

C9045 - Biologie kvasinek



Hustopeče u Břeclavi



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



Dr. Mário Špirek

O čem se dozvíte?

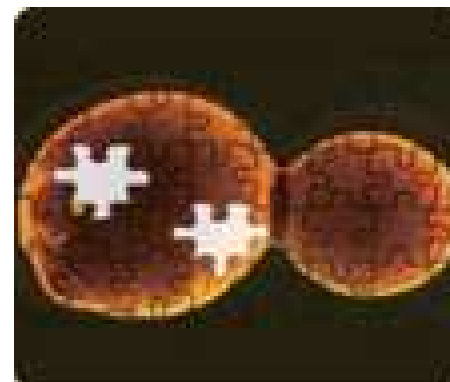
- Význam – výskyt, využití, výzkum ...
- Mikrobiologie - základní charakteristiky
- *Biotechnologie - metody*
- Genetika - metody
- Klinické aspekty – patogenní kmeny
- Buněčná biologie – buněčná stěna ...
- Molekulární biologie – buněčný cyklus, transkripce, chromosomy, evoluce

Rozvrh přednášek

15.09.2021	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam
22.09.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
29.09.2021	10-11.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Mitochondrie, chromosomy
06.10.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Diagnostické a molekulárně biologické metody
13.10.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
20.10.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
27.10.2021	10-11.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
03.11.2021	10-11.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
10.11.2021	10-11.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
17.11.2021				státní svátek
24.11.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
01.12.2021	10-11.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Organizace genomu a evoluce kvasinek
08.12.2021	8-12hod	B07-2.17	Paleček+Špirek	Cvičení k přednáškám
15.12.2021	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](#), 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)

Community Information - Windows Internet Explorer

http://www.yeastgenome.org/ComContents.shtml

Search

Community Info | Submit Data | BLAST | Primers | PatMatch | Gene/Seq Resources | Advanced Search | Community Wiki

Community Info Help

- **Search Options**
Advanced Search, YeastMine, Full-text Search (Textpresso), Search SGD web pages, Global Gene Hunter, Search Literature, and more.
- **Help Resources**
Getting Started, Sitemap, FAQ, and more.
- **Analysis & Tools**
BLAST, GBrowse, Gene/Seq Resources, YeastMine, Maps, and more.
- **Homology & Comparisons**
PDB Homologs, Protein Domains/Motifs, Homologs, and more.
- **Function & Expression**
Protein Info, Pathways, Expression Analysis (SPELL), and more.

Search SGD Colleagues
Use the 'Colleague' Option in the Category Search to search SGD for yeast colleagues

Yeast Laboratories
Links to PIs of yeast laboratories

Colleague Submission/Update
Add or update your information in SGD

Biosci Yeast Archives
Search the Yeast Biosci Newsgroup

Community wiki
Community-edited information about *S. cerevisiae* genes, gene products, and resources

Career Resources

Cherry et al., NAR, 2012



search ...



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

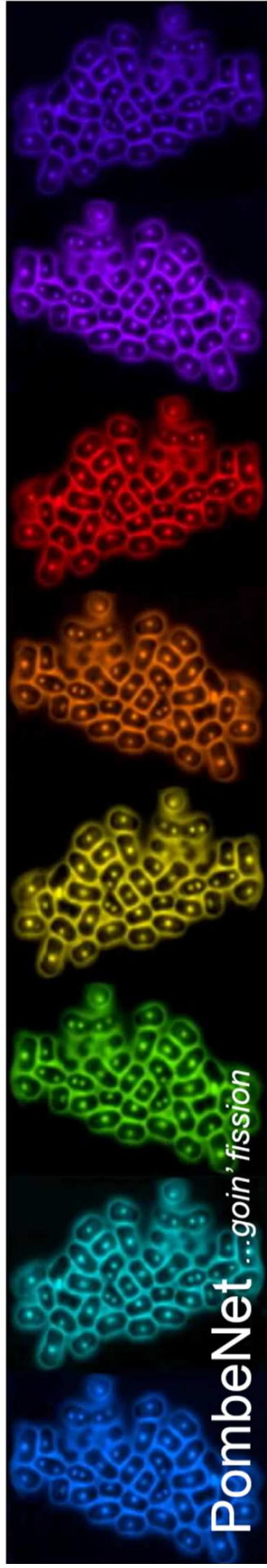
https://dornsife.usc.edu/pombenet/working-with-pombe/



USC Dornsife

Dana and David Dornsife
College of Letters, Arts and Sciences

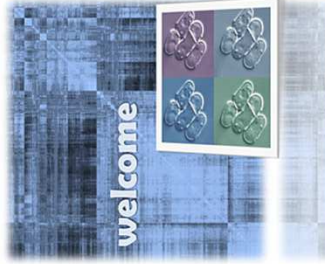
Search USC Dornsife



bählerlab

Genome Regulation

UCL Home ▸ Research Department of Genetics, Evolution and Environment ▸ BählerLab 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 M, 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



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

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 BAIT	Green DM (2008) Vindiguerra P (2005) Batisse J (2009)	Low Throughput Low Throughput Low Throughput	
Reconstituted Complex	BAIT BAIT/HIT	Grant RP (2008) Fasken ME (2008)	Low Throughput Low Throughput	
Two-hybrid	BAIT HIT	Green DM (2003) Grant RP (2008)	Low Throughput Low Throughput	
Synthetic Rescue	BAIT	Vindiguerra 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

Témata symposií a workshopů

Regulation of Gene Expression

RNA processing and regulation

Metabolism and stress response

Organelle dynamics

Cellular strategies of protein quality control

DNA replication, mutation and repair

Cell cycle, cytoskeleton and morphogenesis

Modern yeast biotechnology

New tools in yeast research - omics

Yeast population, comparative and evolutionary genomics

Systems biology and bioinformatics

Proteostasis, ageing and disease models

Yeast pathogens and host interaction



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

August 27 - September 1, 2017

Prague, Czech Republic



... trochu (pre)historie

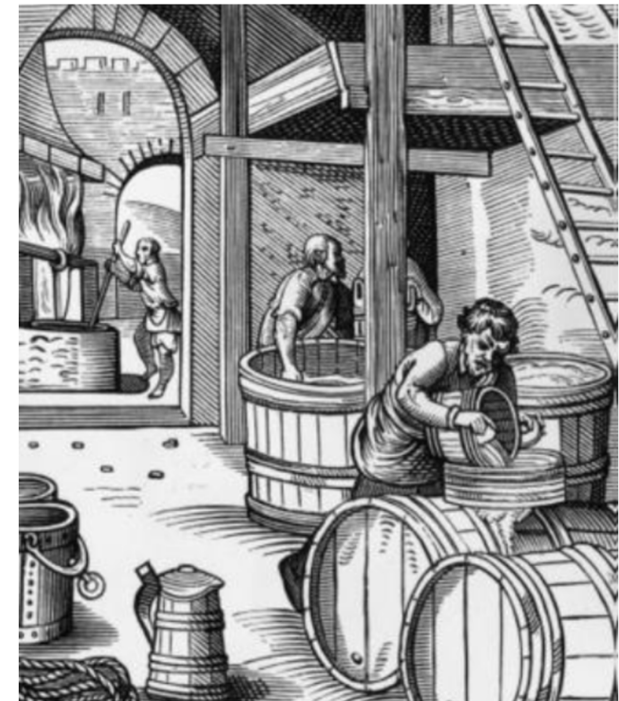
- přirozeně v prostředí mohou fermentovat sladké šťávy (např. nektar ...)
- lidé vyráběli nápoje podobné dnešnímu pivu a vínu již před ~9000 lety (Čína), chleba před ~4000 lety
- ve středověku v Evropě kvasili slad – název yeast pochází z německého *Gischt*/holandského *Gist* (název pro pěnu na povrchu 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*

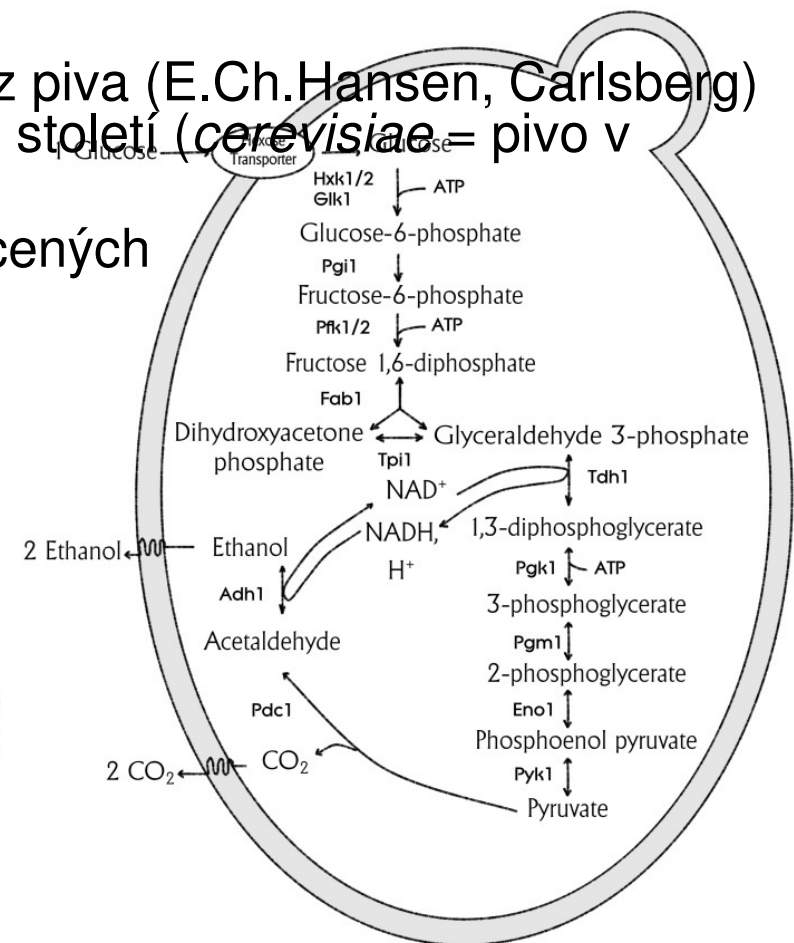
Monerawela a Bond, Biotech Adv, 2017



... 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

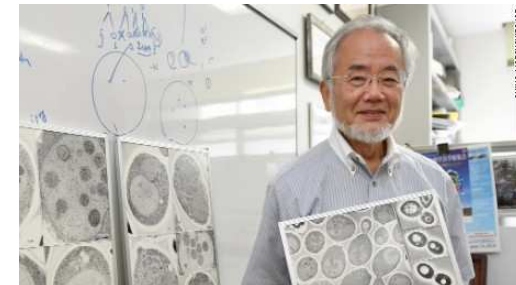


... trochu (vědecké) historie

- 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



- savci pili alkoholický nektar miliony let



- *Tana pestroocasá* pije fermentovaný nektar z květu Bertramovy palmy
- dlouhodobá konzumace fermentovaných šťáv vedla k evoluční adaptaci tohoto savce – zvýšená exprese alkoholdehydrogenázy
- autoři spekulují o vlivu takovýchto přírodních alkoholických nápojů na evoluci ... nastavení hladiny ADH u člověka ;-)



- kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* aj. rostou na substrátech bohatých na cukr
- kvasinky fermentují sladký nektar z Bertramovy palmy



Přirozený výskyt

- **ve vodě** (dle čistoty – moře 10/l, jezera 100/l, odpadní až 10^8 /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				
	03YB2				
<i>Cryptococcus saitoi</i>	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		

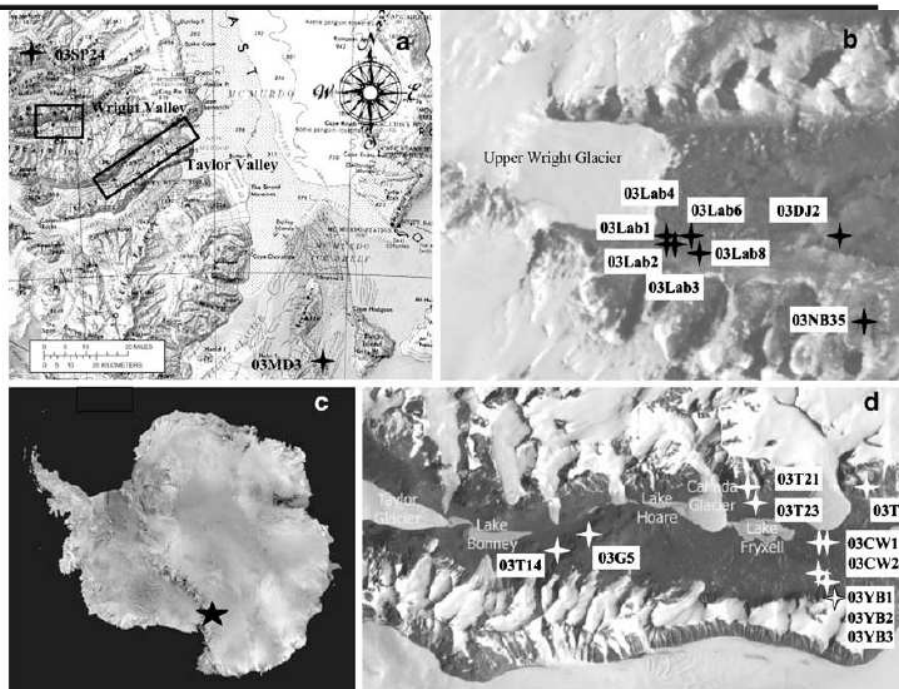


Figure 1 Sample site locations in South Victoria Land, Antarctica (2003–2004). Sites are identified by stars and labels. The entire study area with specific sites 03SP24 and 03MD3 is shown in (a). Sites in Wright Valley are shown in (b) and Taylor Valley in (d). The location of the study area on the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

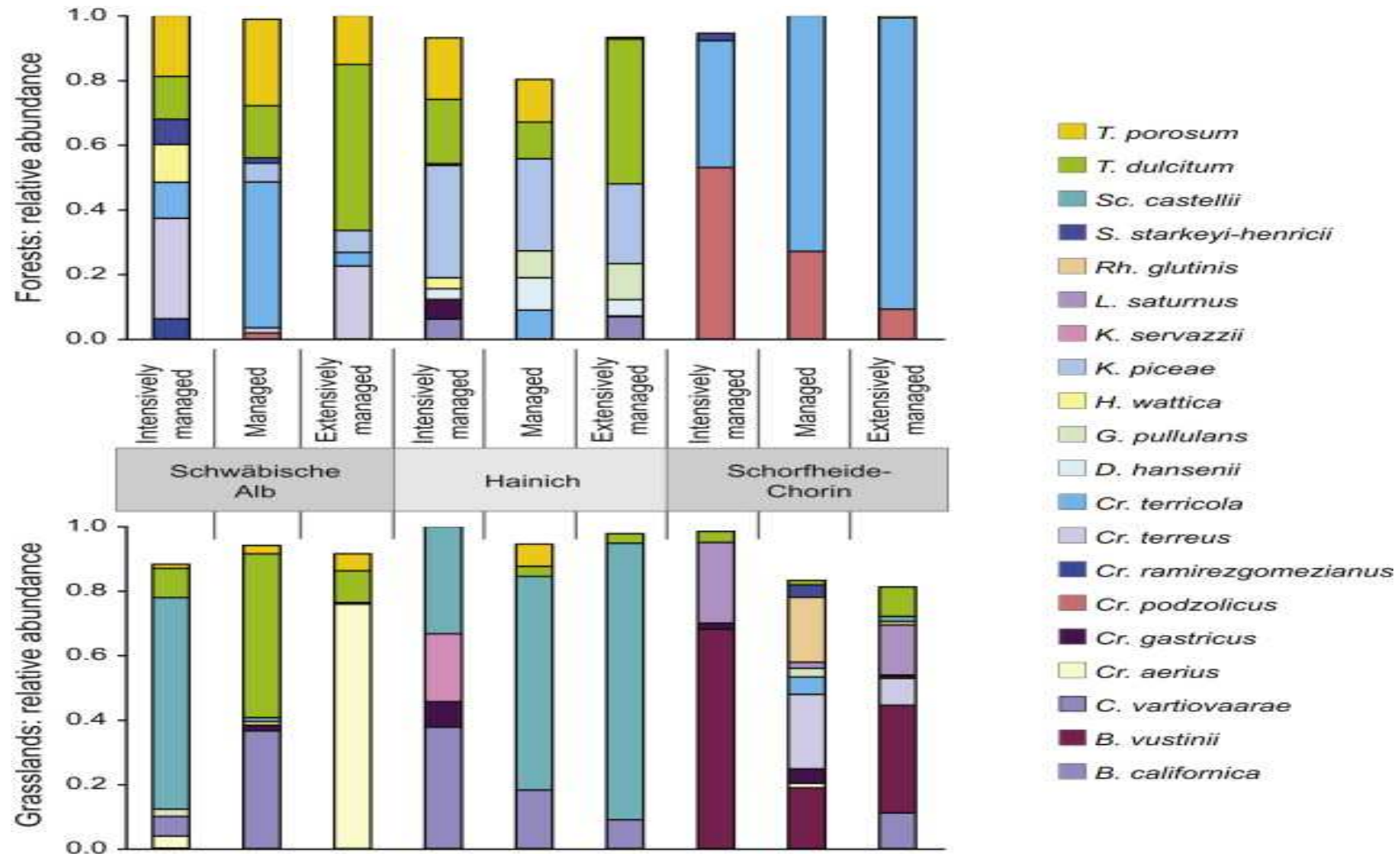
- izolovány 2x asco- a 16x basidiomyceta (7x nové druhy) - basidiomyceta lépe adaptovány na chlad než ascomycota

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



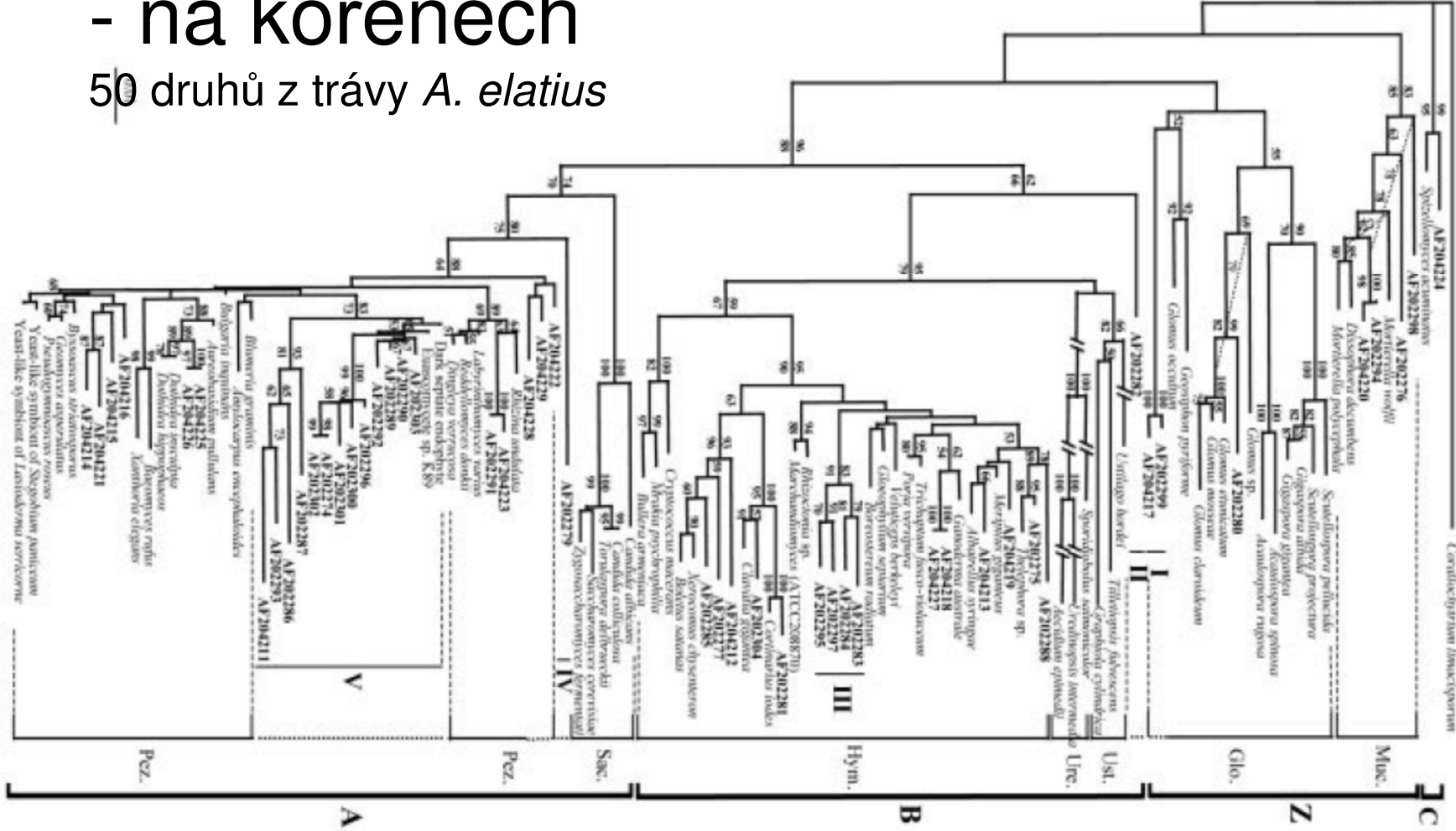


- Nerovnoměrné (komplexní) rozložení kvasinek
- Pokryv půdy má velký vliv na diverzitu a množství půdních kvasinek (lesy x pastviny), stejně tak i lidská činnost (oblasti zemědělsky a lesnický využívané x přirozené)

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

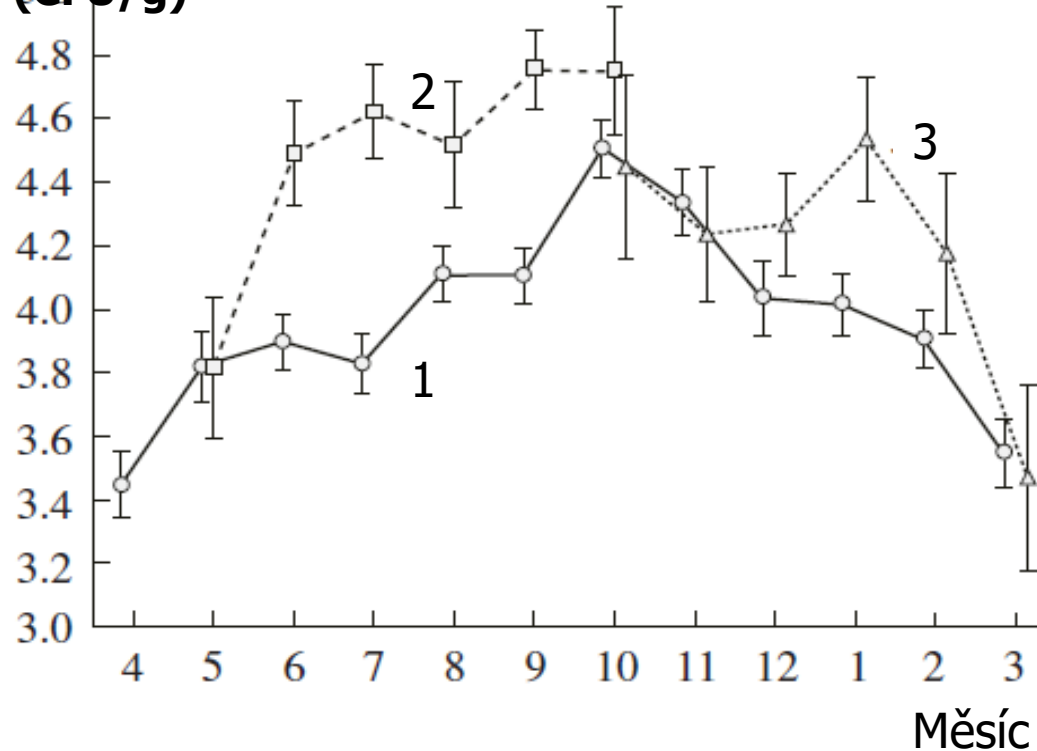
- především na kazících se plodech

(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)



Sezónní dynamika kvasinek

Počet kvasinek, log (CFU/g)



1 – listy
2 – květy
3 – hrabanka

Glushakova & Chernov, Microbiology, 2007

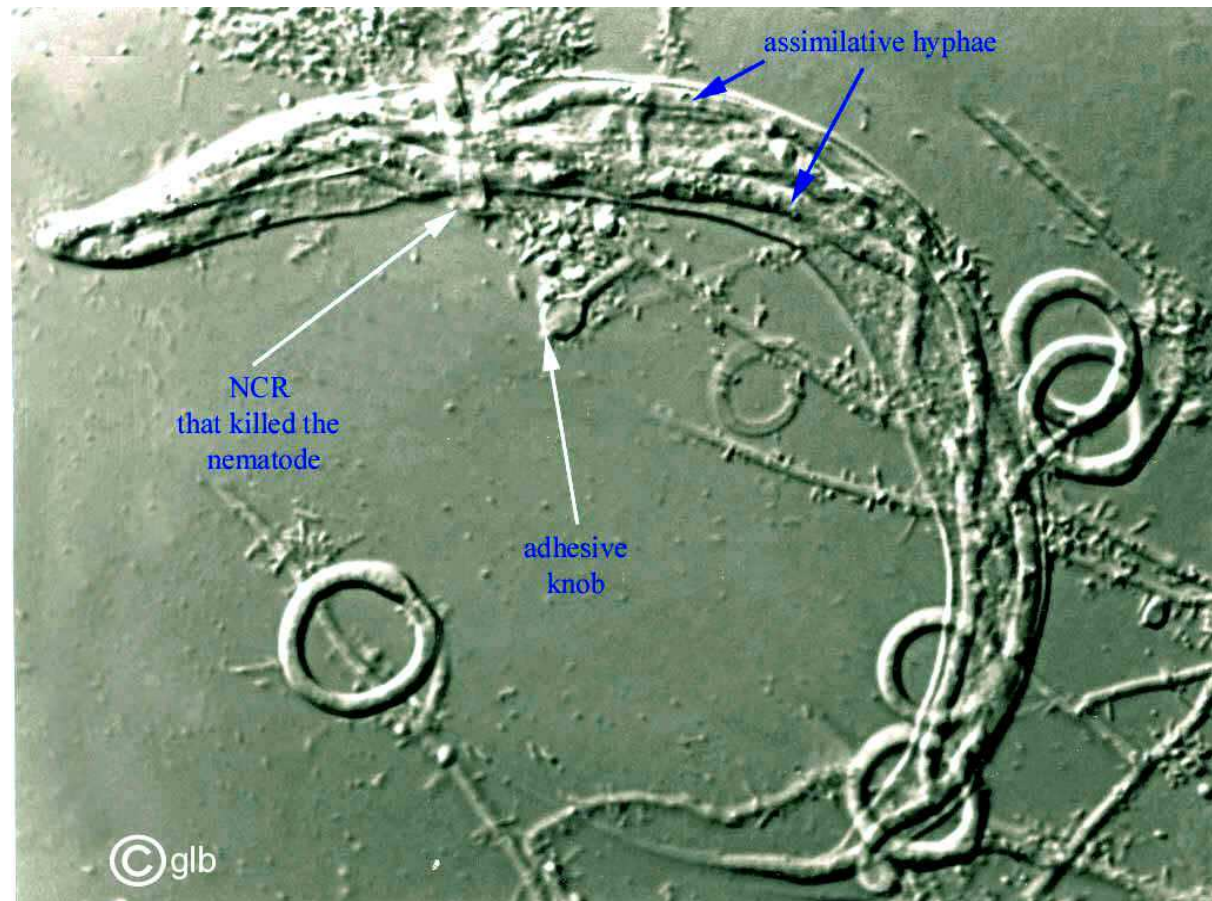
- Rozpouštění nerozpustné fosforečnany ... → podpora růstu kořenů (stimulátory růstu a biohnojiva)
- Symbionti nebo paraziti
- Interakce s houbami
 - Exocelulární polymery (glykolipidy, glykoproteiny) s fungicidními a fungistatickými účinky
 - Extracelulární enzymy (glukanázy)
 - Mykociny (proteiny)

Interakce s živočichy

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

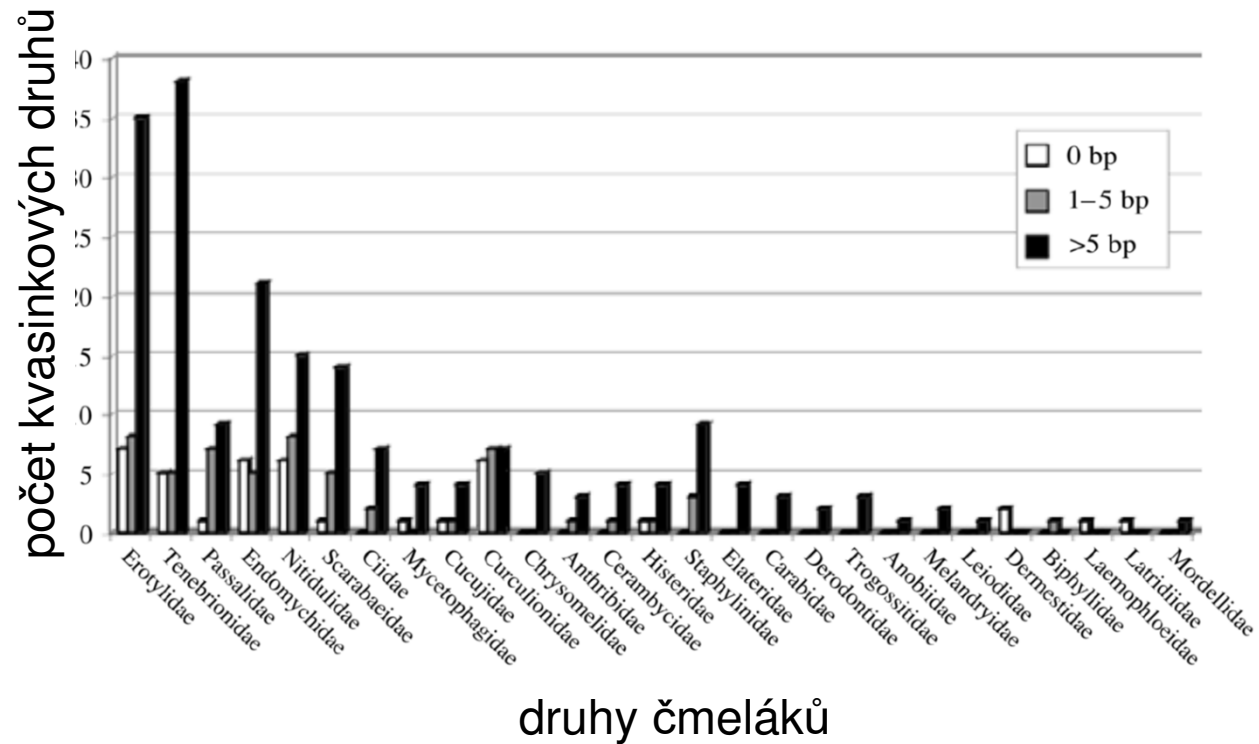


Predátorská kvasinka
(*Dactylellina candida*)
napadající hlístici
(<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/2008/dactylel.htm>)



Hmyz a kvasinky

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



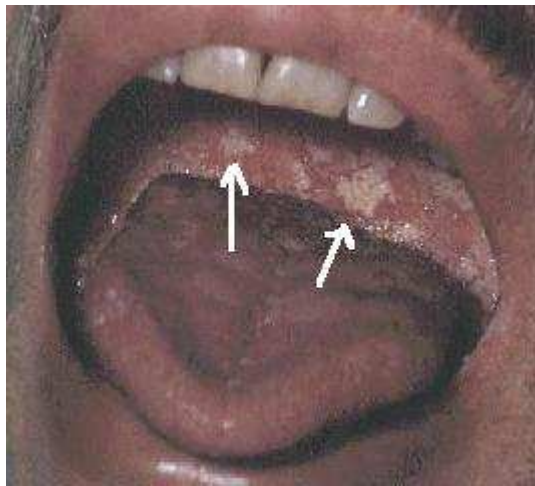
Hmyz a kvasinky

- kvasinky ve střevě mouchy *Drosophila* ...
- askus chrání spory během průchodu trávicím traktem, ale zároveň dochází k částečnému natrávení enzymy, čímž se usnadňuje kontakt mezi nepříbuznými gametami
- bylo zjištěno, že průchod trávicím traktem 10x zvyšuje frekvenci sexuálního rozmnožování s nepříbuznými gametami
- hypotéza: hmyz slouží jako vektor umožňující kvasinkám osidlovat nová prostředí, přičemž zvýšená rekombinace zvyšuje šance na přežití a adaptaci na ně



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 – imunopresiva, cukrovka ... významným faktorem virulence je schopnost tvorby biofilmu - antibiotika na eukaryota nezabírají)

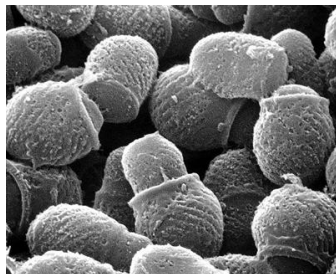
- **Kandidózy** (*C. albicans*, *dublinskiensis*, *krusei*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *glabrata*, *utilis*, *lipolytica*)

- *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)

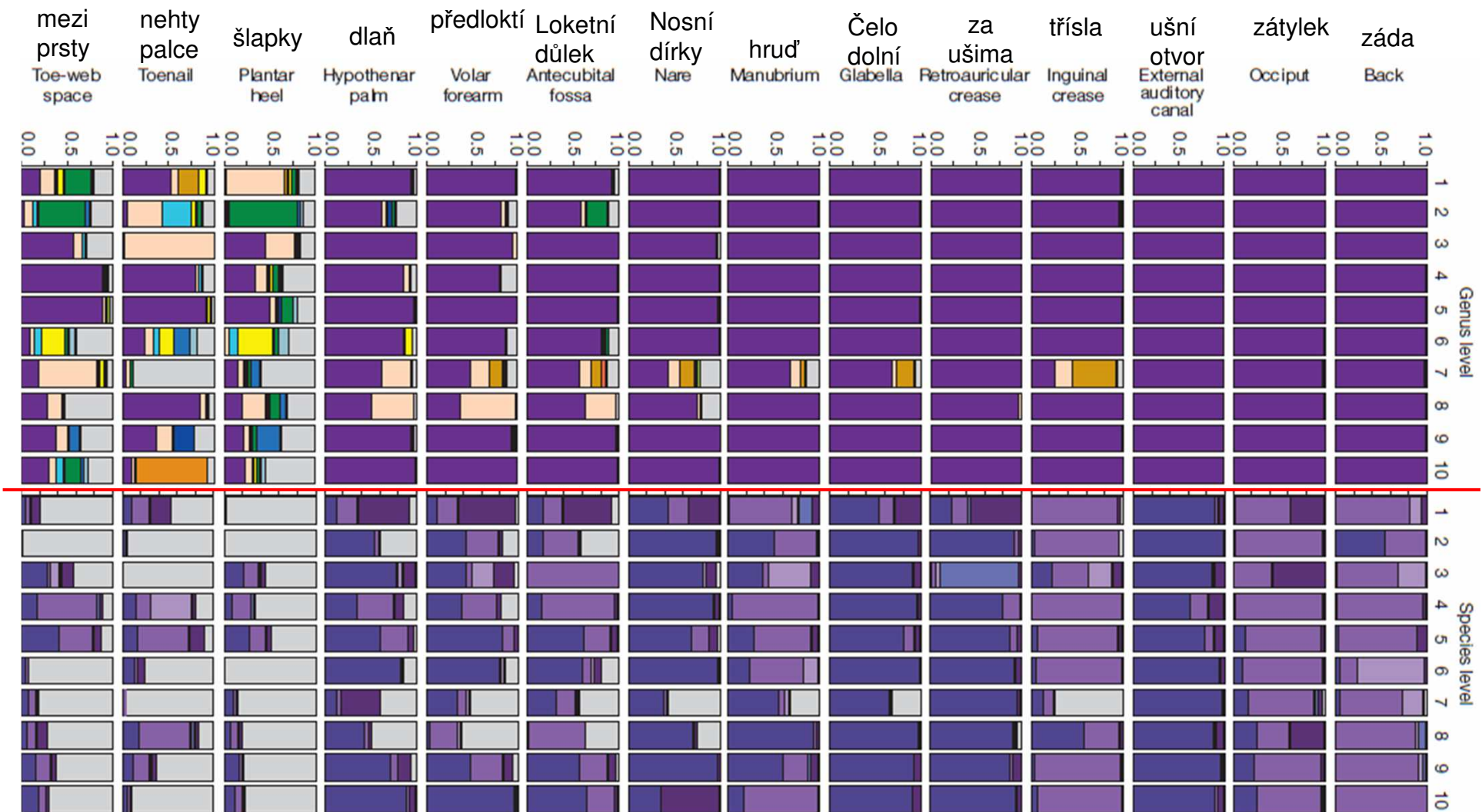
- *Malassezia* – poruchy pigmentace kůže a lupy tzv. **pityriázy** (*M. furfur*, *globosa*, *japonica*, *obtusa*, *restricta*, *yamatoensis*, *dermatis*, *slooffiae*, *sympodialis*, *nana*, *pachydermatis*)

- 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

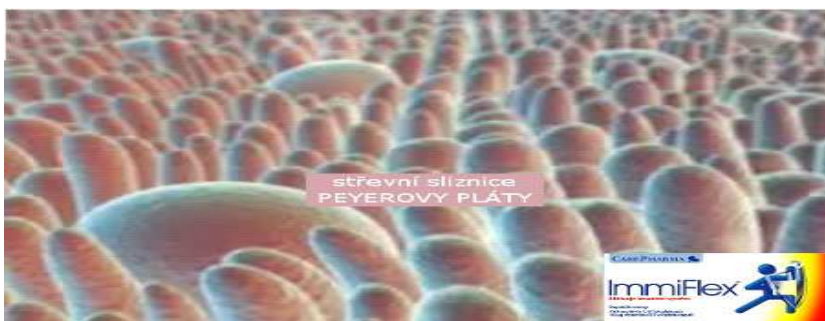
- sekvenace vzorků od 10 zdravých jedinců
- ruce, nos, uši, záda, třísla ... *Malassezia*
- zatímco na nohou velká diverzita

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 (neutrofily) a zvyšují tak obranyschopnost organismu



Murzyn et al., 2010, FEMS Microbiol Lett.



- *Saccharomyces boulardii* – izolován z čínské švestičky Lyči (1920, Henri Boulard) - používán jako probiotikum při střevních potížích (Enterol, Salutil) - ochrana proti patogenům (*Salmonella typhimurium*, *C. albicans*) – modulují imunitní systém, inhibují účinky bakteriálních toxinů a růst hyf ...

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

Význam pro zdraví člověka

The screenshot shows a web browser window displaying the GenScript website. The page is titled "Recombinant Protein Services - YeastHIGH? Yeast Expression System - GenScript - Windows Internet Explorer". The URL in the address bar is http://www.genscript.com/custom_protein_yeast_expression.html?src=email2013123137&logId=68148090&email=&brandId=&type=&c=1&ret=true. The website features a navigation menu with links for Home, Services, Products, Resources, Promotions, and Company. A sidebar on the left lists various protein services, including Key Technologies for Protein Expression and Purification, BacPower™, PROtential Protein Expression Evaluation Services, InsectPower™, Bacterial Expression System, Yeast Expression System, Insect Expression System, Mammalian Cell Expression, Chemical Protein Synthesis, High-throughput Protein Variants Service, Kinase Activity Assay, Structural Biology Services, Large Scale Protein Production Service, ProtBank™ Protein Database, and Case Studies. The main content area highlights the YeastHIGH™ Yeast Expression System, described as an economic solution for eukaryotic protein production. It lists key features: Proprietary YeastHIGH™ technology, Advanced platform for producing humanized antibodies, and Large-scale eukaryotic protein production, up to 500 L. A "Get a Quote Now" button is visible, along with a "SHARE" button. The footer of the browser window shows the Windows taskbar with the Start button and several open applications, including "Doručená pošta - Mo...", "Psaní zprávy: Re: pre...", "Psaní zprávy: Re: Po...", "slovník.cz - Multilingu...", "Recombinant Protein ...", and "Dílčí zpráva 140113.d...". The system clock shows 7:04.

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

Průmyslový význam



- 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)

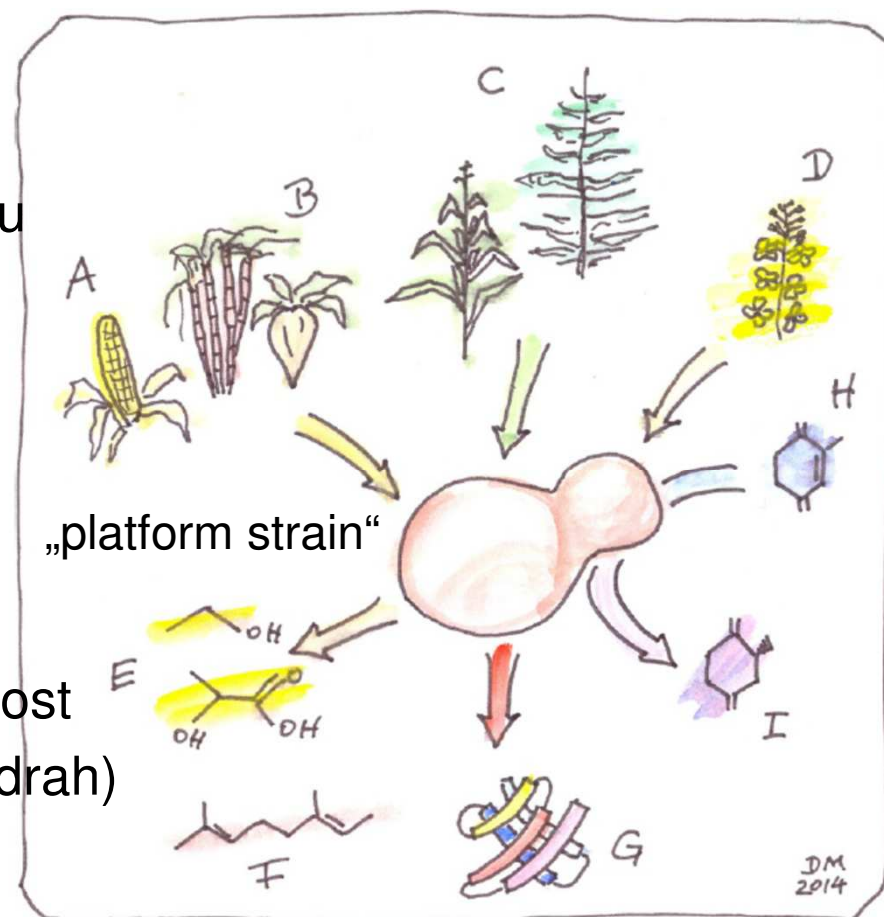
Kov	Biosorpční kapacita (mg kovu/g suché hmotnosti biomasy)
Zn ²⁺	<i>A.nodosum</i> (25.6)> <i>P. chrysogenum</i> > (19.2)> <i>F. vesiculosus</i> (17.3)> aktivovaný kal(9,7)> <i>S. rimosus</i> (6.63)> <i>S. cerevisiae</i> (3.45)
Cu ²⁺	<i>S. rimosus</i> (9.07)> <i>P. chrysogenum</i> (8.62)> <i>F. vesiculosus</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)

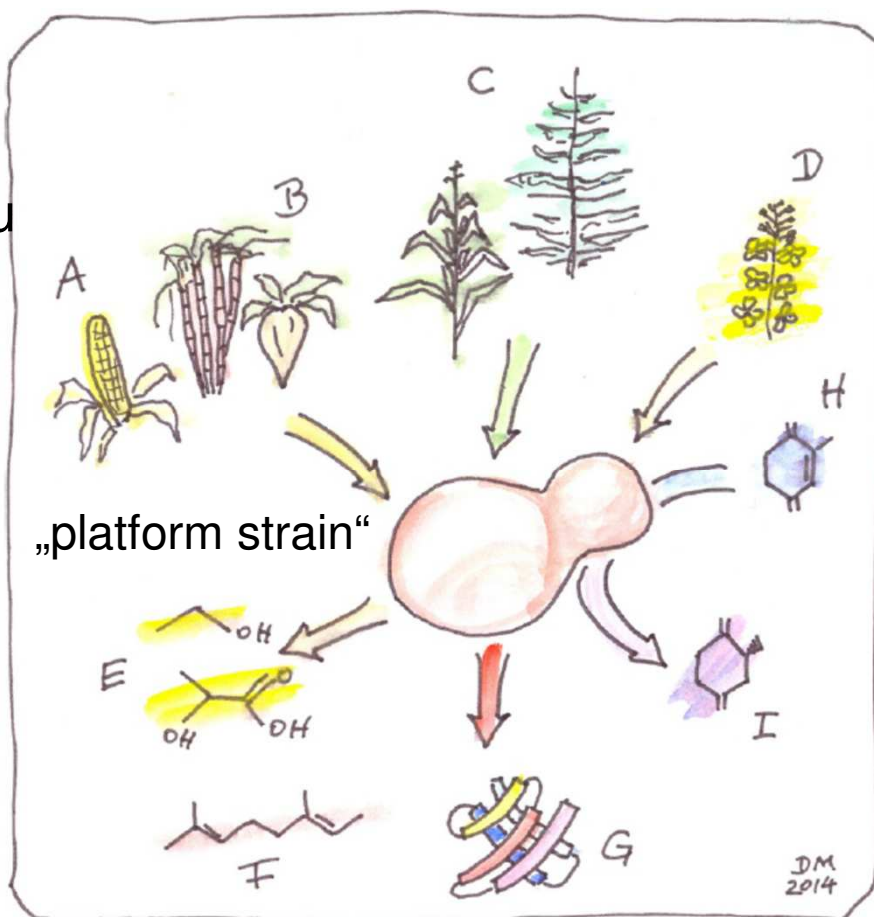


- kvasinky byly po tisíciletí mikroorganismem mnoha „biotechnologií“
- v polovině 20. století nástup bakteriálních technologií
- kvasinky (díky detailnímu poznání ...) opět nabývají na významu: produkce metabolitů, produkce rekombinantních proteinů, *in vivo* biotransformace
- *S. cerevisiae* – hlavní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

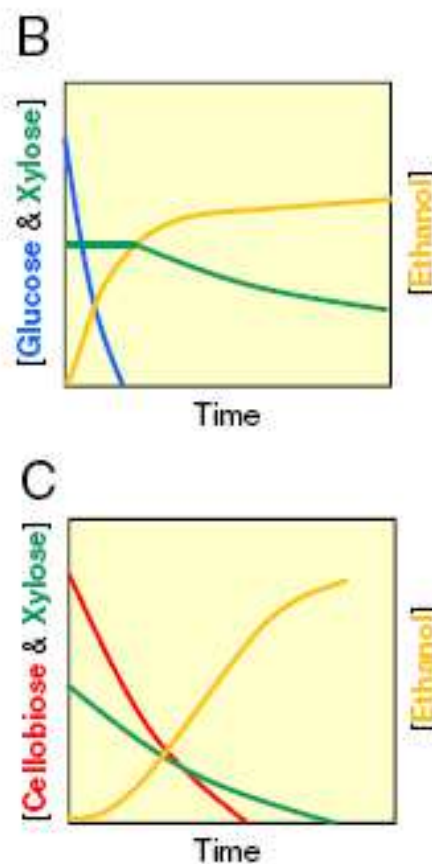
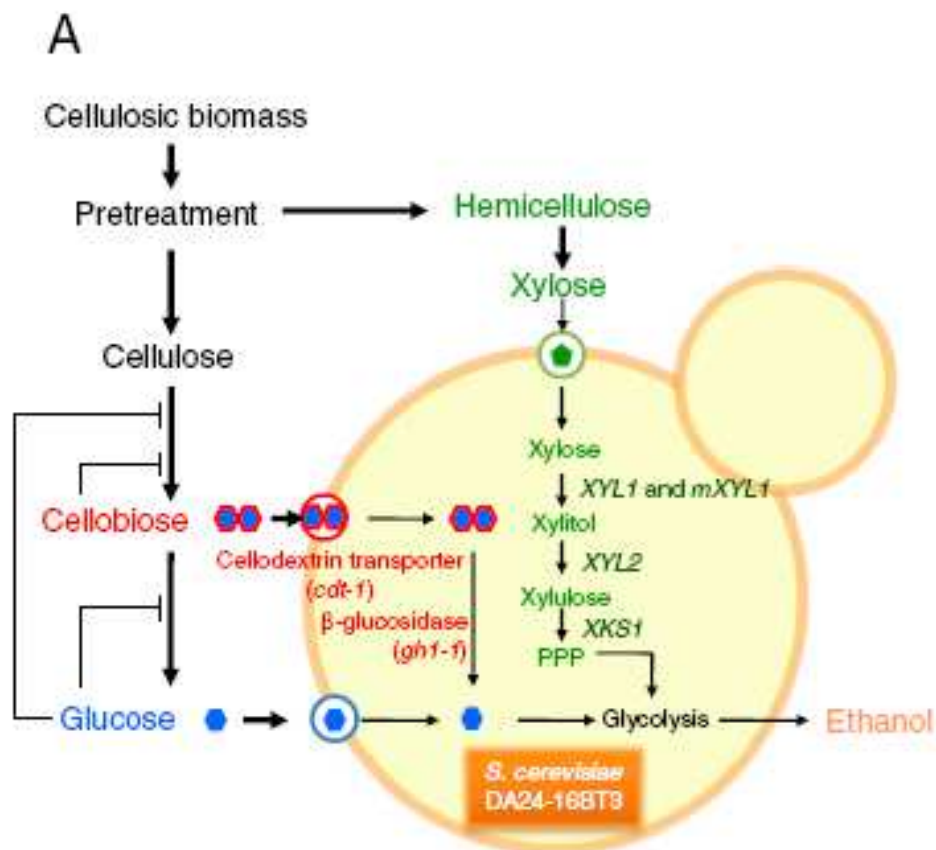
Pichia pastoris (syn. *Komagataella pastoris*), *Hansenula polymorpha* (syn. *Ogataea parapolyomorpha*),
Yarrowia lipolytica, *Pichia stipitis* (syn. *Scheffersomyces stipitis*),
Kluyveromyces marxianus

Mattanovich et al, Microbiol Cell Factories, 2014



Využití *S. cerevisiae* pro výrobu biopaliv

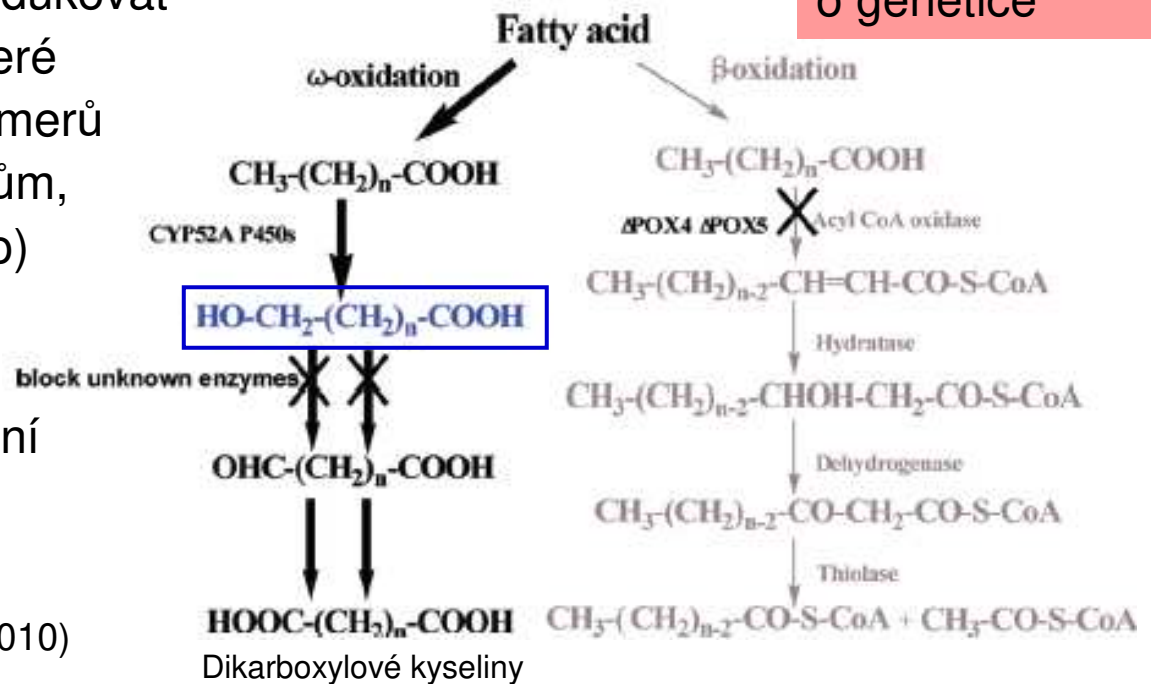
- Nemají přirozenou metabolickou dráhu pro odbourání celobiosy a xylozy
- Vloženy geny *XYL1* and *XYL2* kódující xylózovou reduktázu (XR) a xylitolovou dehydrogenázu (XDH) z kvasinky *Pichia stipitis*
- Přednostní využívání glukózy (*glukózová represe v dalších přednáškách*)
- Transport celobiosy do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



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 ...

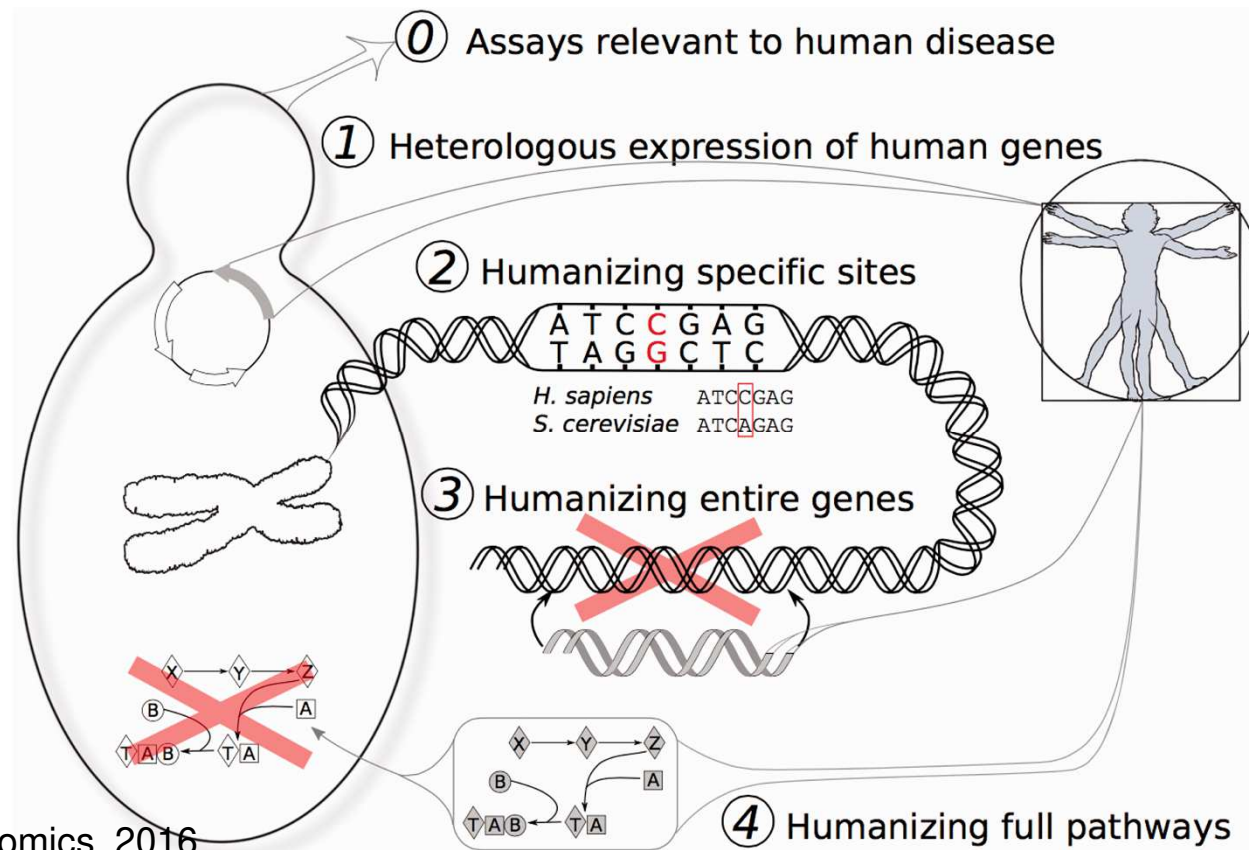
Přednáška
o genetice



Lu et al., JACS (2010)

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.

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.

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 kvasinek (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

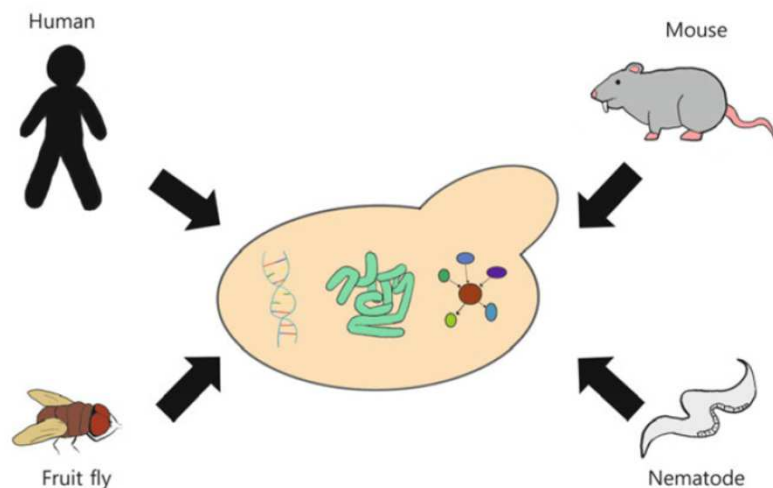


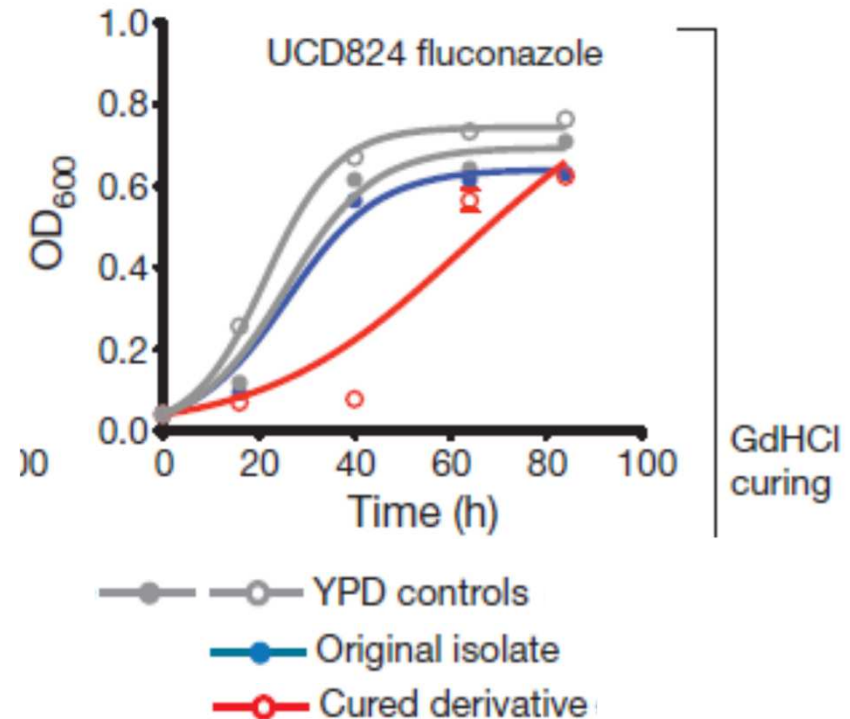
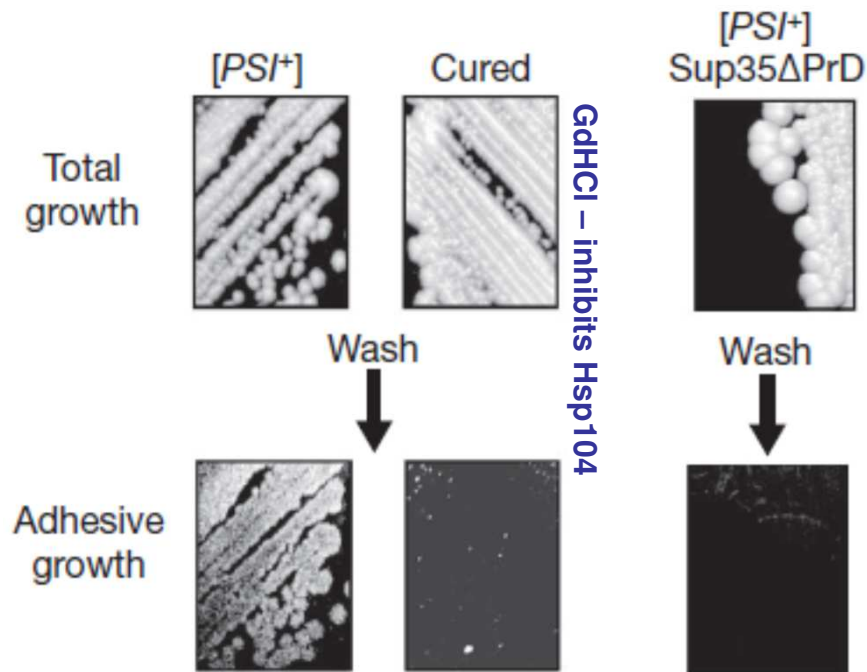
Table 4 *Schizosaccharomyces pombe* genes related to h

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)

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)

