



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



prof. Augustin Svoboda
asvoboda@med.muni.cz

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

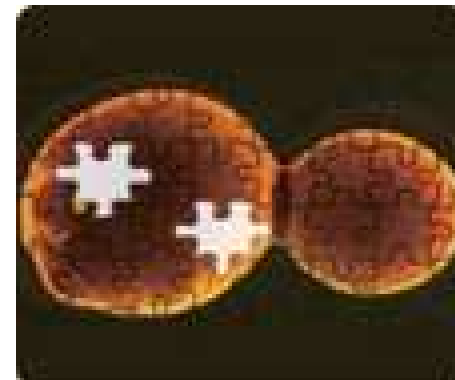
21.09.2017 10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam
28.09.2017			volno
05.10.2017 10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
12.10.2017 10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Diagnostické a molekulárně biologické metody
19.10.2017 10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
26.10.2017 10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
02.11.2017 10-11.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
09.11.2017 10-11.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
16.11.2017 10-11.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
23.11.2017 10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
30.11.2017 10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Organizace kvasinkového chromatinu a evoluce
07.12.2017 8-12hod	A7-2.17	Svoboda+Paleček	Cvičení k přednáškám
14.12.2017 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

Variant Viewer

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

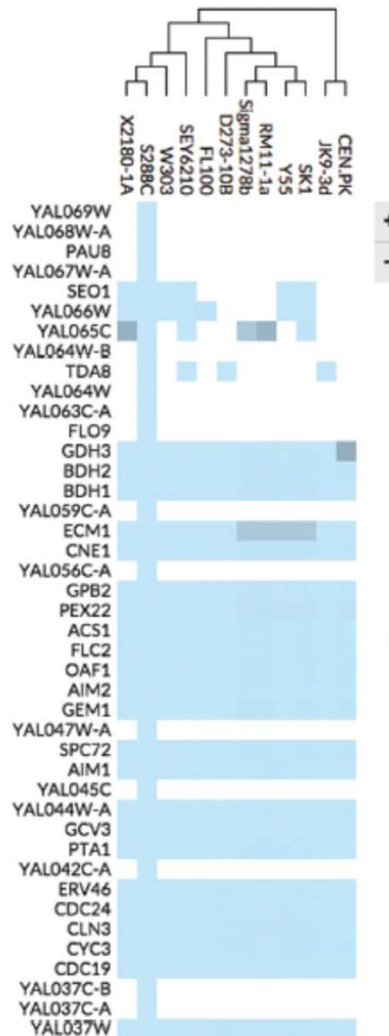


Table 1. Genomes included in the initial release of the Variant Viewer

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



MLP1 (YKR095W) Interaction Summary | BioGRID - Windows Internet Explorer

home help wiki tools contribute statistics downloads partners about us |

Gene / Identifier Search

MLP1 (YKR095W) Interaction Summary | BioGRID - Windows Internet Explorer

http://thebiogrid.org/34226

Soubor Úpravy Zobrazit Obilbené položky Nástroje Nápořádání

Obilbené položky Program Prohlášení hodinu za... desktop.ini Free Hotmail Galerie oblasti Web Slice Navrhované weby

MLP1 (YKR095W) Interaction Summary | BioGRID

Switch View: Summary Sortable Table 18 PTM Sites

Displaying 101 total unique interactors

NAB2 | YGL122C
 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 HIT	Green DM (2008) Vinguerre P (2005)	Low Throughput	
Reconstituted Complex	BAIT BAIT/HIT	Grant RP (2008) Fasken ME (2008)	Low Throughput	
Two-hybrid	BAIT HIT	Green DM (2003) Grant RP (2008)	Low Throughput	
Synthetic Rescue	BAIT	Vinguerre P (2005)	Low Throughput	

MLP2 | YIL149C
 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
 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

6 Thunderbird 2 Microsoft... 8 Internet E... QIAGEN - Sa... 2 Microsoft... 2 Adobe Re... 2 Microsoft... 20:57

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)

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)



28th 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
Yeast population, comparative and evolutionary genomics
Systems biology and bioinformatics
Proteostasis, ageing and disease models
Yeast pathogens and host interaction



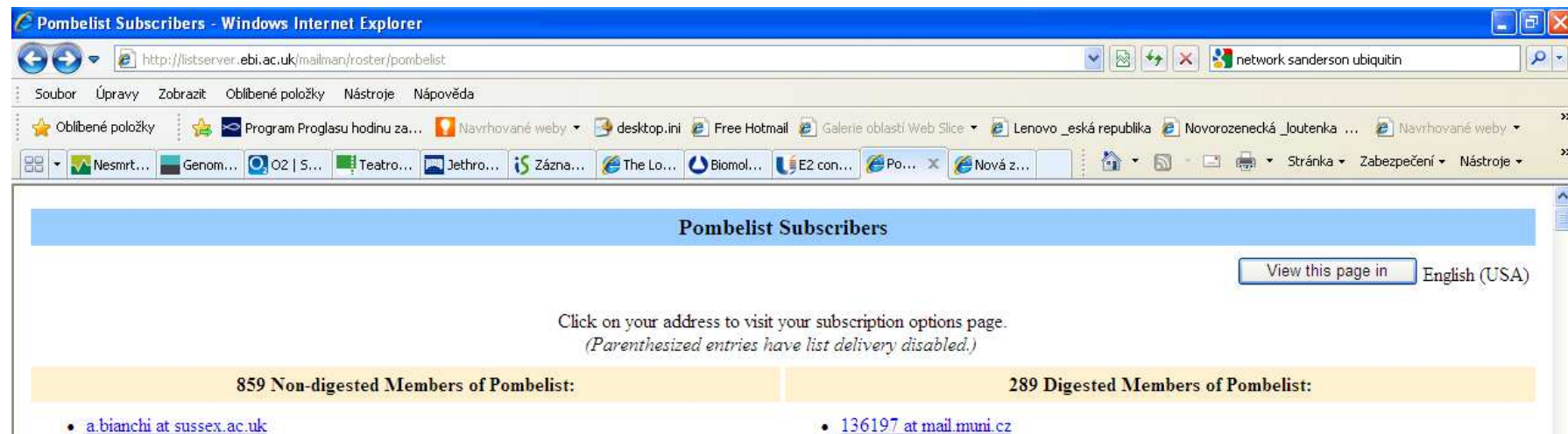
28th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB)

August 27 - September 1, 2017
Prague, Czech Republic



Kvasinkáři

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



<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*)



Ale – *Saccharomyces cerevisiae*



Lager – *Saccharomyces pastorianus* dle NGS
původem z Číny

... trochu historie

poprvé kvasinky pozoroval A. van Leeuwenhoek v roce 1680

- L. Pasteur prokázal aktivní účast při kvašení (publikoval 1866, 1876)

- název Zuckerpilz („cukerná houba“) tj. *Saccharomyces* od roku 1837 (T. 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)

- první systém pro klasifikaci (patogenních) kvasinek, založený na morfologii buněk a několika fyziologických testech (fermentace monosacharidů)

vytvořil A. Guilliermond v roce 1912

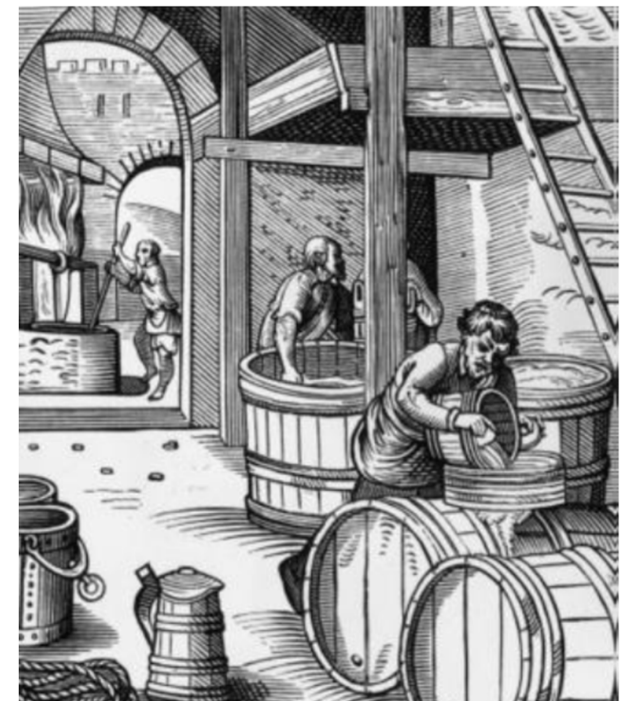
- v Československu prof. Kratochvilová ...



Lager – *Saccharomyces pastorianus*



Ale – *Saccharomyces cerevisiae*

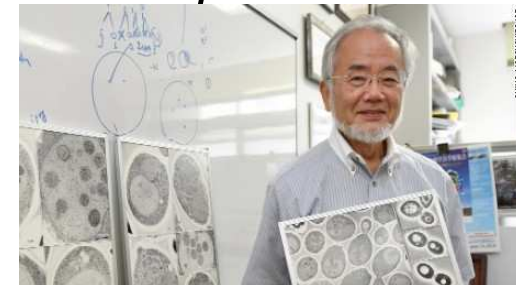


... trochu historie výzkumu

- v 70. letech 20. století se začali kvasinky využívat jako modelový eukaryotický organismus (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* ...



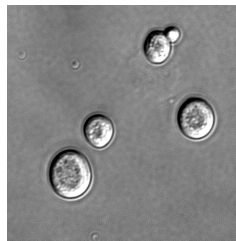
Fantes a Hoffman, Genetics, 2016



- 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 10⁸/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)

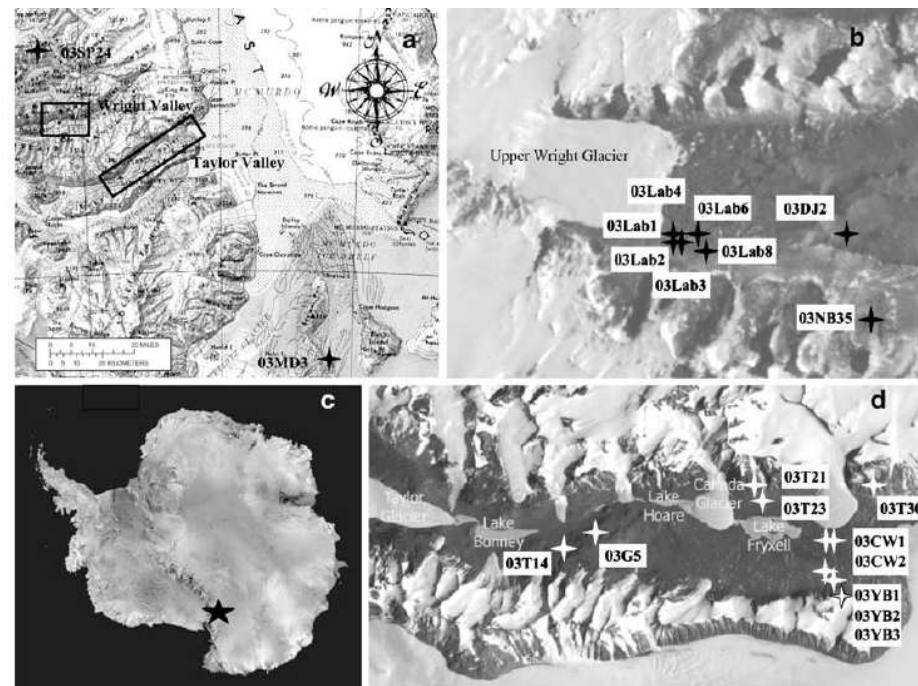


Figure 1 Sample site locations in South Victoria Land, Antarctica (2003–2004). Sites are identified by stars and labels. The entire study area with specific sites 03SP24 and 03MD3 is shown in (a). Sites in Wright

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> ^a	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>	03DJI	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> ^a	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

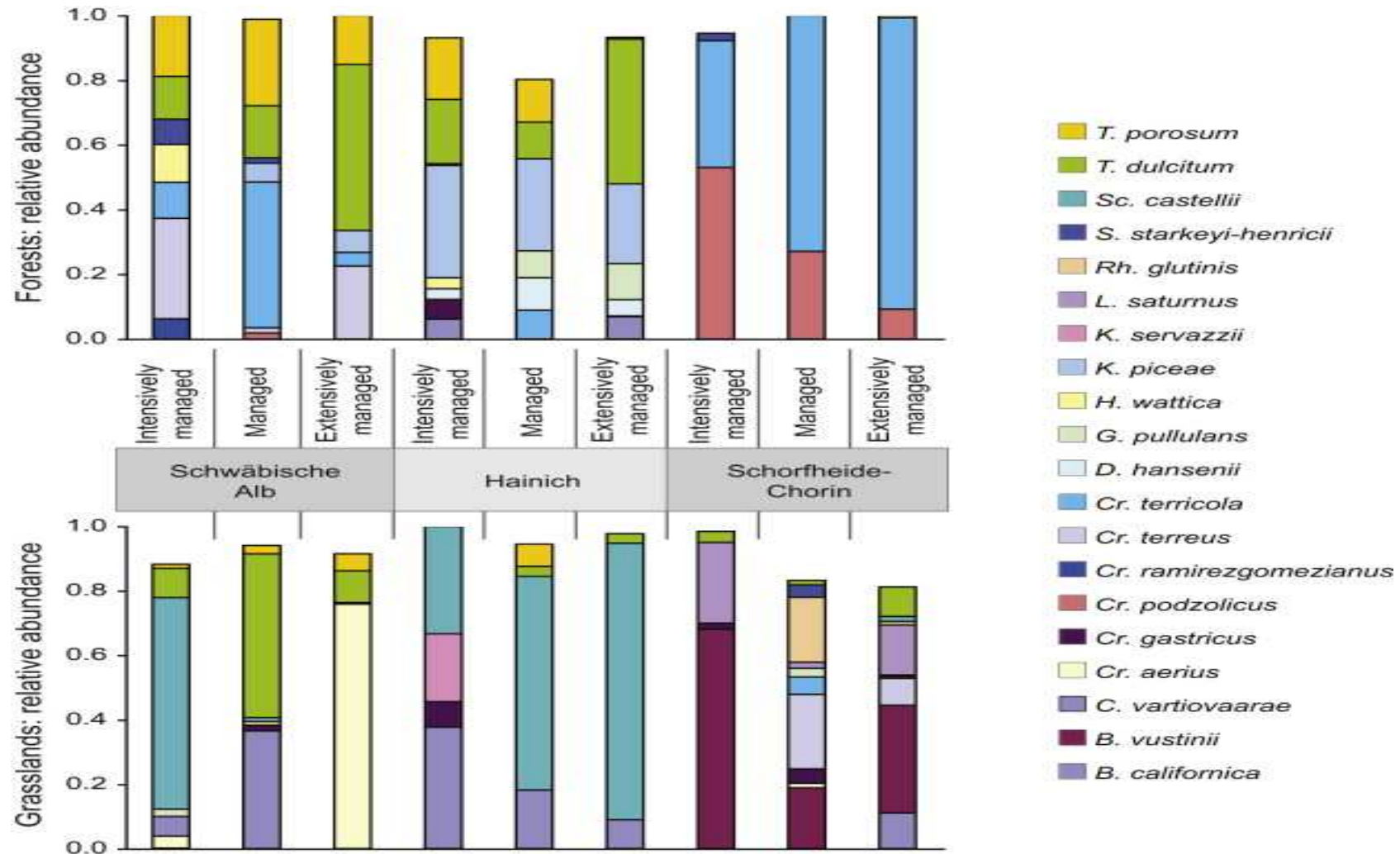
^aMembers of Ascomycota

* 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



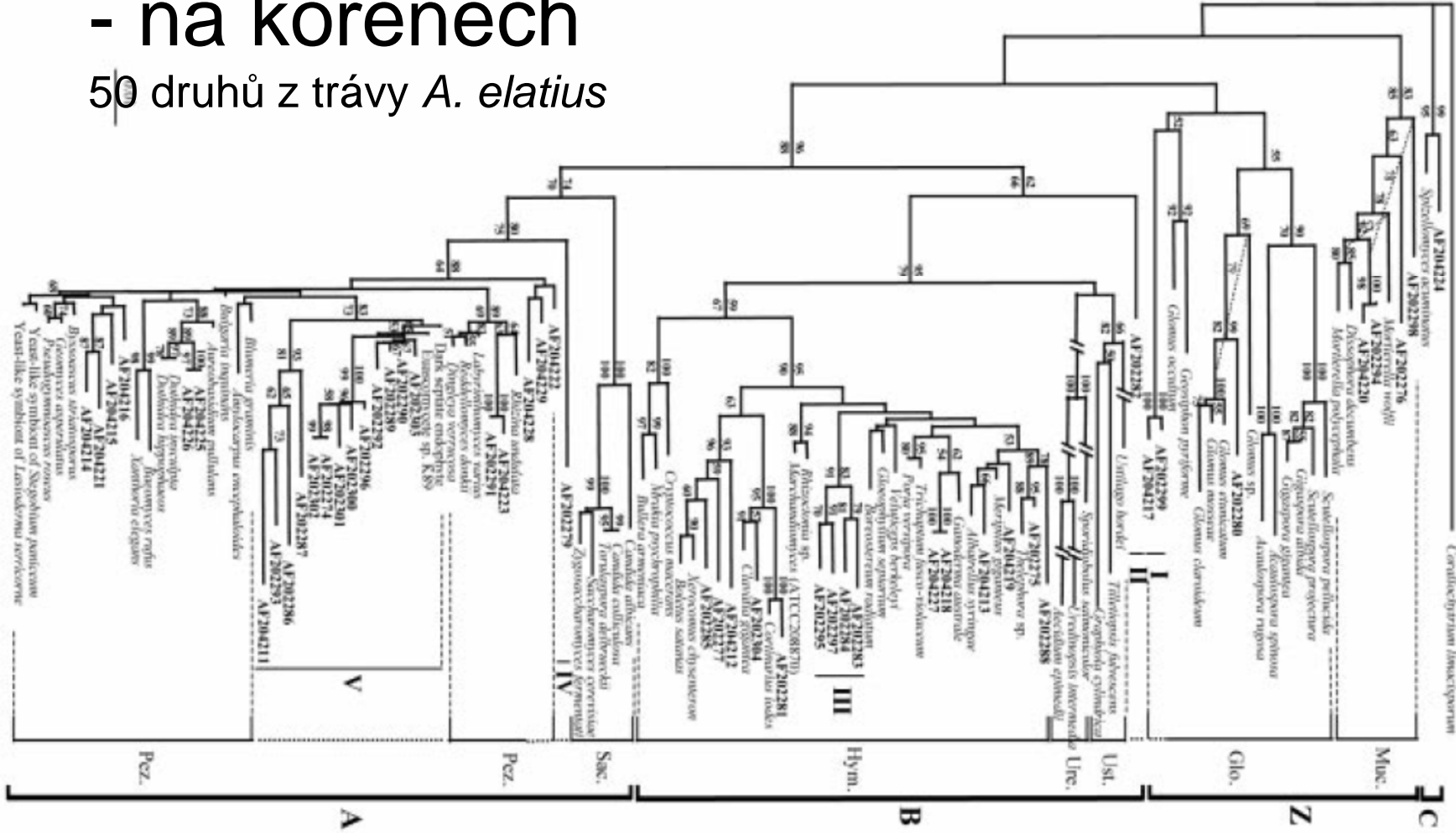


- Nerovnoměrné (komplexní) rozložení kvasinek
- Pokryv půdy má velký vliv na diverzitu a množství půdních kvasinek (lesy x pastviny), stejně tak i lidská činnost (oblasti zemědělsky a lesnický využívané x přirozené)

Rostliny a kvasinky

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

- na kořenech
50 druhů z trávy *A. elatius*



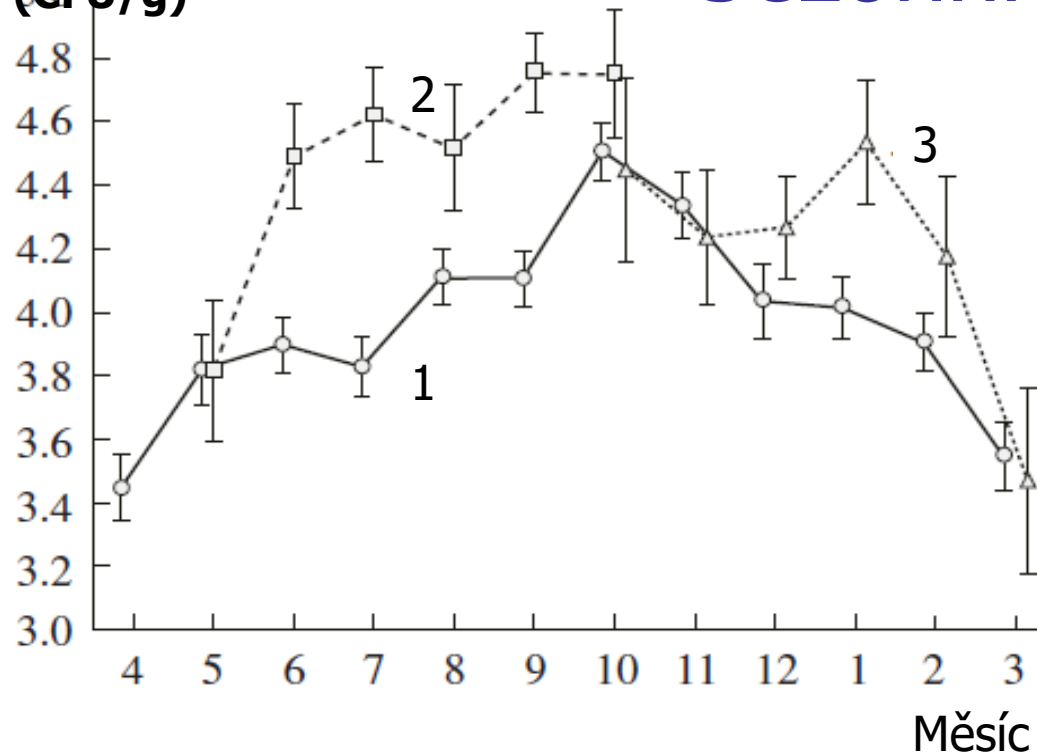
Rostliny a kvasinky

- na kazících se plodech (na spadlých plodech ... schopny hydrolyticky štěpit celobiosu, lignin nebo produkty bakteriálního metabolismu - Zahnívací 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

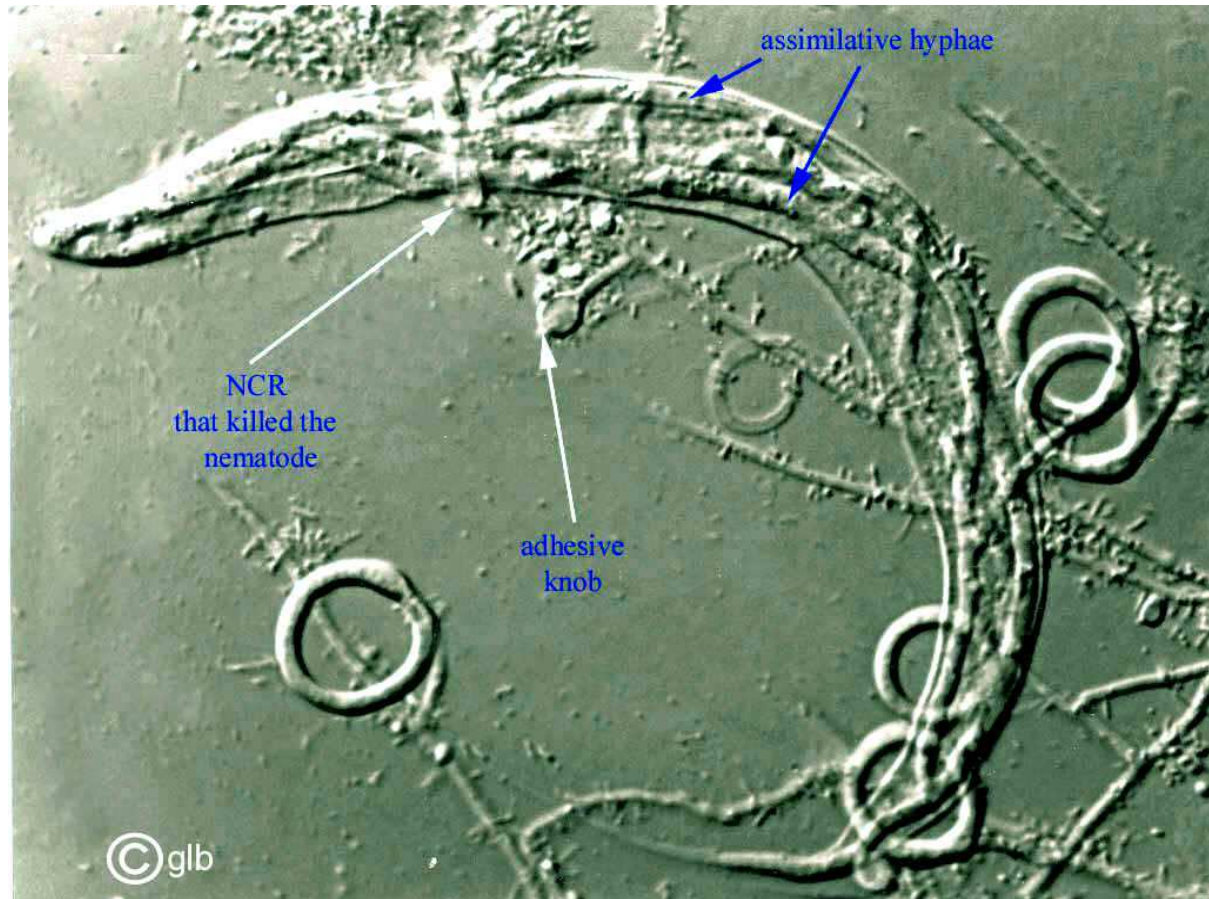
- Rozpouštění nerozpustné fosforečnany ... → podpora růstu kořenů (stimulátory růstu a biohnojiva)
- Symbionti nebo paraziti
- Interakce s houbami
 - Exocelulární polymery (glykolipidy, glykoproteiny) s fungicidními a fungistatickými účinky
 - Extracelulární enzymy (glukanázy)
 - Mykociny (proteiny)

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

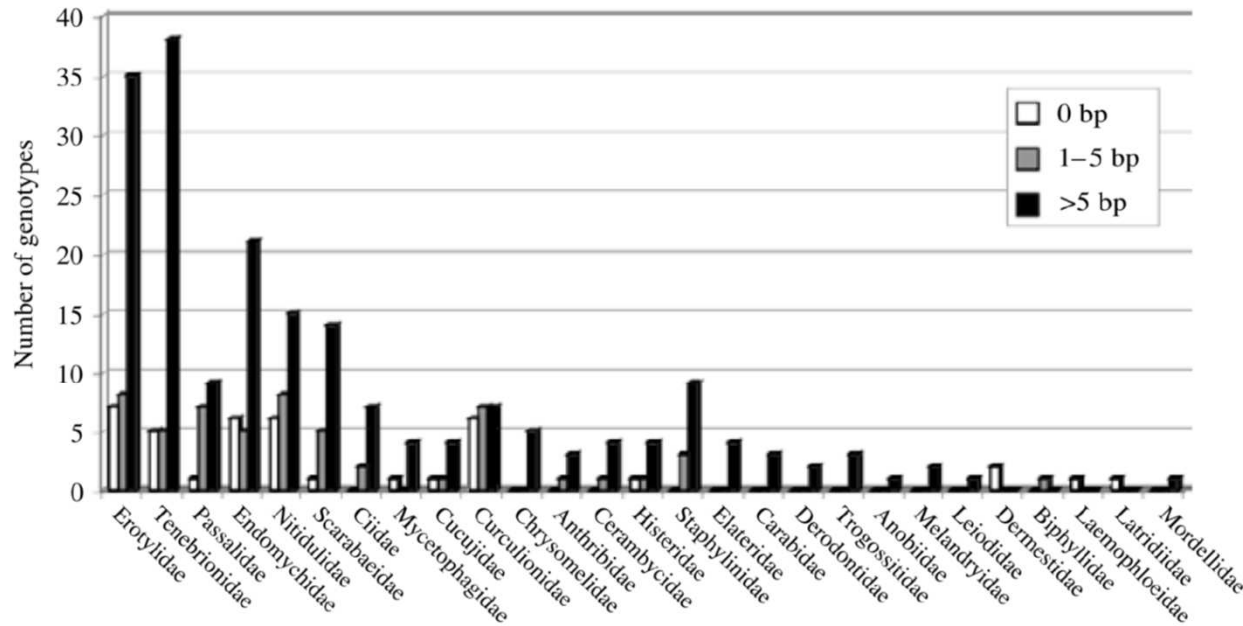


Predátorská kvasinka
(*Dactylellina candida*)
napadající hlístici
(<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/2008/dactylel.htm>)

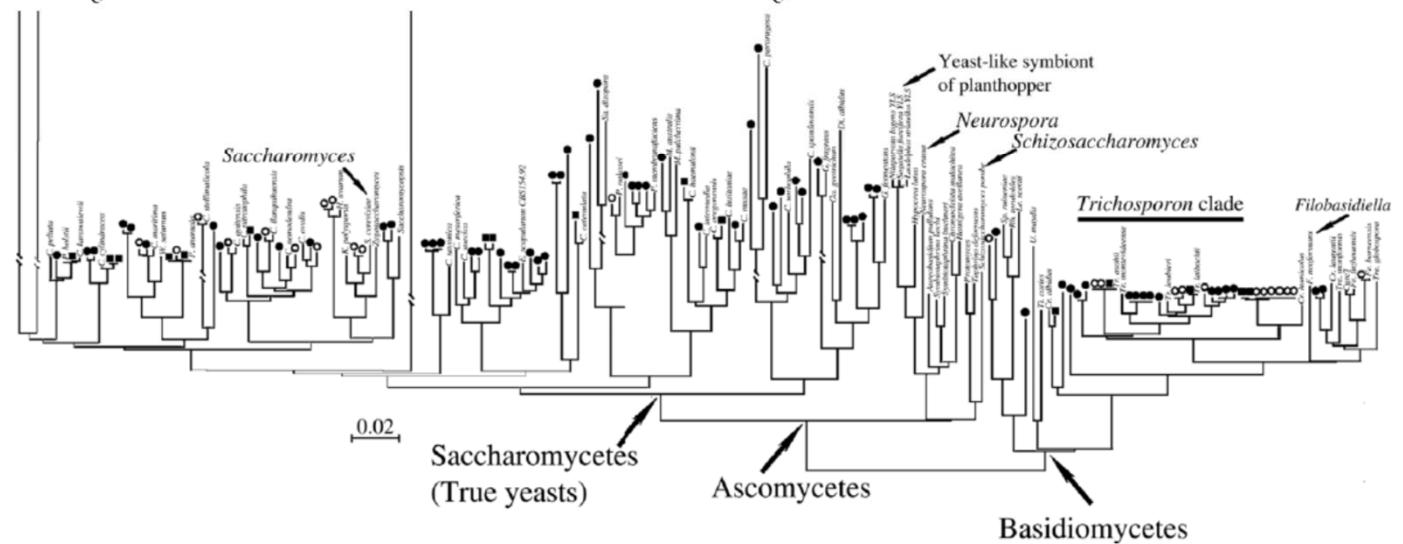


Hmyz a kvasinky

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



čmeláci

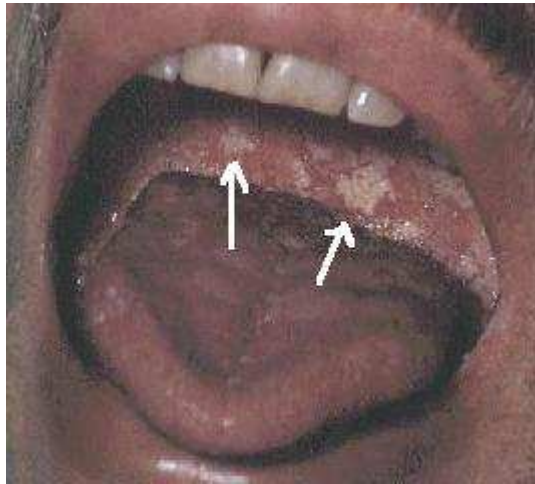


Hmyz a kvasinky

- 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

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

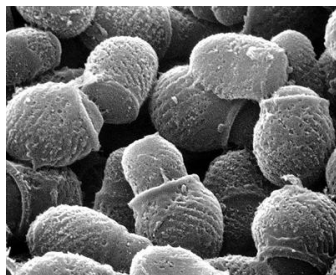
-**Kandidózy** (*C. albicans*, *dublinskiensis*, *krusei*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *glabrata*, *utilis*, *lipolytica*)

-*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)

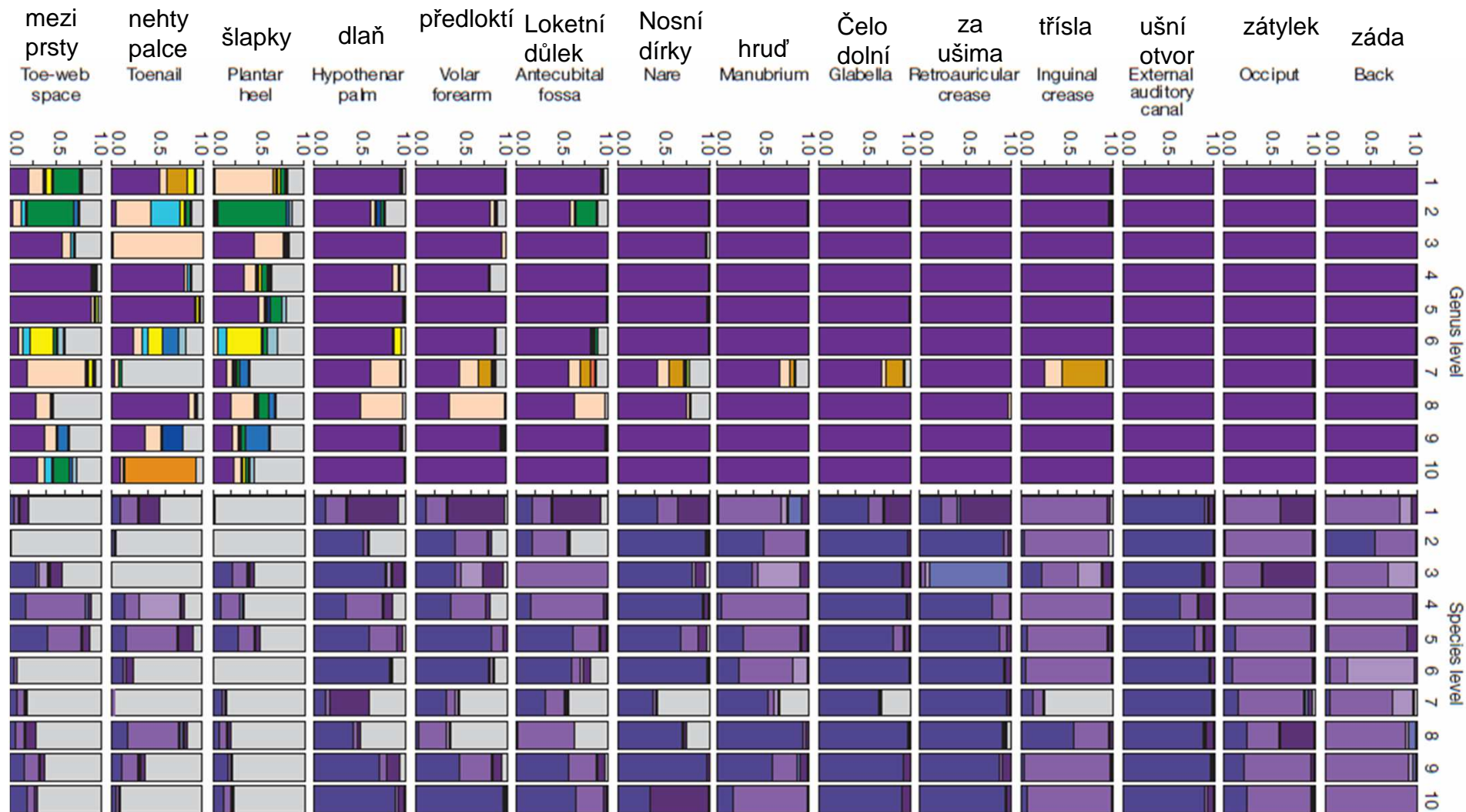
-*Malassezia* – poruchy pigmentace kůže a lupy tzv. **pityriázy** (*M. furfur*, *globosa*, *japonica*, *obtusa*, *restricta*, *yamatoensis*, *dermatis*, *slooffiae*, *sympodialis*, *nana*, *pachydermatis*)

-3 druhy *Trichosporon* (kůže)



Malassezia furfur
pityriasis versicolor





Genus level
Ascomycetes

- Arthrodermataceae
- Aspergillus
- Candida
- Chrysosporium
- Epicoccum
- Leptosphaerulina
- Penicillium
- Phoma
- Saccharomyces

Basidiomycetes

- Cryptococcus
- Malassezia
- Rhodotorula
- Ustilago
- Others (<1%)

Species level
Malassezia

- restricta
- globosa
- sympodialis
- Other species:
- Undetermined
- Other genera

mikrobiom

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

Findley et al, Nature, 2013

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 displays the GenScript website in a Windows Internet Explorer browser. The page title is "Recombinant Protein Services - YeastHIGH? Yeast Expression System - GenScript". The URL is http://www.genscript.com/custom_protein_yeast_expression.html?src=email2013123137&logId=68148090&email=&brandId=&type=&c=1&ret=true. The browser's address bar shows the URL, and the taskbar at the bottom indicates the page is titled "Recombinant Protein ...".

The website header features the GenScript logo with the tagline "Make Research Easy" and an ISO 9001 CERTIFIED badge. Navigation links include "Home", "Services", "Products", "Resources", "Promotions", and "Company". A search bar and language selection options (En, De, Es, Fr, 日本語) are also present.

The main content area is titled "YeastHIGH™ Yeast Expression System" and describes it as an "Economic solution for eukaryotic protein production". Key features listed include:

- Proprietary YeastHIGH™ technology
- Advanced platform for producing humanized antibodies
- Large-scale eukaryotic protein production, up to 500 L

A "Get a Quote Now" button is available, with the text "Via email, phone, or fax". Below the main heading, a paragraph states: "Yeast protein expression system is the most economical eukaryotic expression system for both secretion and intracellular expression. It is ideally suitable for large-scale production of recombinant eukaryotic proteins." Another paragraph explains: "Utilizing GenScript's YeastHIGH™ Technology, selected stable and durable production strains that resemble mammalian system are employed for high-yield, high-productivity protein processing, thus dramatically reducing the associated costs and inherent time requirements. In addition, as the largest gene synthesis supplier in the U.S., GenScript can deploy free OptimumGene™ Codon Optimization specific to *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and other yeast strains to further enhance the productivity of your protein."

The left sidebar lists various "Protein Services" such as "Key Technologies for Protein Expression and Purification", "New: BacPower™ Guaranteed Package", "New: PROtential Protein Expression Evaluation Services", "New: InsectPower™ Guaranteed Protein Package", "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".

- 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 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).

- též v příští přednášce

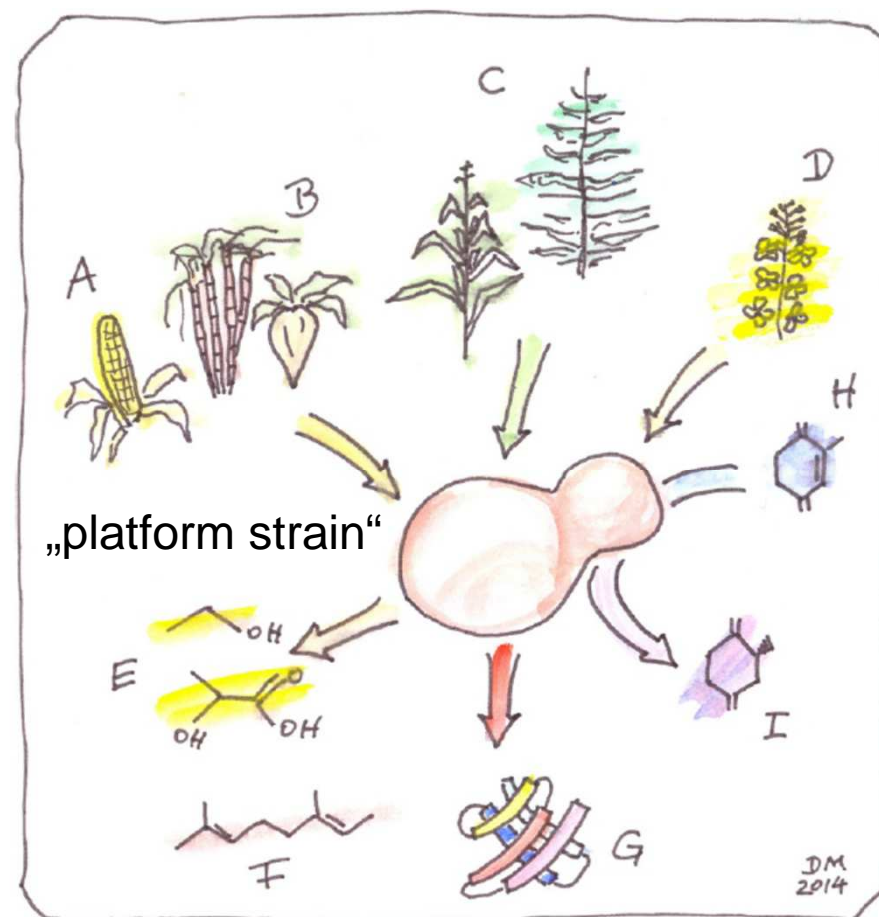
- kvasinky byly po tisíciletí hlavním mikroorganismem „biotechnologií“
- v polovině 20. století nástup bakteriálních technologií
- kvasinky (díky detailnímu poznání ...) opět nabývají na významu: produkce metabolitů, produkce rekombinantních proteinů, *in vivo* biotransformace
- *S. cerevisiae* – hlavní 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)

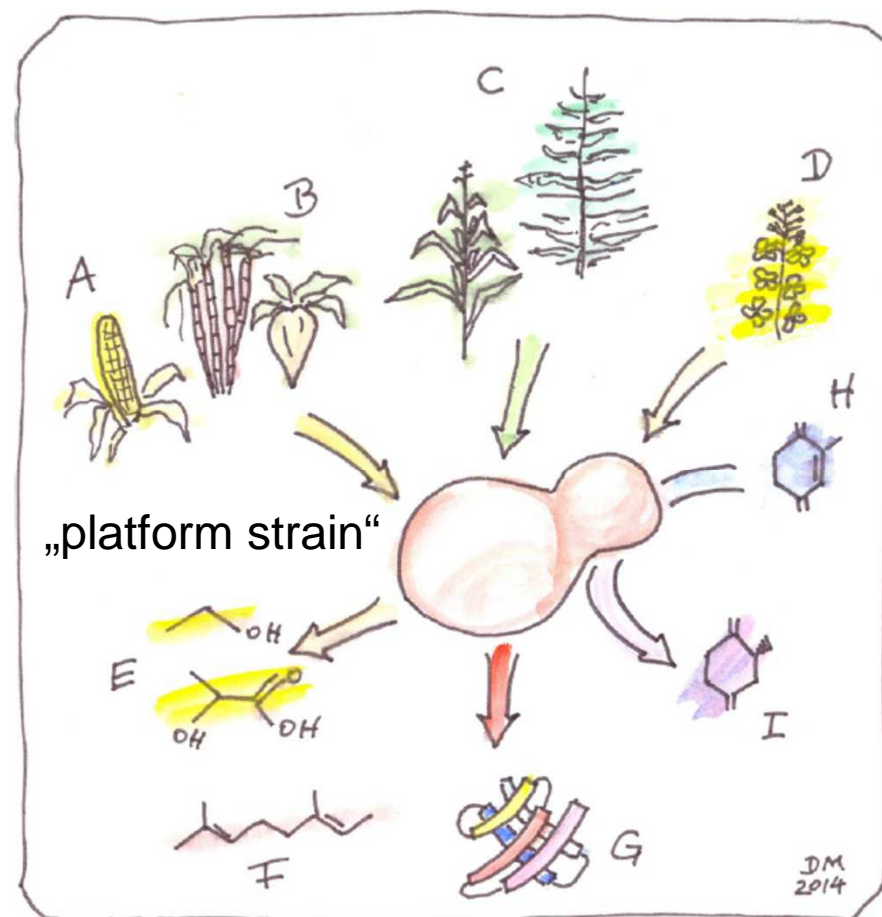
sekvence genomů mnoha kvasinek
(možnost využití heterologních metabolických drah)

Mattanovich et al, Microbiol Cell Factories, 2014



- 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)

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

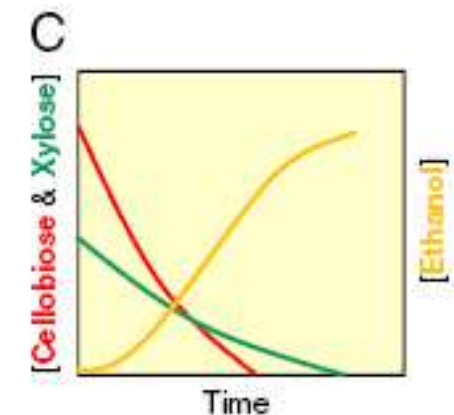
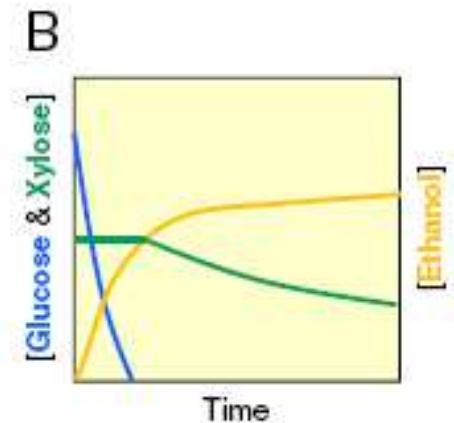
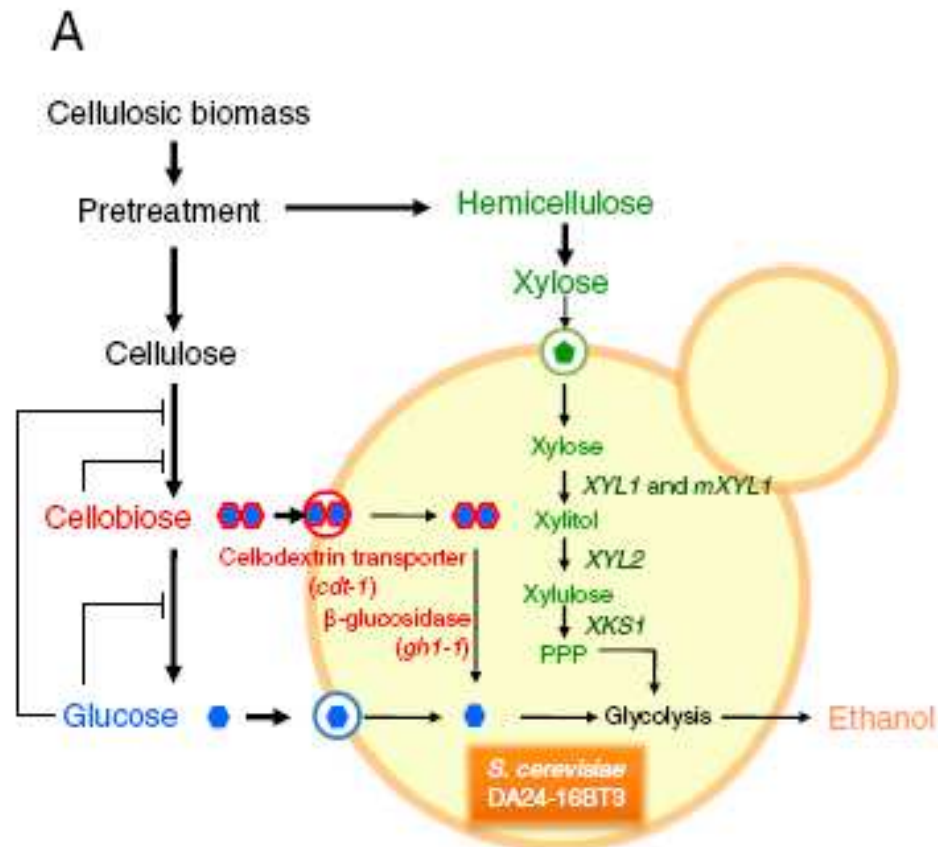


Využití *S. cerevisiae* pro výrobu biopaliv

- 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 represe



- Více v dalších přednáškách



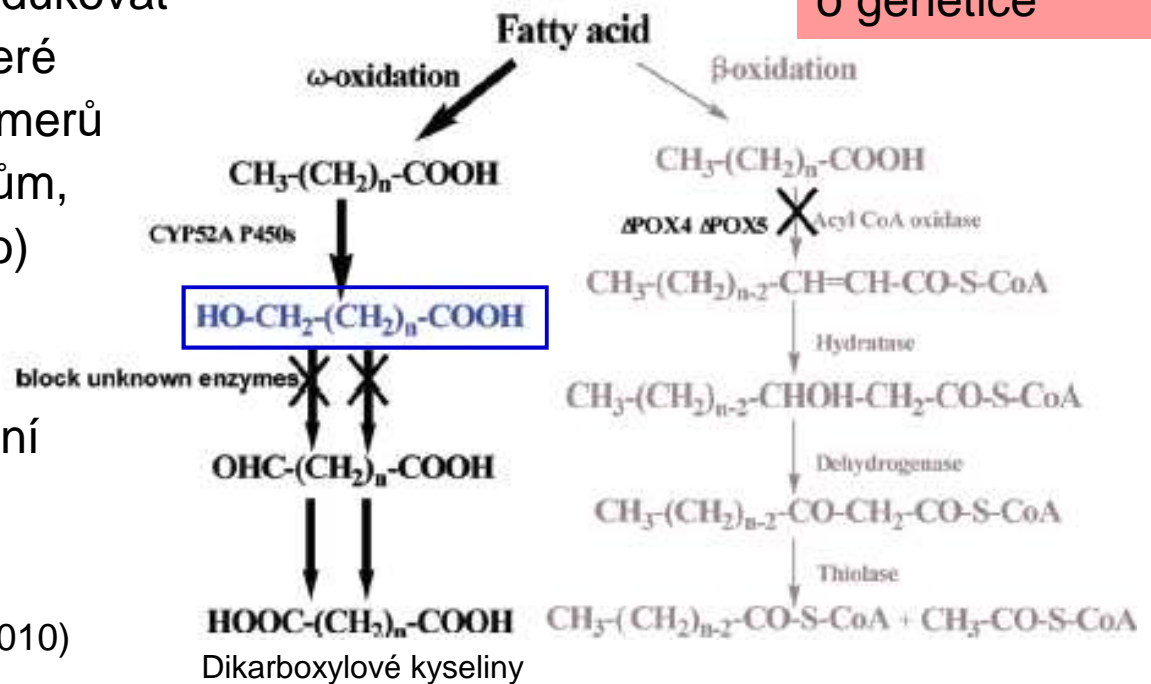
Příprava monomerů pro výrobu plastů – využití *Candida tropicalis*

- *Candida tropicalis* je schopna využít mastné kyseliny jako zdroj uhlíku (acetyl-CoA)
- mutantní kmen (P450: 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

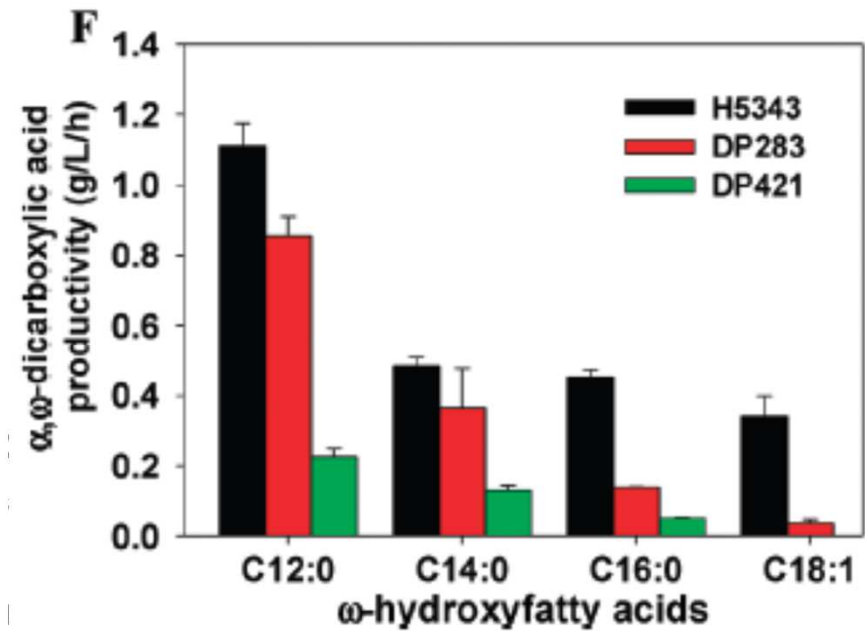
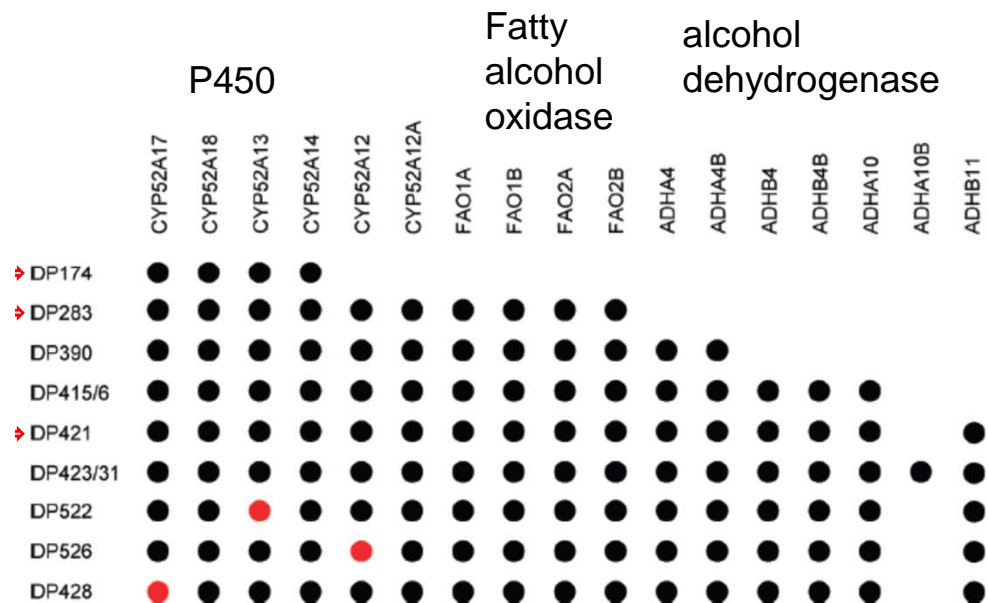
ω -hydroxymastné kyseliny, které lze použít pro výrobu bio-polymerů (plastů podobných polyetylenům, bio-odbouratelné na bio-palivo)

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

Lu et al., JACS (2010)

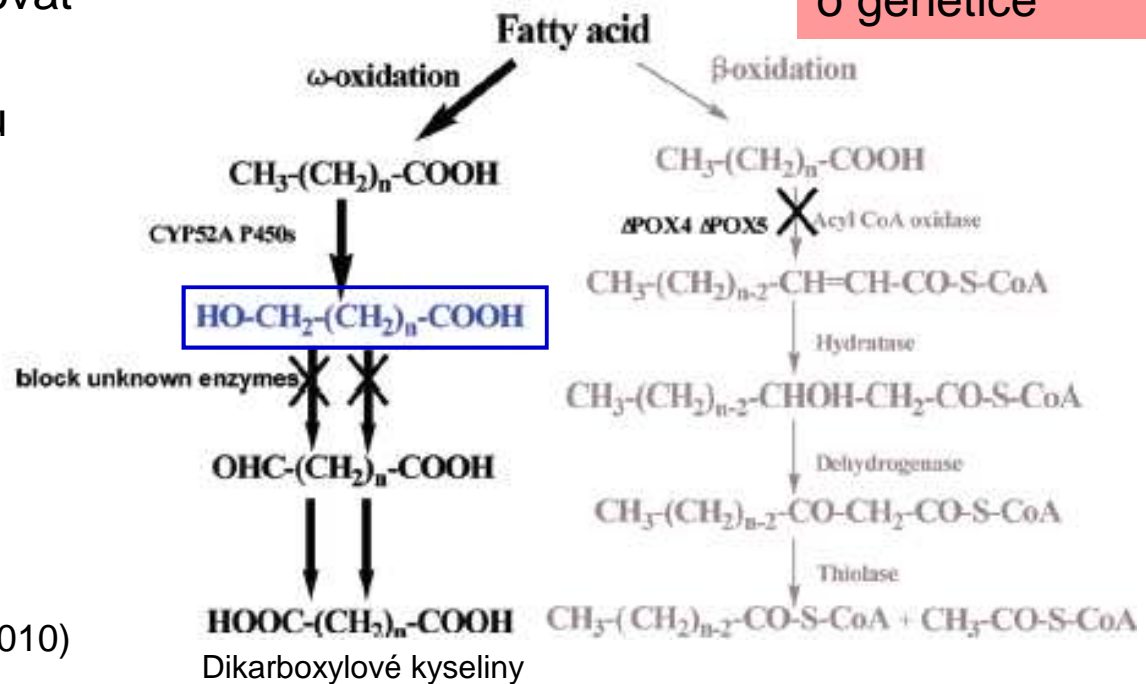


Přednáška
o genetice



- 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)

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 jsou konservovány v eukaryotech)
 - buněčný cyklus (sir P. Nurse)
 - sekrece, endocytóza, buněčná stěna (prof. A. Svoboda)
 - chromosomy a evoluce (např. projekt syntetického chromosomu)
 - mechanismy opravy poškozené DNA (nádorové syndromy – tabulka)

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	Score*	<i>S. pombe</i> gene/product
Xeroderma pigmentosum D; <i>XPB</i>	++++	rad15, rhp3
Xeroderma pigmentosum B; <i>ERCC3</i>	++++	rad25
Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC); <i>MSH2</i>	++++	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 syndrome; <i>CHS1</i>	++++	–
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: +++++, $<1 \times 10^{-100}$; +++, 1×10^{-40} to 1×10^{-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	+++	ViC 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: +++++, 1×10^{-100}; +++, 1×10^{-40} to 1×10^{-100}.

Wood et al, Nature, 2002

http://yeastmine.yeastgenome.org/yeastmine/template.do?name=HumanGene_YeastGene_Complement

research group leader in the fi... ScholarOne Manuscripts

Soubor Úpravy Zobražit Obilíbené položky Nástroje Nápověda

EndNote 3.10 Capture ? Help

Zprávy IDNES.cz - Přehled... Internet - Radio Proglas Po dlouhé nemoci zemřel ...

YeastMine: Template quer... YeastMine: Query results page

Cohesin recruits the Escol... Kohesin recruits the Escol... The Deubiquitinase USP37 Re... Klinika nemocí plicních a tube... Klinika nemocí plicních a ...

Hledat Více Stránka Zabezpečení Nástroje

SGD YeastMine

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

Data Updated on: Aug-24-2015

Home Templates Lists QueryBuilder Tools Regions Data Sources API MyMine

Contact Us Video Tutorials Help Log in

Search: 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.

http://yeastmine.yeastgenome.org/yeastmine/results.do?trail=7?cquery

research group leader in t... ScholarOne Manuscripts

Soubor Úpravy Zobražit Obilíbené položky Nástroje Nápověda

EndNote 3.10 Capture ? Help

Zprávy IDNES.cz - Přehled... Vltava - Klasická hudba, lit... Internet - Radio Proglas Po dlouhé nemoci zemřel ...

YeastMine: Query result... YeastMine: invalid id - 27... The Deubiquitinase USP37... Kohesin recruits the Escol... Klinika nemocí plicních a ...

Hledat Více Stránka Zabezpečení Nástroje

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

Data Updated on: Aug-24-2015

SGD YeastMine

Home Templates Lists QueryBuilder Tools Regions Data Sources API MyMine

Contact Us Video Tutorials Help Log in

Search: 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	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

Powered by

105% 1507 31.8.2015

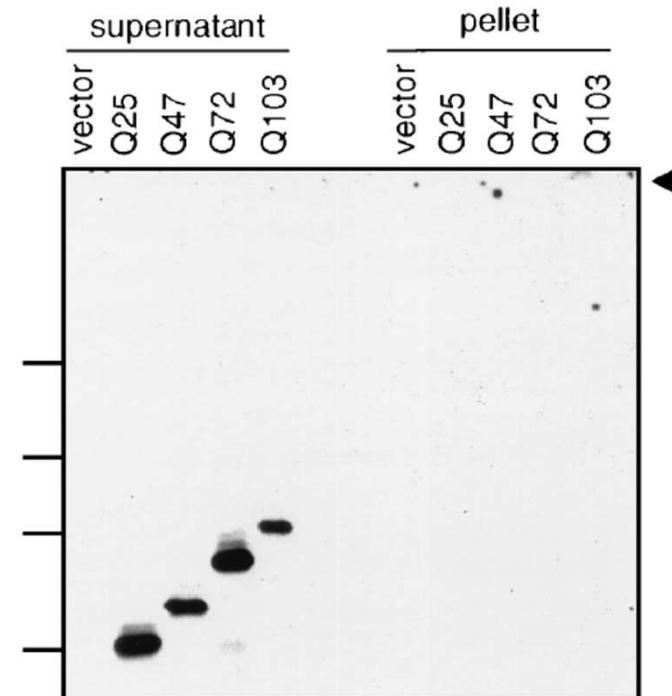
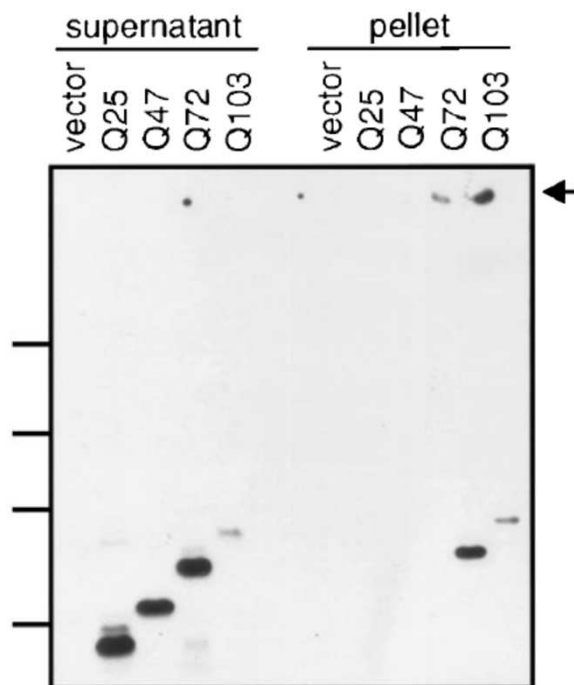
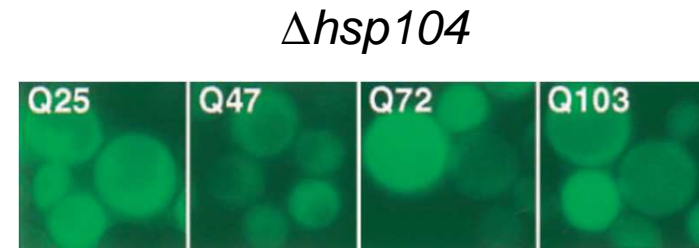
CS

Windows taskbar icons: Start, Internet Explorer, Firefox, Chrome, Opera, VLC, WinRAR, File Explorer, Task Manager, System Tray.

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)



Souhrn 1. přednášky

- Kvasinky – historie využití a výzkumu
- Kde všude a jak kvasinky rostou?
- Vztahy k lidskému zdraví
- Příklady biotechnologií a výzkumu



Hustopeče u Břeclavi