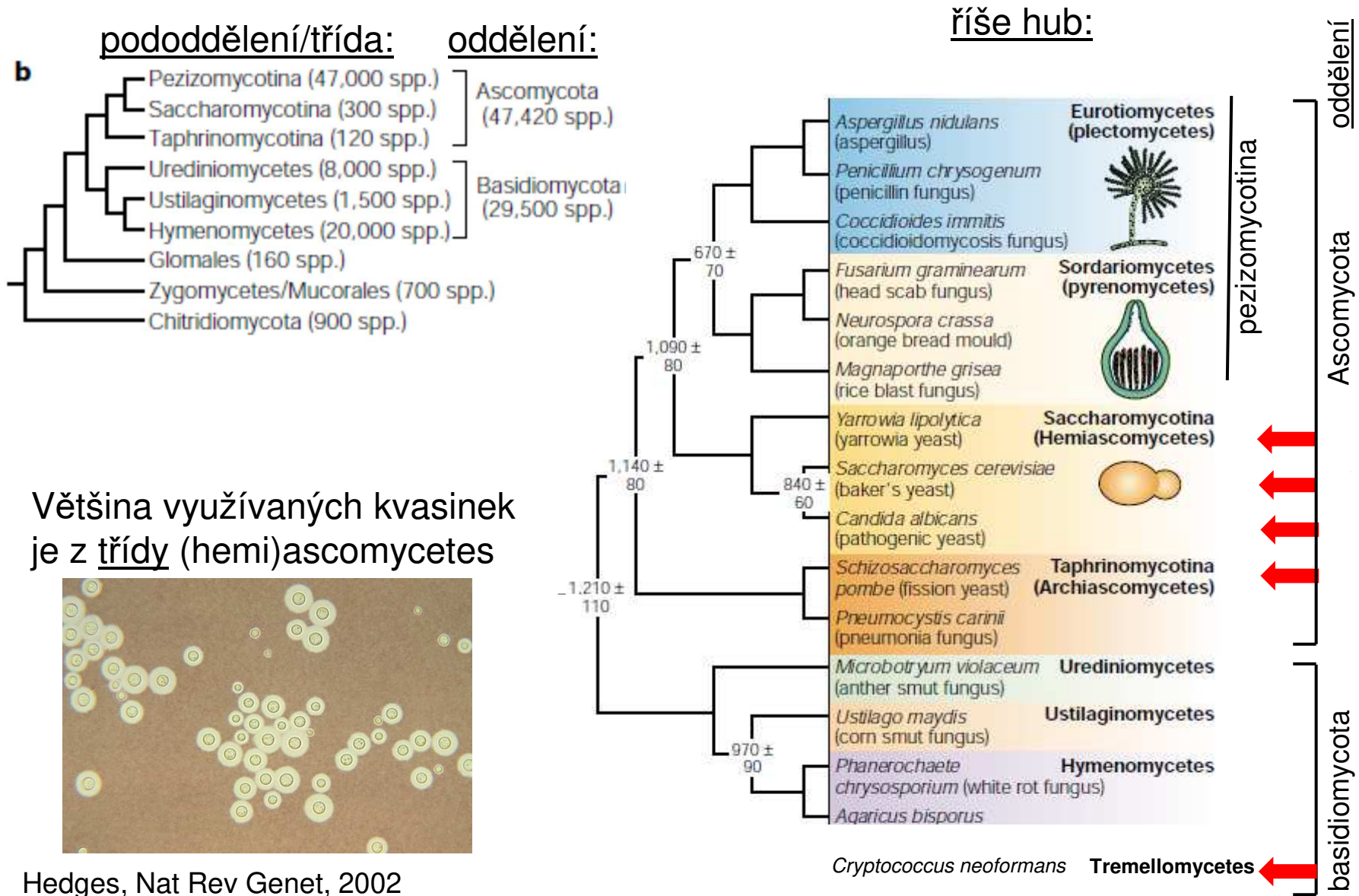
Saccharomyces cerevisiae:

- nadříše > [Eukaryota](#)
- říše > [Fungi](#) (houby)
- oddělení** > [Ascomycota](#) (vřeckovýtrusé)
- pododdělení > [Ascomycotina](#)
- třída > (hemi) [Ascomycetes](#)
- řád > [Saccharomycetales](#) (kvasinkotvaré)
- čeleď > [Saccharomycetaceae](#)
- rod > [Saccharomyces](#)
- druh > [Saccharomyces cerevisiae](#)
- („laboratorní kmen“)

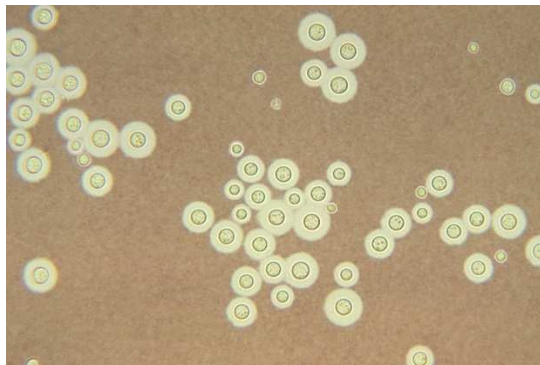
wikipedie

Hedges, Nat Rev Genet, 2002

Kvasinky netvoří žádnou přirozenou taxonomickou skupinu - jsou roztroušeny ve dvou odděleních hub, buď jako houby vřeckovýtrusné nebo stopkovýtrusné



Většina využívaných kvasinek je z třídy (hemi)ascomycetes



Hedges, Nat Rev Genet, 2002

Potřebují vodné prostředí

volná voda (nikoli chemicky vázaná) - Vodní aktivita = volně přístupná voda/fyziologicky využitelná voda = available water (a_w)

a_w = poměr tlaku vodních par nad substrátem a tlaku par destilované vody

- 0,95: *Pseudomonas*, *Escherichia*,..., většina bakterií
- 0,85: kvasinky (*Candida*, *Torulopsis*, *Hansenula*)
- 0,75: většina halofilních mikroorganismů
- 0,65: xerofilní plísně (*Aspergillus*)
- 0,4: potlačení růstu veškeré mikroflóry



Bakterie vyžadují vyšší hodnoty a_w (více dostupné vody) než kvasinky a plísně (z toho důvodu např. chléb napadají plísně, nikoliv bakterie)

Aktivitu vody lze snížit proslazováním nebo solením (marmelády, nasolování masa - lze takto potlačovat i bakteriální kontaminace v kvasinkových kulturách)

Xerotolerantní kvasinky rostou i za zvýšeného osmotického tlaku – ($a_w=0.65$), rod *Zygosaccharomyces* (*rouxii*, *bailii*, *bisporus*) – rostou přednostně v potravinách s vysokým obsahem cukru či solí; ostatní (*S. pombe*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula anomala*) vyšší osmotický tlak tolerují, ale lépe rostou za standardních podmínek (více polyolů, ATPázové pumpy),

Lipomyces mají pouzdro – při zvýšené koncentraci solí upravují jeho složení

Test: schopnost růstu na 50-70% glukose (většina pouze do 40 %) nebo na 10% NaCl

Živiny

- Nejčastějším zdrojem uhlíku a energie jsou mono-, di- a oligosacharidy (některé jsou schopny hydrolyzovat i polysacharidy jako škrob, xylany či celulozu ... nebo methanol (*Pichia pastoris*), alkany (*Y. lipolytica*) apod.
- Nejpreferovanějším cukrem *S.c.* je glukóza (**represe ostatních**)
- Zdrojem dusíku jsou amonné ionty a aminokyseliny

Laboratorní podmínky:

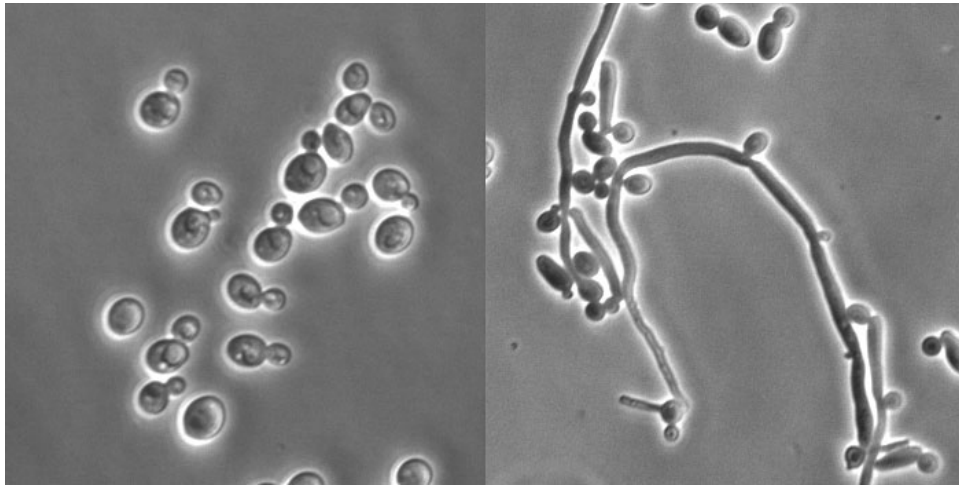
YPD/YES – bohaté médium = 10g/l yeast extract, 20g/l pepton, 20g/l dextrose (2%glukosa)/ *S. pombe* supplements: A, U, H, L, K

Sabouraudův agar (1892) = 10g/l pepton, 40g/l dextrose (4%glukosa), 20g/l agar, pH 5.6

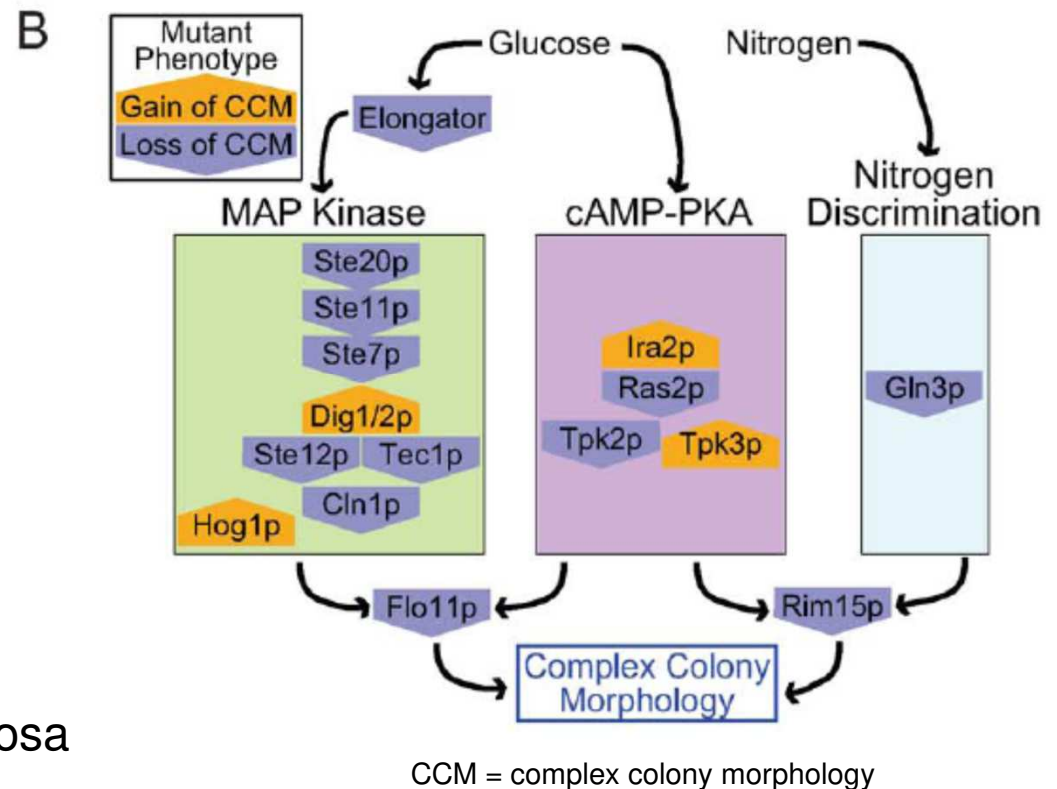
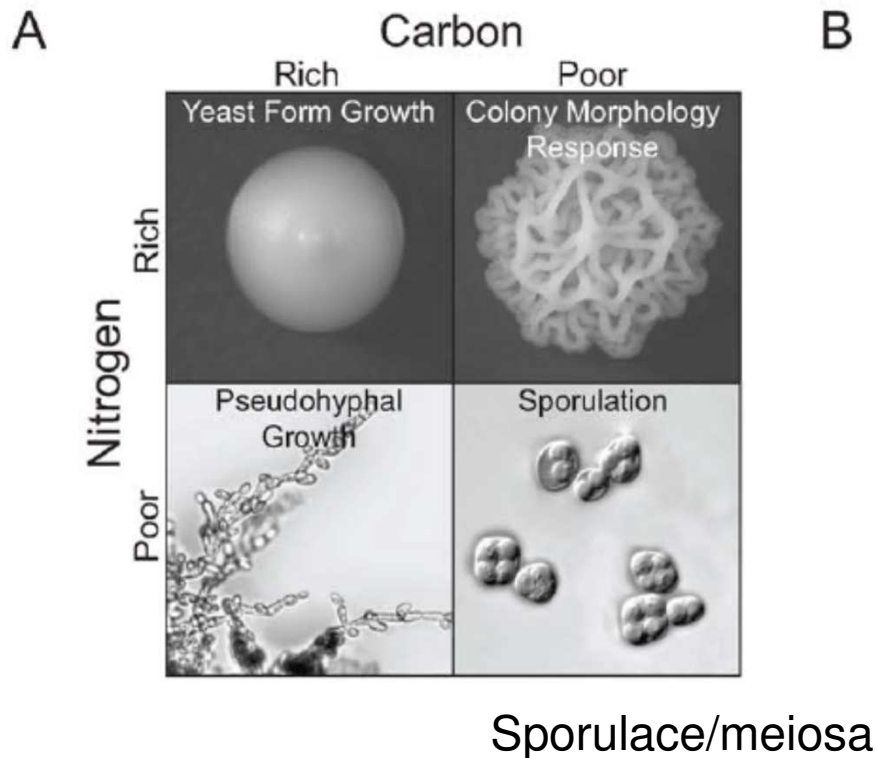
Syntetické SD médium = 6.7g/l yeast nitrogen base w/o amino acids (aminokyseliny se přidávají dle potřeby), 20g/l dextrose (2% glukosa) – např. SD-L,T pro Y2H systém

Minimální agarová půda = 5g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g/l KHSO_4 , 0,5g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10g/l glukosa, 1ml/l Wickerhamův roztok, 20g/l agar

Wickerhamův roztok: 0.2mg biotin, 200mg inositol, 20mg riboflavin, 40mg thiamin, 40mg pyridoxin, 20mg kyselina p-aminobenzoová, 40mg kyselina nikotinová, 0,2mg kyselina listová (na 100ml vody)



- Živiny ovlivňují morfologii/ buněčnou formu – kvasinková nebo houbová (pseudohyfy) nebo sporulace ...
- limitování klíčových živin spouští různé vývojové odpovědi
- zdroje uhlíku a dusíku jsou monitorovány signálními drahami



Kvasinková forma - morfologie

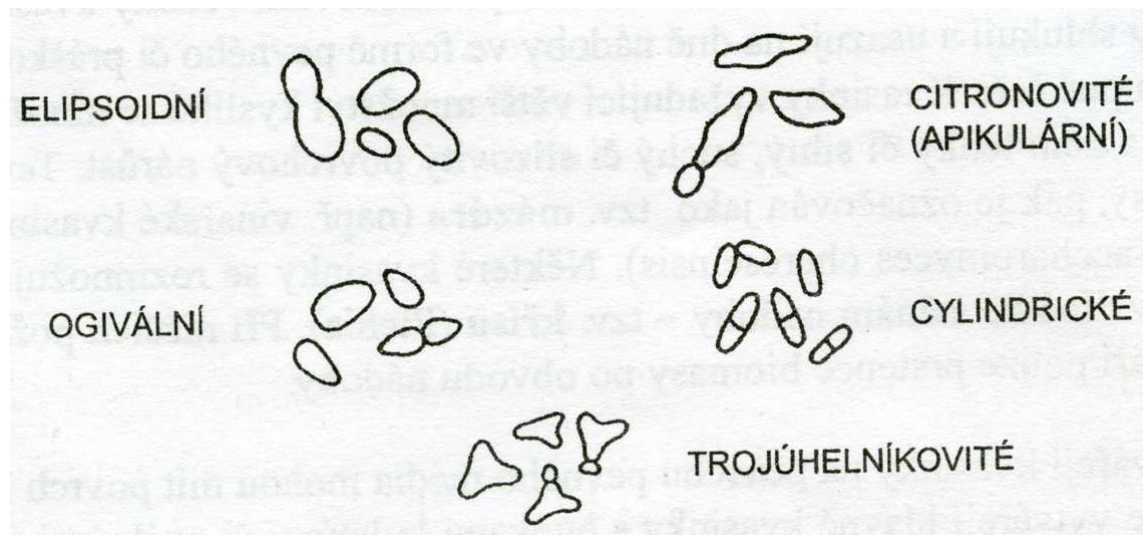
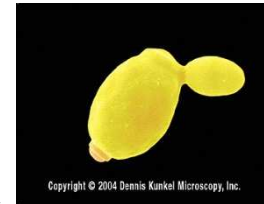
- za běžných podmínek (bohaté C i N zdroje) převládá kvasinková f.
- rotační elipsoid, kulaté, protáhlé – rod *Dipodascus* až 130 mikrometrů
- 3-15 mikrometrů (bakterie < kvasinky < savčí buňky)
- u jednoho druhu (haploidní < diploidní < polyploidní)

<https://vimeo.com/14316828>



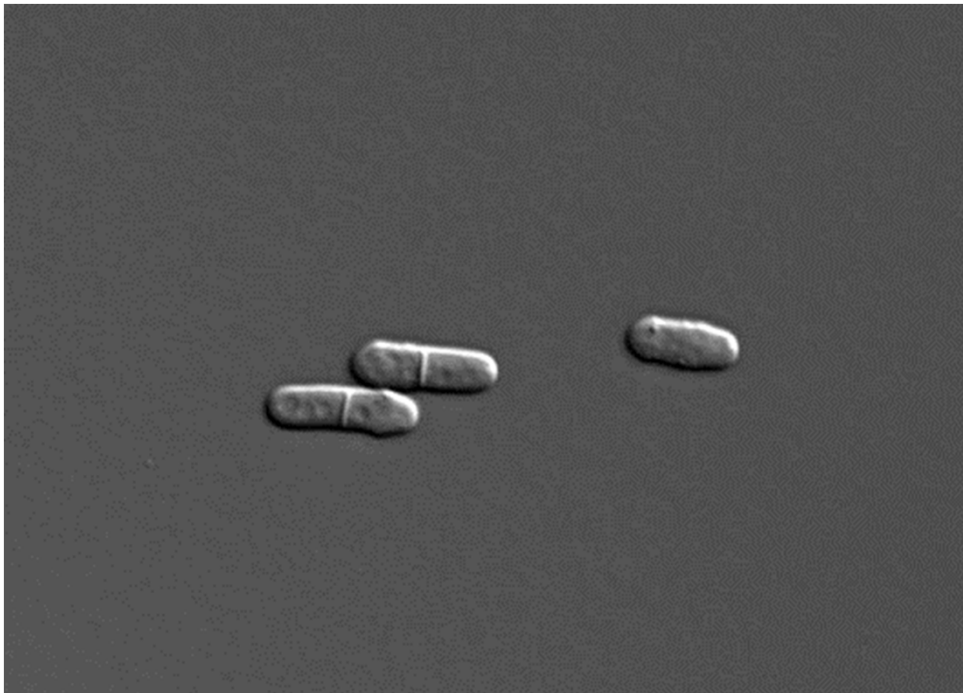
Kvasinková forma - morfologie

- za běžných podmínek (bohaté C i N zdroje) převládá kvasinková f.
- rotační elipsoid, kulaté, protáhlé – rod *Dipodascus* až 130 mikrometrů
- 3-15 mikrometrů (bakterie < kvasinky < savčí buňky)
- u jednoho druhu (haploidní < diploidní < polyploidní)
- vegetativní rozmnožování:
 - pučení – monopolární (rod *Malassezia*), bipolární (střídavě na obou pólech = citronkovitý tvar) nebo multipolární (*Saccharomyces*, kdekoli, ale nikdy ne na stejném místě), na sterigmě (pupen spojen s mateřskou buňkou úzkou stopkou), zvláštní tvar má za některých kultivačních podmínek rod *Trigonopsis* (trojúhelníkovité)
 - *Schizosaccharomces* přehrádečné dělení (cylindrické)



Kvasinková forma - morfologie

- *Schizosaccharomycetes* přehrádečné dělení



haploid



diploid

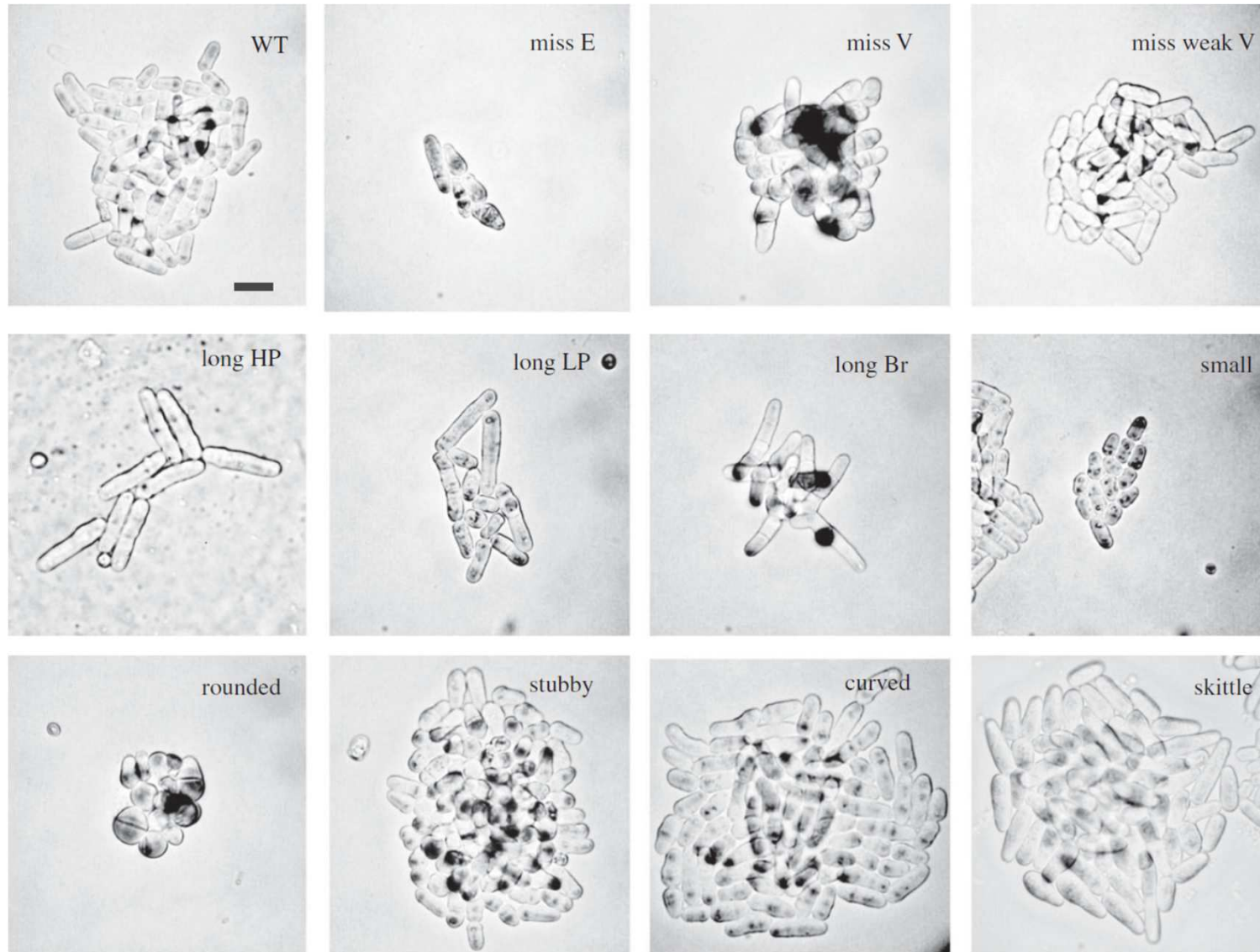
haploidní < diploidní < ...

Hoffmann a spol, Genetics, 2015

<http://www.genetics.org/content/suppl/2015/10/02/201.2.403.DC1>

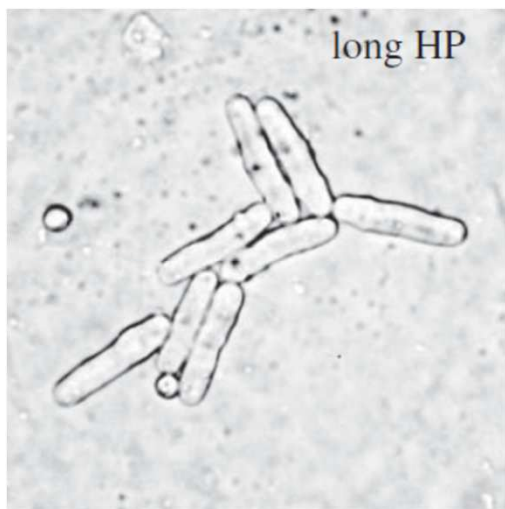
Kvasinková forma - morfologie

vizualní analýza kvasinek - deleční knihovny ~3500 kmenů (genome-wide)

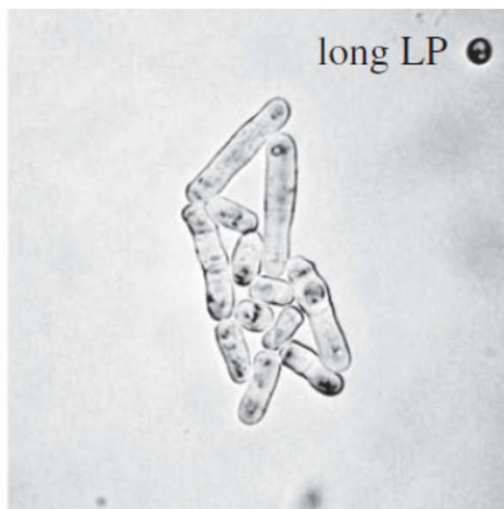


Kvasinková forma - morfologie

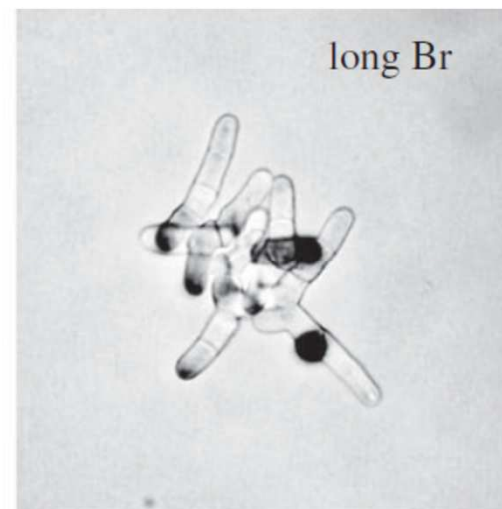
visuální analýza kvasinek deleční knihovny ~3500 kmenů (1. genome-wide)
- např. delece genů regulujících buněčný cyklus *S. pombe* způsobovaly protažený tvar buněk (buňky pokračovaly v růstu, přestože byl buněčný cyklus/mitoza defektní – v důsledku delece genu x)



replikace & transkripce
(spliceing, MCM,
biogenese nukleotidů)



segregace chromosomů
(kinetochora, kondensin,
SMC5/6, APC, biogenese
ribosomů)



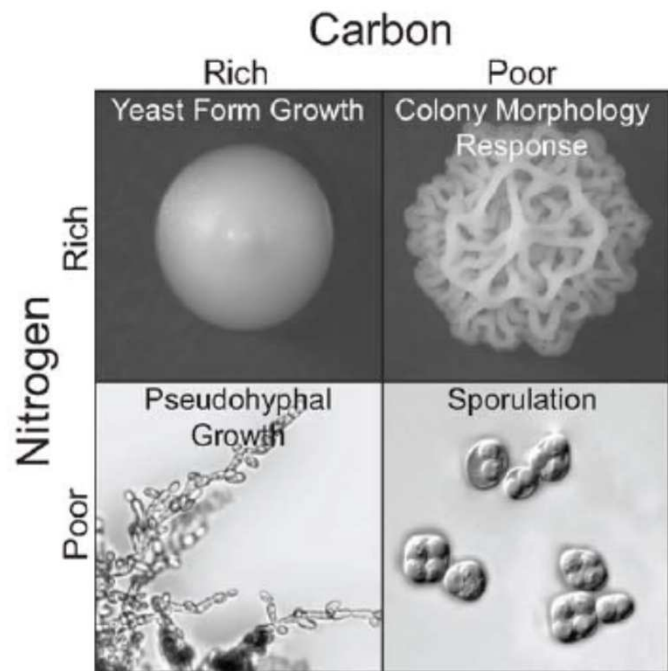
cytokinese & transkripce
(RNA pol, mediator, SAGA)

HP = high penetrance (>30% buněk v populaci)

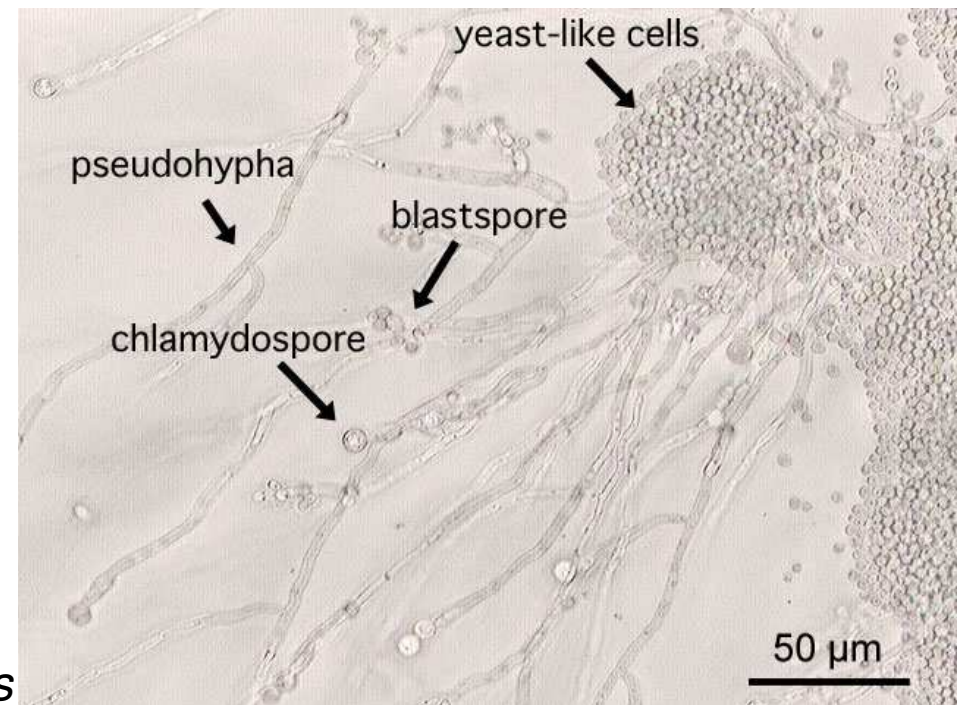
LP = low penetrance (<30% buněk v populaci)

Pseudohyfy ...

- při nedostatku dusíku se diploidní buňky protahují a vytváří **pseudohyfy/hyfy** – vrůstají do agaru
- unipolární pučení, mateřské a dceřiné buňky zůstávají spojené (úplná přepážka, neoddělí se dceřiné buňky x pravé hyfy mají přepážky průtočné)
- **chlamydo-spory** – kulaté, silnostěnné, na koncích nebo po stranách hyf – spory nevykazují tak vysokou odolnost jako u bakterií
- na koncích (i mezi buňkami) mohou vznikat **spory** (blastospory), které se dále množí pučením (odlišení *C. albicans* od *C. dubliniensis*)



Candida albicans



Spory

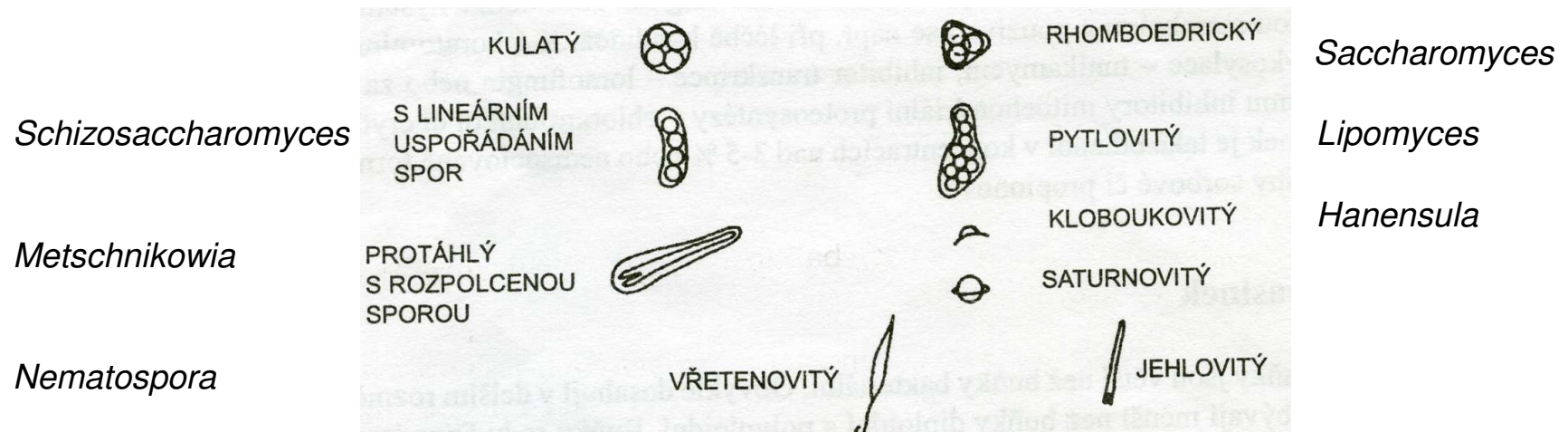
- při nedostatku dusíku v kombinaci s ne-fermentovatelným uhlíkatým zdrojem dochází k indukci meiosis a sporulace

C. dubliniensis:
nadbytek
chlamydospor na
koncích krátkých
pseudohyf



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

- haploidní spory vřekovýtusých kvasinek vzniklé při sporulaci diploidních buněk (pohlavní rozmnožování)



Sporulace

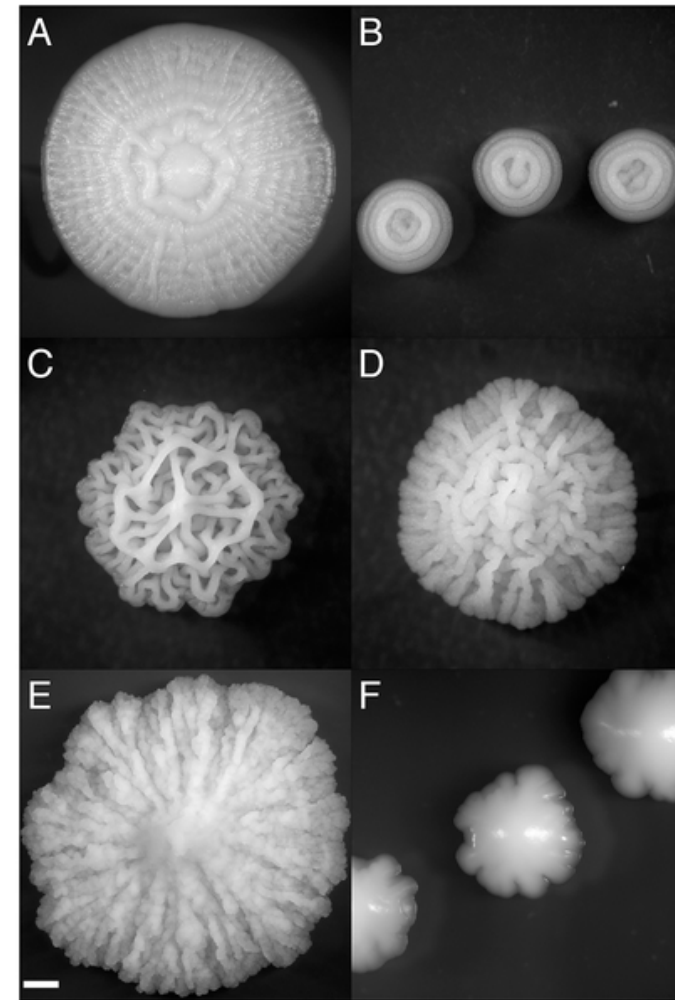
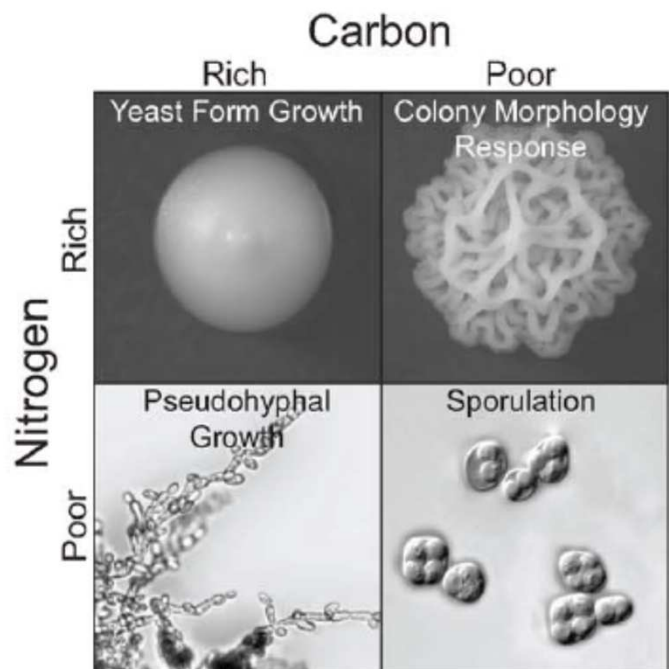
- při nedostatku dusíku v kombinaci s ne-fermentovatelným uhlíkatým zdrojem dochází k indukci meiosis a sporulace

<http://www.genetics.org/content/suppl/2015/10/02/201.2.403.DC1>



Kolonie

- různé tvary kolonií:
 - hladké i „fluffy“ kolonie – kulaté i oválné buňky (*S.c.*) – není určující faktor
 - drsné kolonie – protáhlé buňky (*Pichia*)
 - slizovité kolonie – pouzdra (*Lipomyces*)
- obvykle krémová barva –
- červený pigment (*Rhodotorula*, *Sporidiobolus*)
- černý pigment (melanin – *Aureobasidium*)

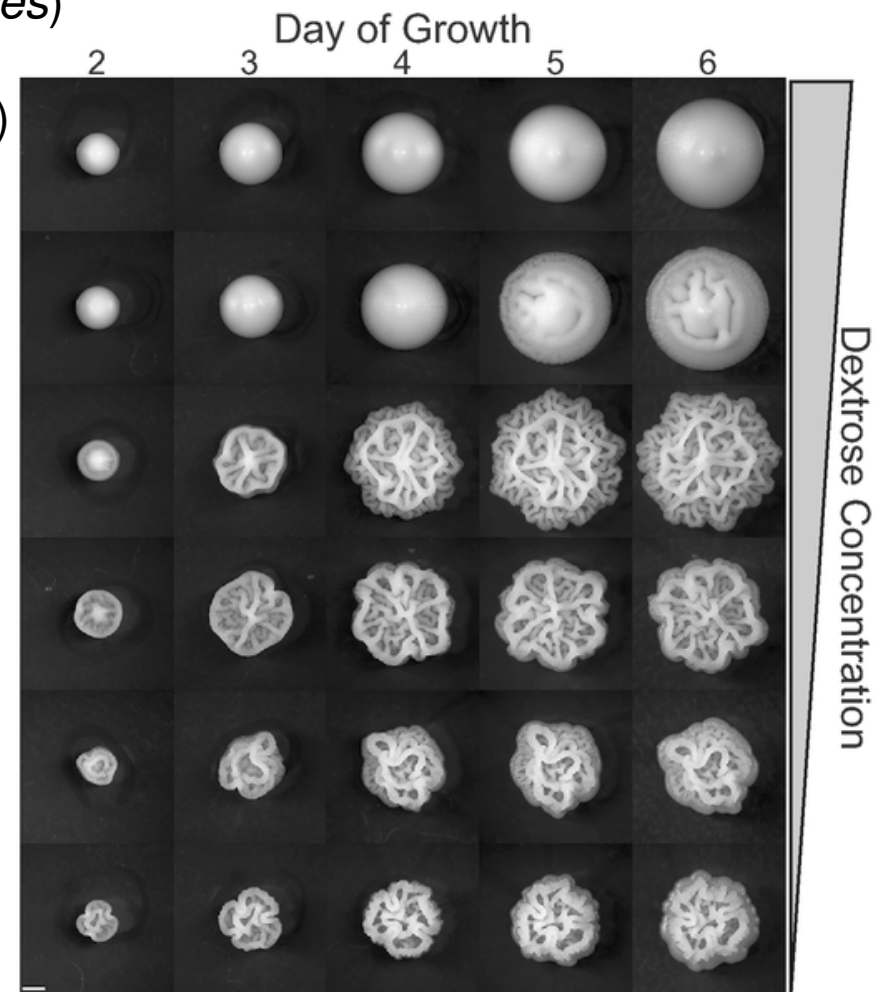
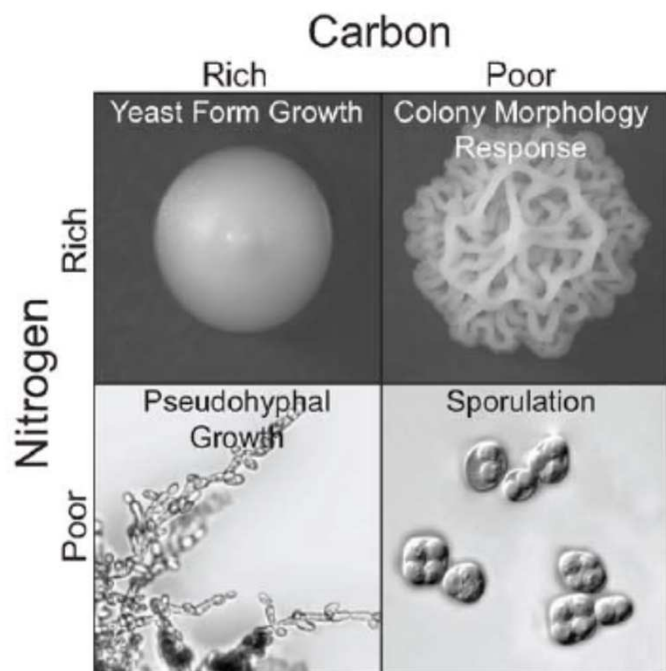


cvičení

Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

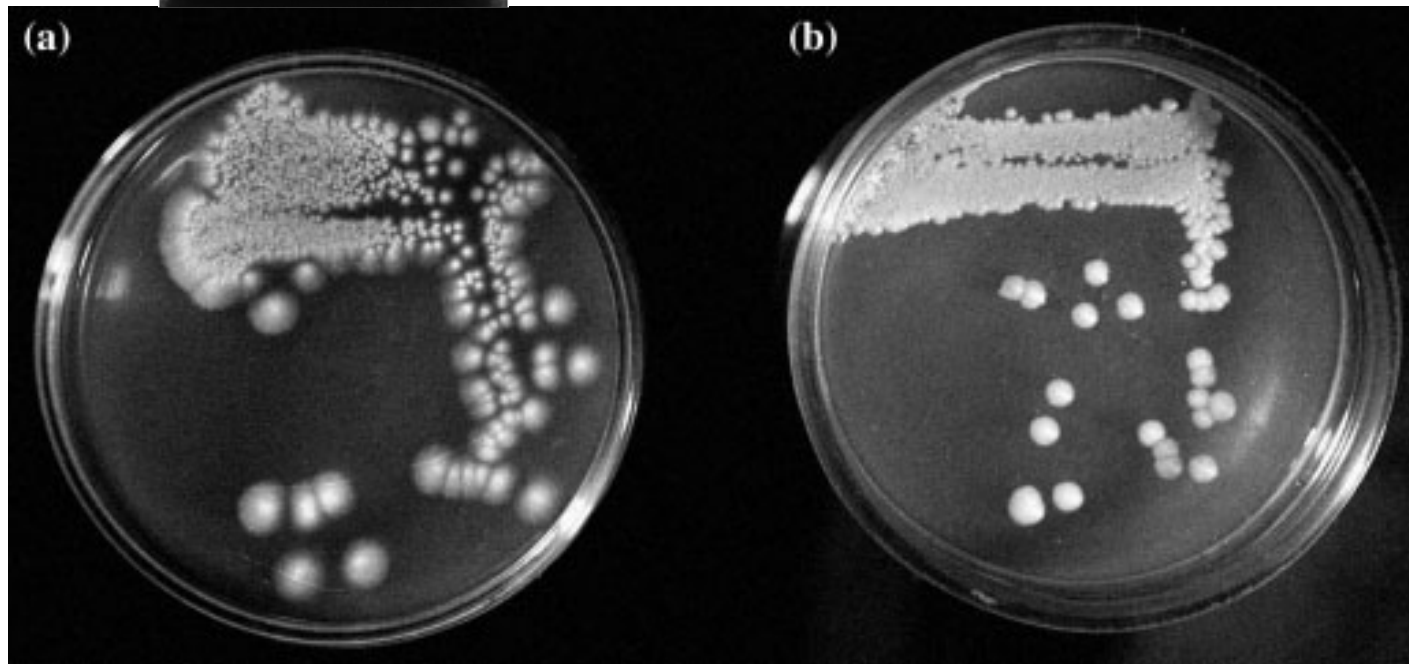
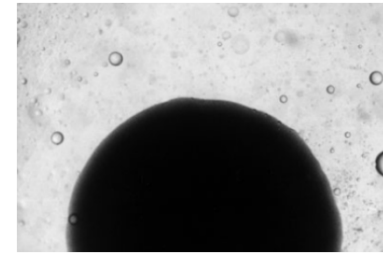
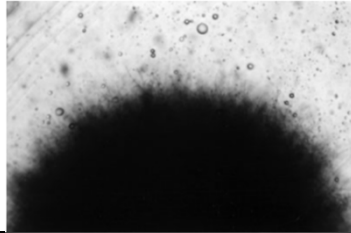
Kolonie

- různé tvary kolonií:
 - hladké i „fluffy“ kolonie – kulaté i oválné buňky (*S.c.*) – není určující faktor
 - drsné kolonie – protáhlé buňky (*Pichia*)
 - slizovité kolonie – pouzdra (*Lipomyces*)
 - obvykle krémová barva –
 - červený pigment (*Rhodotorula*, *Sporidiobolus*)
 - černý pigment (melanin – *Aureobasidium*)
- vliv živin na morfologii kolonie



Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

Morfologie kolonie - Candida



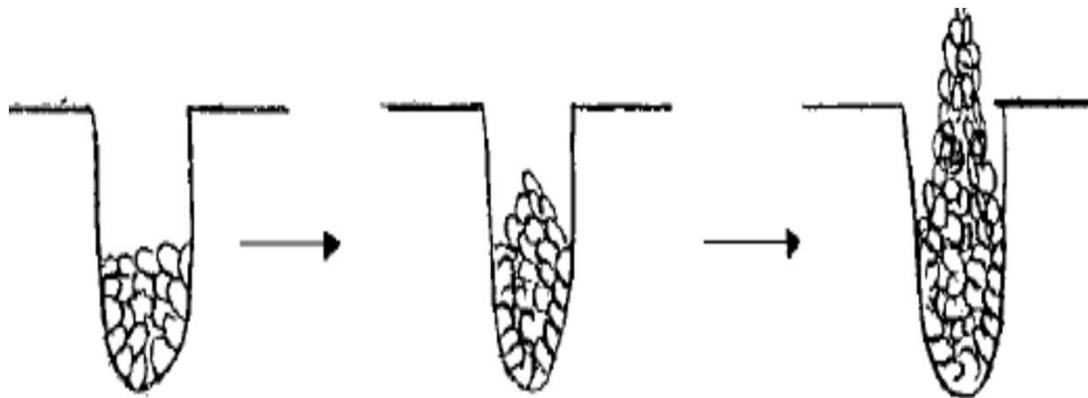
Např. odlišení *C.d.* od *C.a.*: 24h kultivace na Staibově agaru při teplotě 37°C

(a) *C. dubliniensis*

(b) *C. albicans*

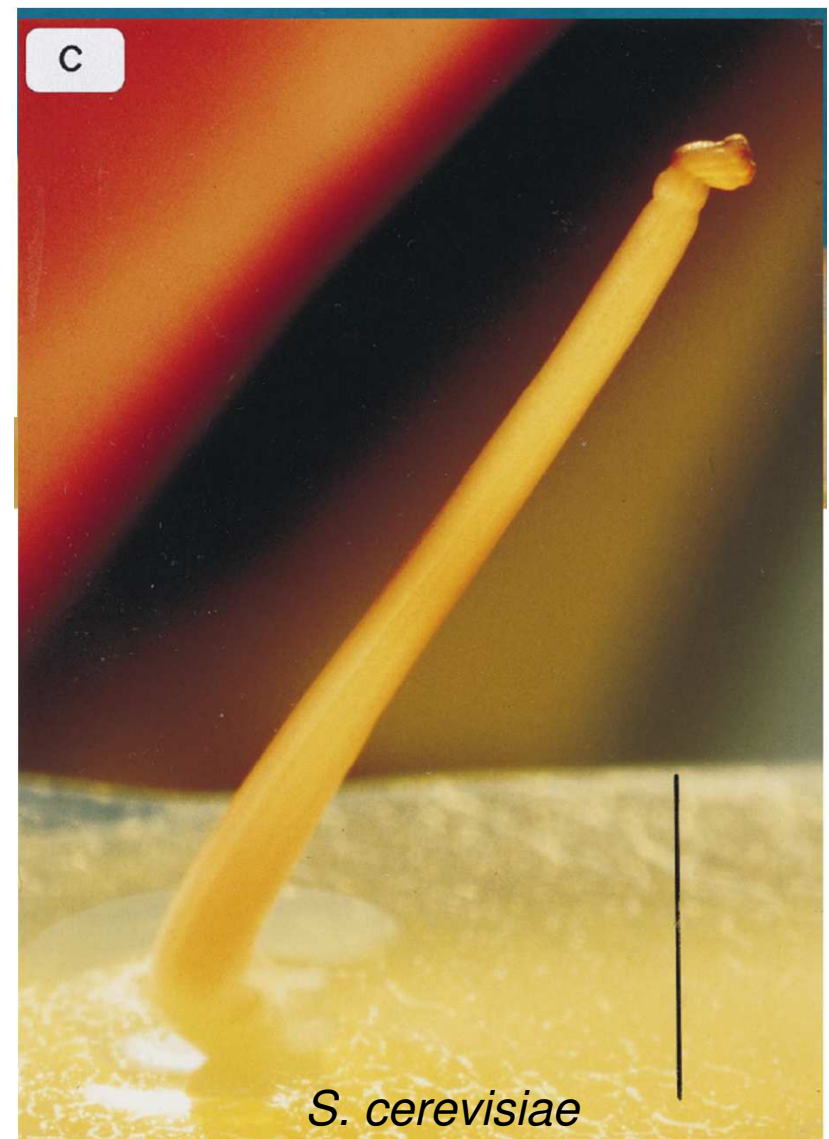
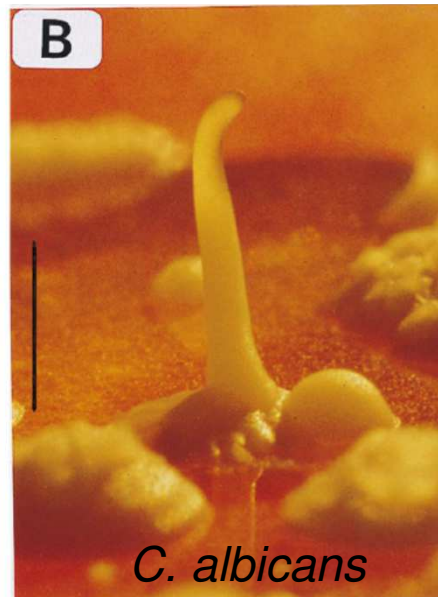
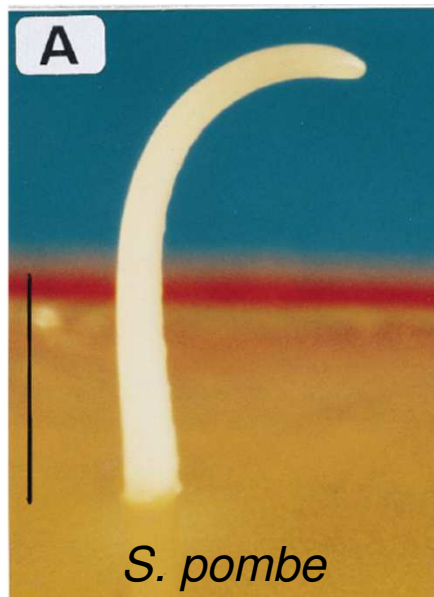
- využívá se např. pro odlišení *C.d.* od *C.a.* (kultivace na Staibově agaru při teplotě 37°C)

- tvrdý agar (4%, + suchá plotna) a UV záření indukuje „**stopkování**“ (složená z kvasinkových nikoli pseudohyfálních buněk) – zvyšuje šanci na diseminaci

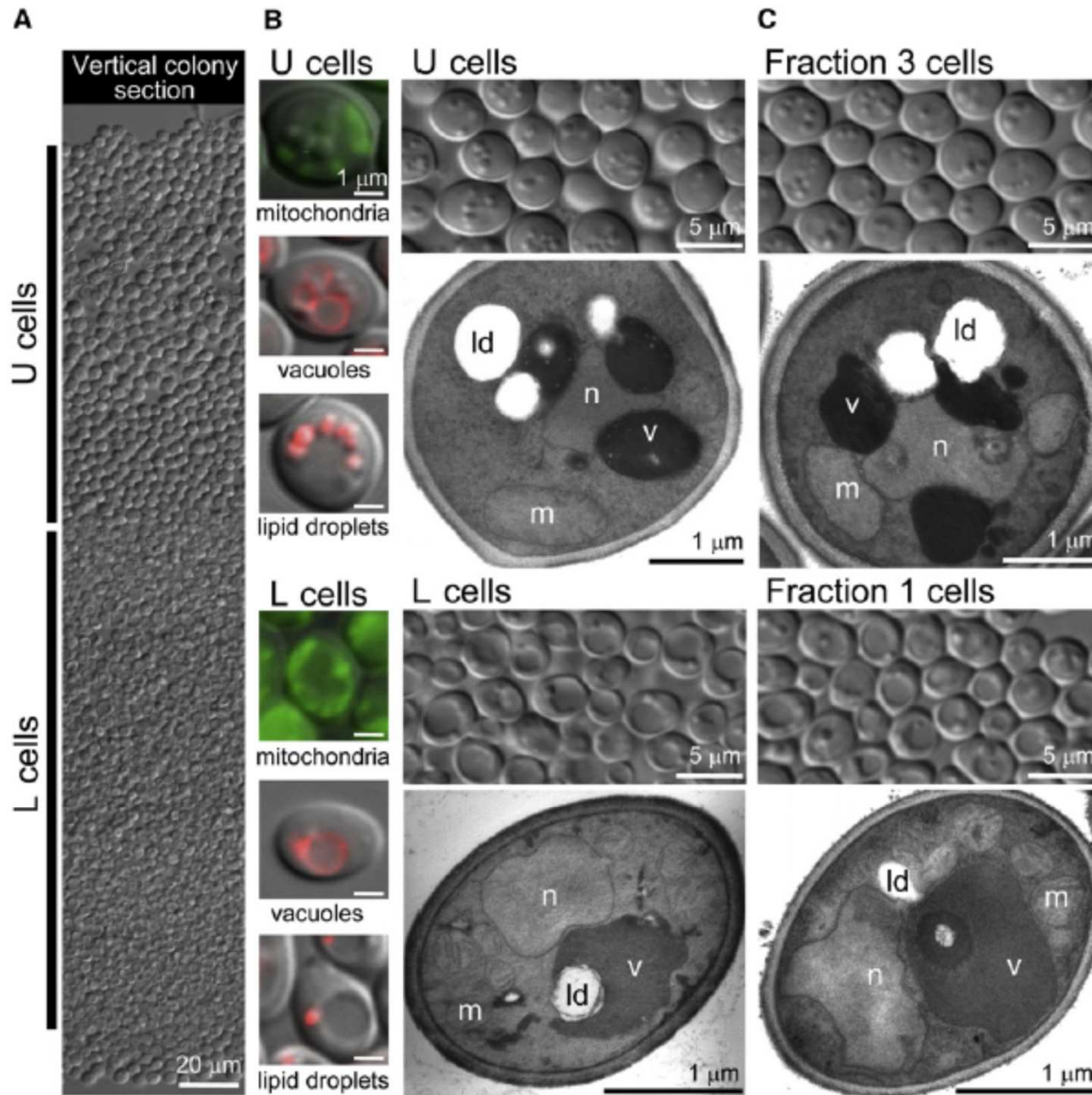


- buňky v jamkách jsou chráněny před UV, zatímco ty na povrchu jsou zabity

Engelberg a spol., J Bacter, 1998



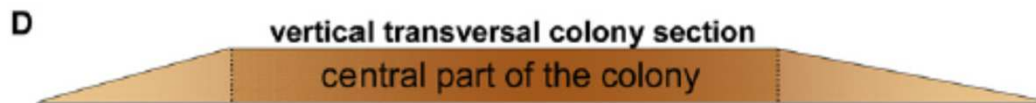
kolonie



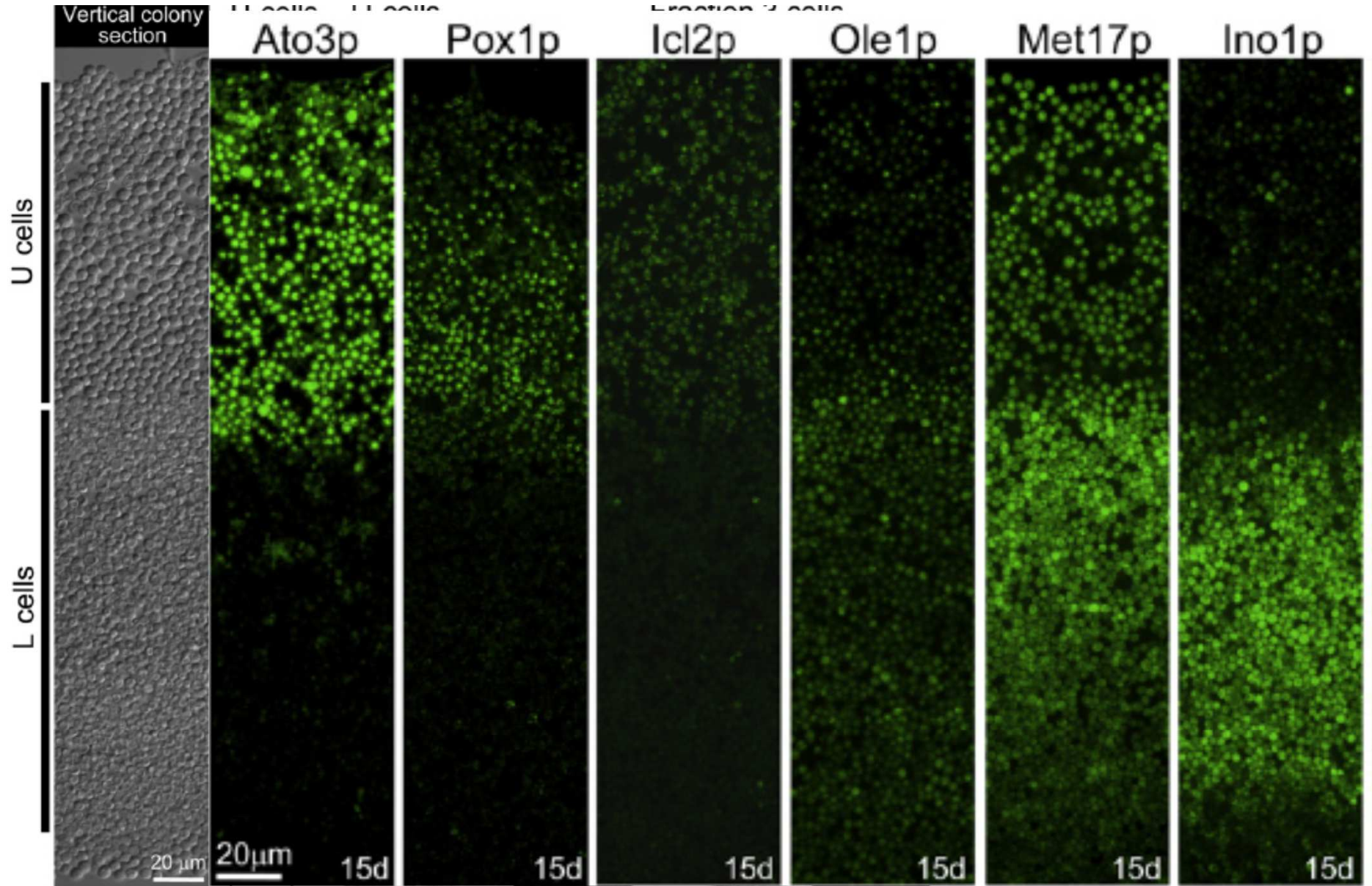
- větší buňky (4 μm)
- malé mitochondrie a vakuoly
- více lipidových váčků

rozdíly jsou patrné i na expresní úrovni proteinů

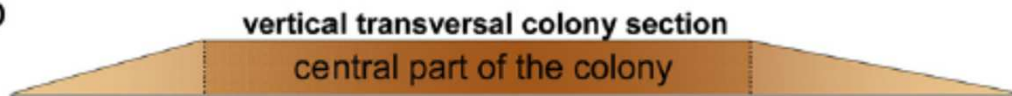
- menší buňky (3 μm)
- velké mitochondrie i vakuoly (aktivnější respirace a více ROS)



rozdíly jsou patrné i na expresní úrovni proteinů



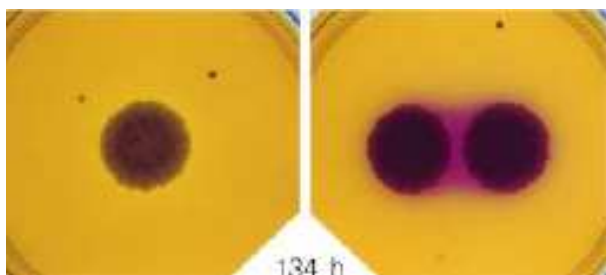
D



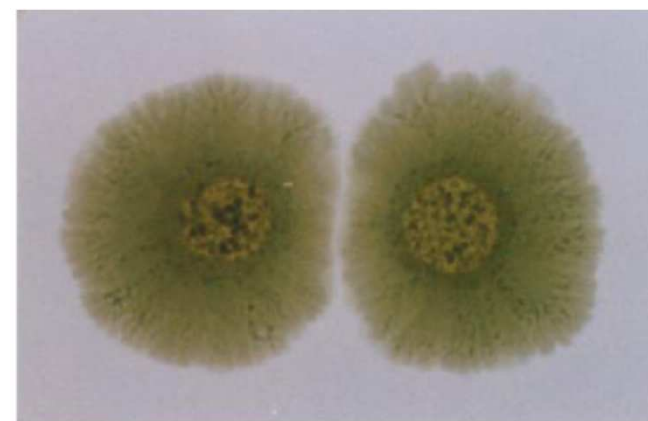
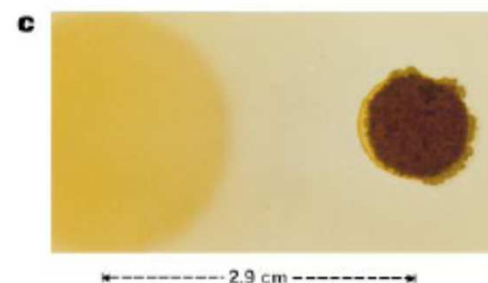
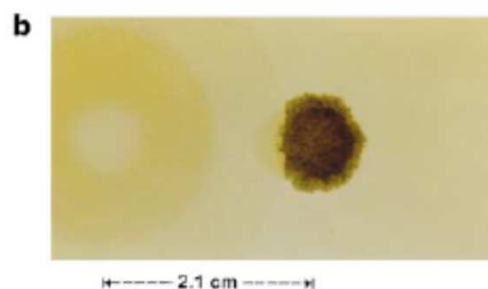
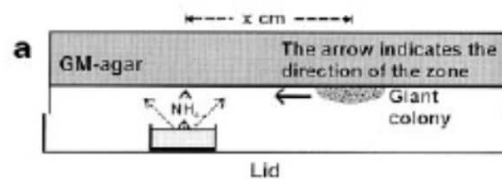
Čáp et al., Mol Cell, 2012

Komunikace kolonií

Kvasinkové kolonie spolu „komunikují“ (i bez dotyku) pomocí **amoniaku** – inhibuje růst sousední kolonie (kolonie *S. cerevisiae* produkují amoniak po 10 dnech růstu)



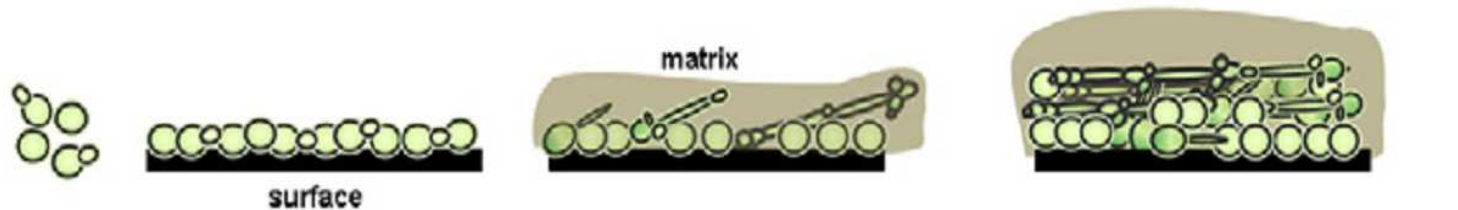
Aktivní inhibice růstu
sousední kolonie nikoli
(pasivní) důsledek
spotřebování živiny



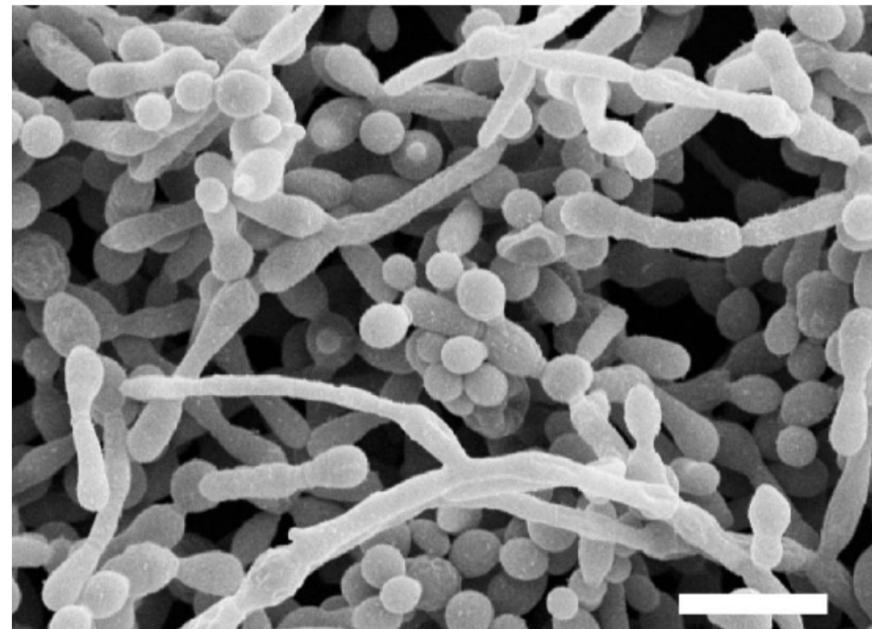
kolonie přesměrovává růst
sousední kolonie –
nekompetují o živiny

Biofilm

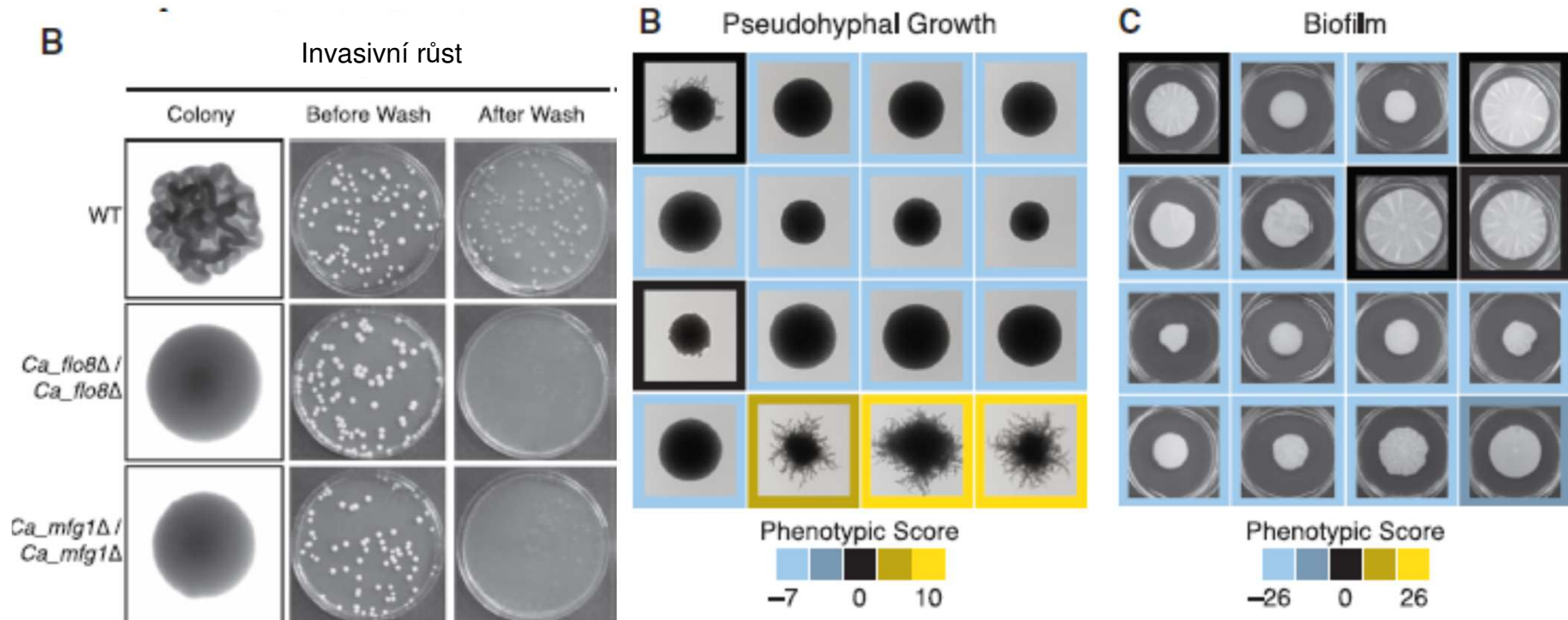
různé vývojové programy (formy) vedou k mnoho-buněčným strukturám (...**hyfy**)
- tvorba **biofilmu** na pevném podkladu se sníženým množstvím agaru (málo glukózy)



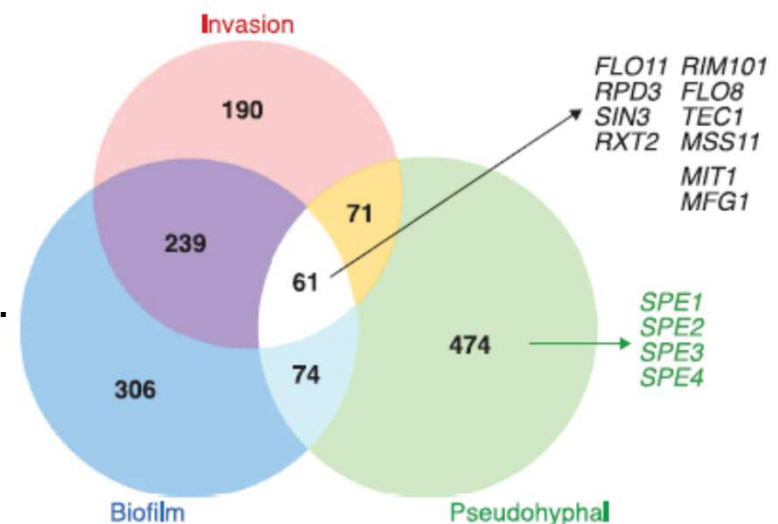
- tvořen EC matrix s mikrokoloniemi kvasinek, hyfami a pseudohyfami (komplexní struktura)
- více rezistentní než planktonické buňky
- významně přispívá k rozvoji a odolnosti kandidóz (**rezistentní** k antimykotickým látkám)
- ECM a adhesiny/flokuliny *FLO1*, *FLO11* jsou potřebné pro tvorbu biofilmu
- váží např. peptidy na povrchu hostitelské buňky (*C. albicans* = *ALS2*, 3, 6, 7, 9 exprimovány při vaginální infekci zatímco *ALS1*, 2, 3, 4, 5, 9 exprimovány při orální infekci)



S.c. kmen Σ1278b



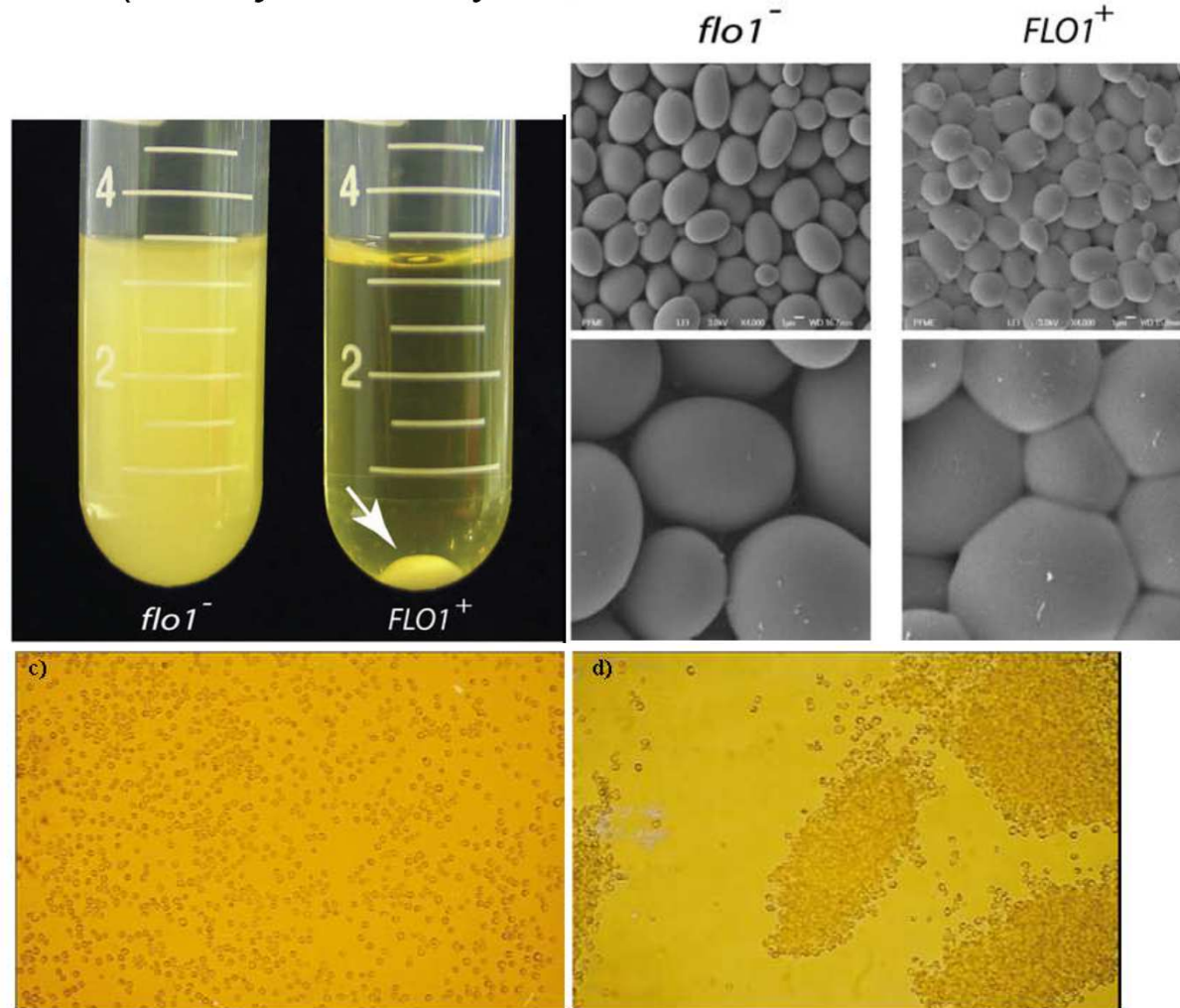
- buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (biofilm, invasivní růst, pseudohyfy, flokulace)
- **FLO11** = adhesin (glykoprotein – faktor důležitý pro uchycení)
- Flo8, Mfg1 jsou TF aktivující transkripci Flo11
- Flo11, Flo8, Mfg1 faktory jsou konzervovány ... a podílí se na invasivních vlastnostech (virulenci) patogenních kvasinek *C. albicans*



Ryan et al, Science (2012)

Flokulace

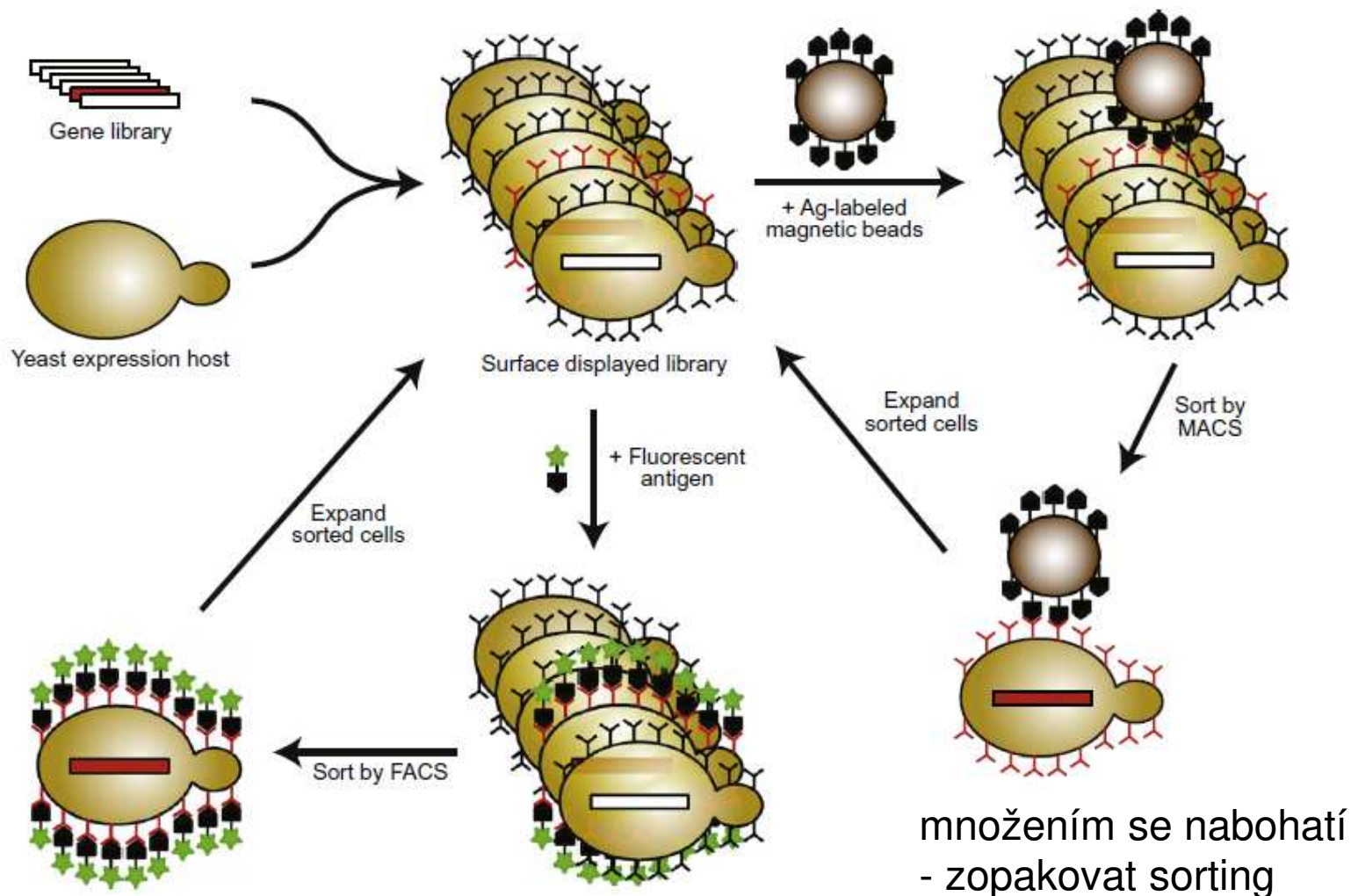
- reverzibilní schopnost kvasinek shlukovat se, tvořit větší celky (vločky, floky); odpověď na stres
- flokulace je významná vlastnost využívaná např. při produkci piva (snižuje náklady na filtraci piva)



- ovlivněno složením média, genetickou výbavou kmene (skupina *FLO* genů), teplotou, stavbou a morfologií buňky ...

- Flo1p váže manany na povrchu buněk stejného druhu (*S.c.*) => agregace
- **NewFlo** váže manosu i glukosu => glukosa v mediu inhibuje agregaci – teprve po přeměně cukrů na etanol se váže na buněčnou stěnu ostatních buněk a dochází k vločkování

YSD - testy antigen/protilátka



- v kvasince je exprimována knihovna (např. IgG klonů) – na kuličkách je navázán antigen (fluorescenčně značený) – opakováním vychytávání dojde k nabohacení (i slabších interakcí)