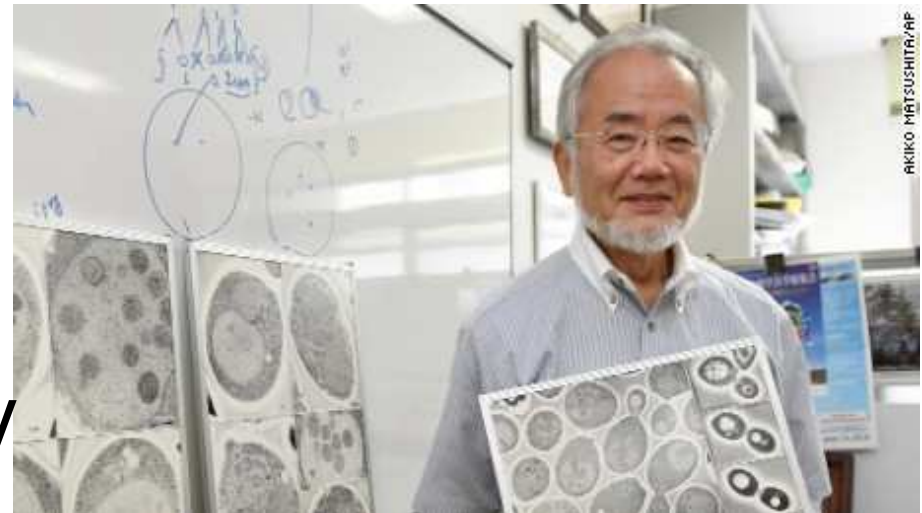


26.09.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Úvod – historie a význam
03.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	základní charakteristiky a metody
10.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
17.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Mitochondrie, chromosomy
24.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
31.10.2024	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
07.11.2024	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
14.11.2024	8-9.30hod	C02-211	Dr. Špirek	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
21.11.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
28.11.2024	8-9.30hod	C02-211	Doc. Paleček	Organizace a evoluce genomu kvasinek
05.12.2024?	9-12hod	C02-211	Doc. Paleček	test + předtermín zkoušky
12. a 13.12.2024?	8-12hod	B07-2.17	Paleček+Špirek	Cvičení k přednáškám

Pozor změna termínů cvičení a testů (oproti 1. přednášce)

Osnova 2. přednášky

- Základní charakteristiky kvasinek
 - Taxonomie, evoluce
 - Podmínky růstu, růstové formy, sporulace ...
- Morfologie buněk, kolonií ... sekrece
 - Amoniak
 - Aglutininy, flokulace
 - Adhesiny, invasiny
 - Killer toxiny
- Diagnostické metody
- Analytické metody



Srovnání mikroorganismů

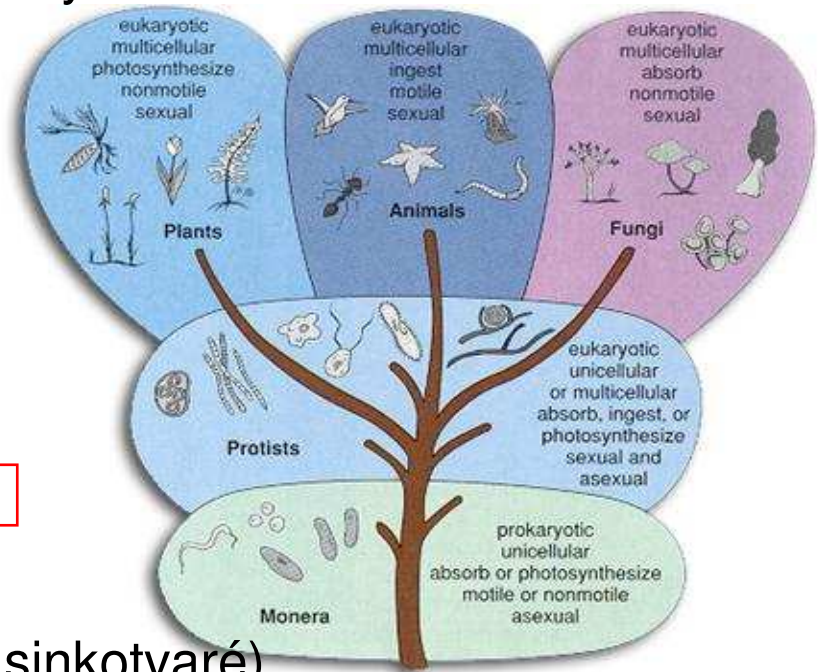
Mikroskopické jednobuněčné organizmy ...

	Bakterie	Kvasinka
Četnost v lidském mikrobiomu	99%	<1%
Velikost buňky	1um	10um
Buněčná stěna	peptidoglykan, LPS, LTA	chitin, mannan (PPM, PLM), glukán
pH	6,5-7,5	4,5-6,5
Teplota	10-80	20-30
Rezistence na antibiotika	Ne	Ano
Přenos genetického materiálu	Ano	Ne
Jádro	Ne	Ano

LPS – lipopolysacharid, LTA – lipoteichoová kyselina
PPM – fosfopeptidomannan, PLM - fosfolipomannan

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 [vřeckovýtrusné](#) nebo [stopkovýtrusné](#) (asko-, basidio- a deuteromycetes + kvasinkové mikroorganismy)
- 1500 identifikovaných (odhad o několik řádů vyšší)



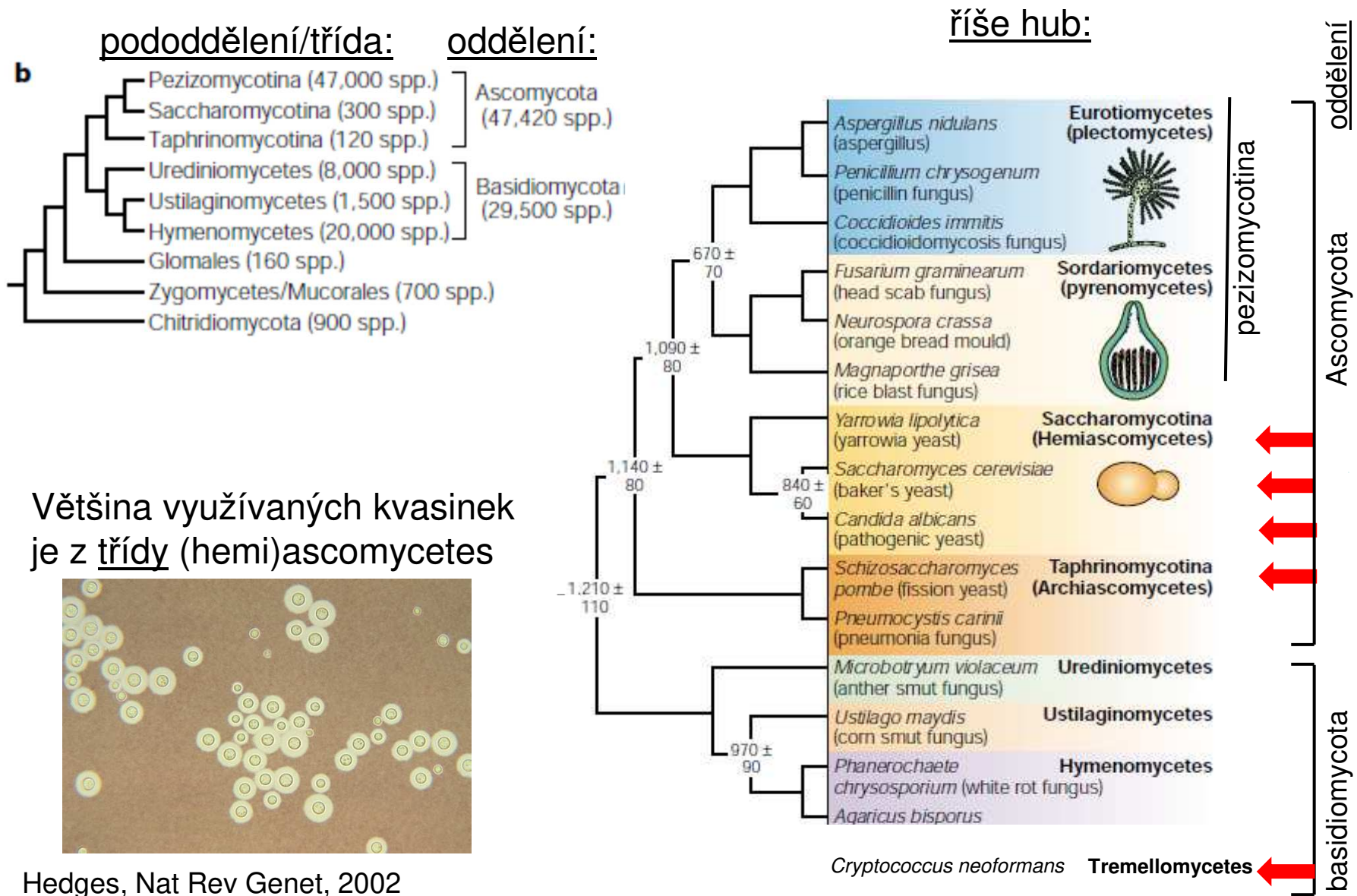
Saccharomyces cerevisiae:

- 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

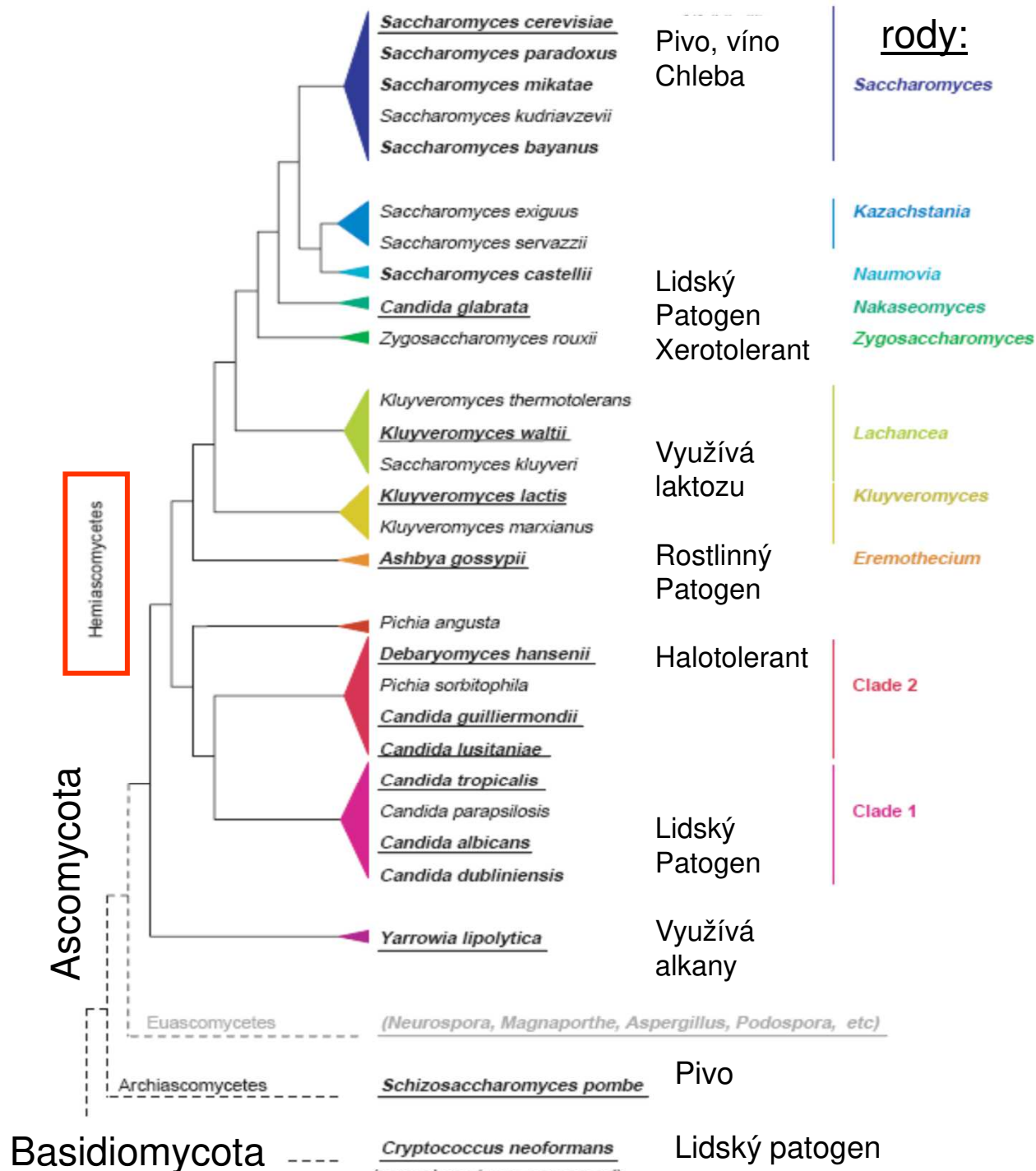
Kvasinky netvoří žádnou přirozenou taxonomickou skupinu - jsou roztroušeny ve dvou odděleních hub, buď jako houby vřeckovýtrusé nebo stopkovýtrusé



Taxonomie kvasinek

Většina rodů využívaných kvasinek je z třídy (hemi)ascomycetes

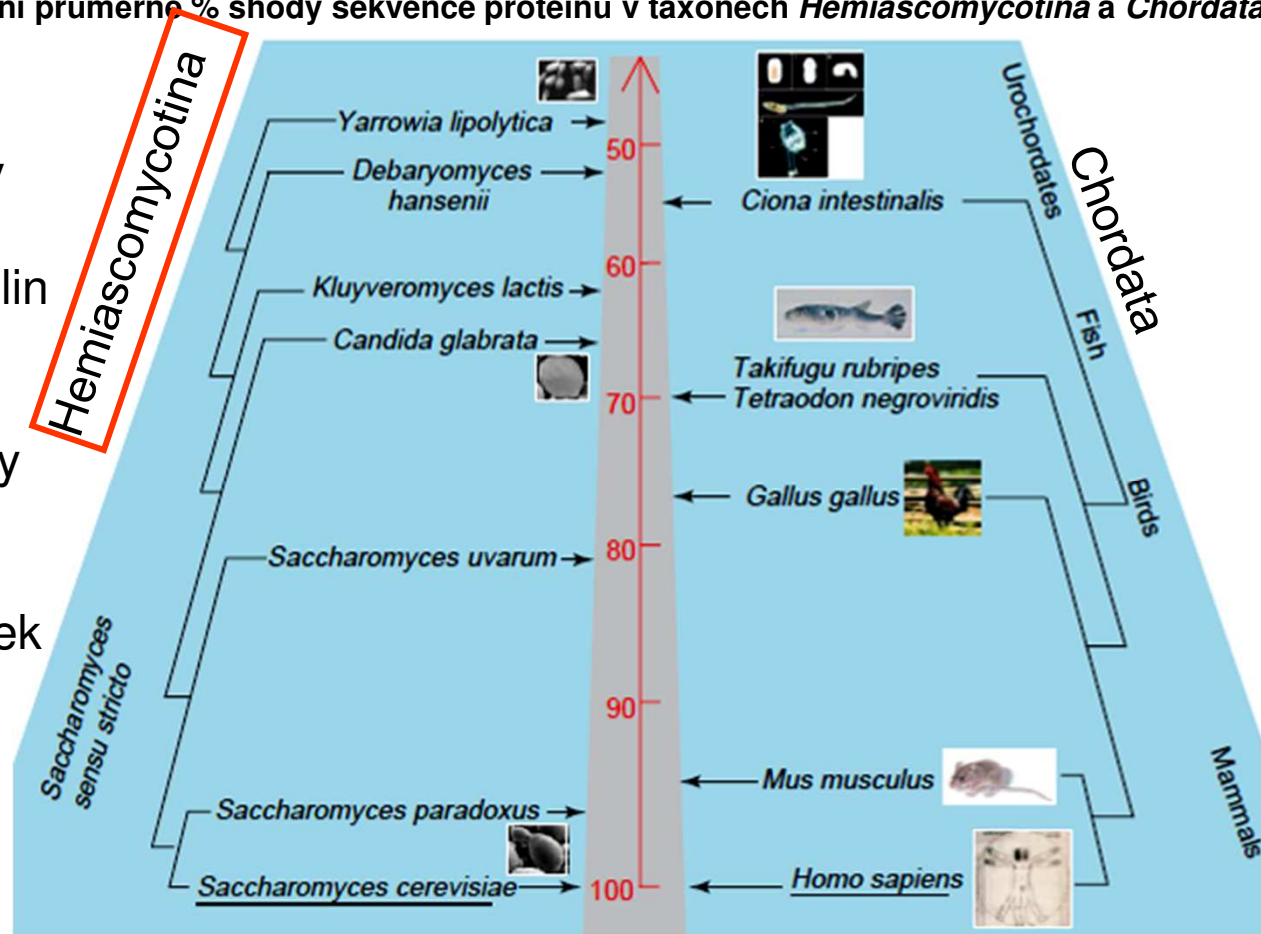
mezidruhová vzdálenost



Srovnání průměrné % shody sekvence proteinů v taxonech *Hemiascomycotina* a *Chordata*

Vychází převážně z analýzy rDNA; nověji srovnáním rozdílů sekvencí aminokyselin v ortologních proteinech. Přes velkou morfologickou podobnost vykazují kvasinky velké rozdíly v genomech

Genomy (sekvence) kvasinek ze vzdálenějších větví fylogenetického stromu se srovnávají těžko



% odlišnost sekvence proteinů:

Dujon, TiG, 2006

- *S. cerevisiae* a *C. glabrata* ~ člověk a ryba
- mezi druhy *S. sensu stricto* ~ mezi řády savců
- proteiny člověka a hlodavců jsou si více podobné (lze rekonstruovat změny, jimiž genomy během evoluce od společného předka prošly) než proteiny druhů ze skupiny *sensu stricto*, mezi nimiž mohou vznikat životaschopné hybridy!

rozdíl mezi *S.c.* a *S.p.* je cca 300MYA

Potřebují vodné prostředí, kyslík a živiny

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



Debaryomyces hansenii

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

Podmínky růstu - kyslík

- Většina kvasinek je **obligatorně aerobní** (vyžadují aspoň stopová množství kyslíku nezbytného pro syntézu některých esenciálních metabolitů – ergosterol, nenasycené mastné kyseliny)
 - fermentativní typy (*Saccharomyces c.*, *S. p.*) – pro fermentaci jsou vhodnější anaerobní podmínky, ale *S.c.* i v aerobních podmínkách fermentují
 - respirativní typy – převládá energeticky výhodnější respirace nad fermentací - nefermentativní typy (nemají alkoholdehydrogenázu - neprodukuje ethanol) – rody *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Saccharomycopsis*
- teploty, při nichž mohou kvasinky růst:
 - **mezofilní** (0 – 48 °C) – většina druhů
 - **psychofilní** (-2 – 20 °C) – voda, půda v Antarktidě (některé *Leucosporidium*, *Cryptococcus*)
 - **termofilní** (ne méně než 20 °C) – potenciální patogeny (*Candida*, *Cyniclomyces*)

Maximální teploty, které (některé) kvasinky přežívají, se pohybují kolem 57-59 °C
Laboratorní podmínky 25-30 °C (*S.c.* i *S.p.* – rostou i při 15°C a přežívají krátkodobě 50°C),

teplotně senzitivní mutanty (ts, 37°C), chladově senzitivní mutanty (cs, 20°C)

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:

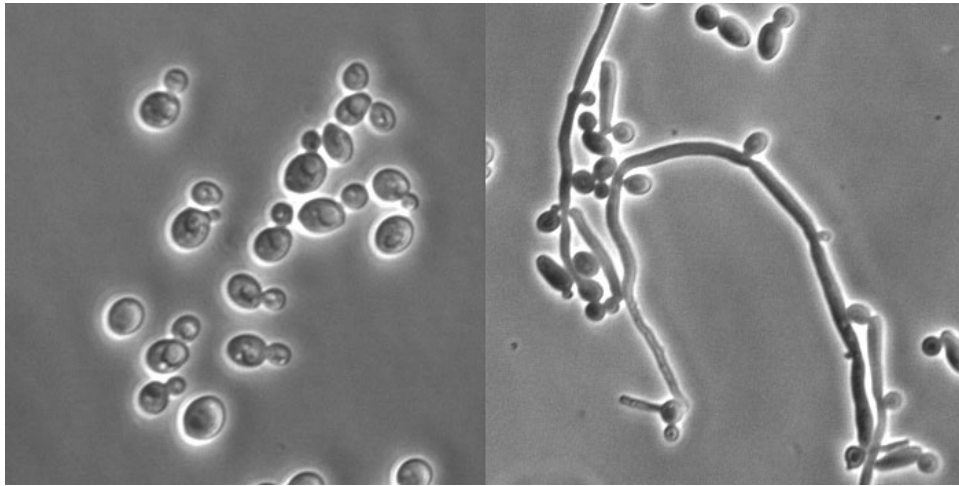
YPD/YES – bohaté médium = 10g/l yeast extract, 20g/l pepton, 20g/l dextrose (2%glukosa)/ *S. pombe* supplements: A, U, H, L, K

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

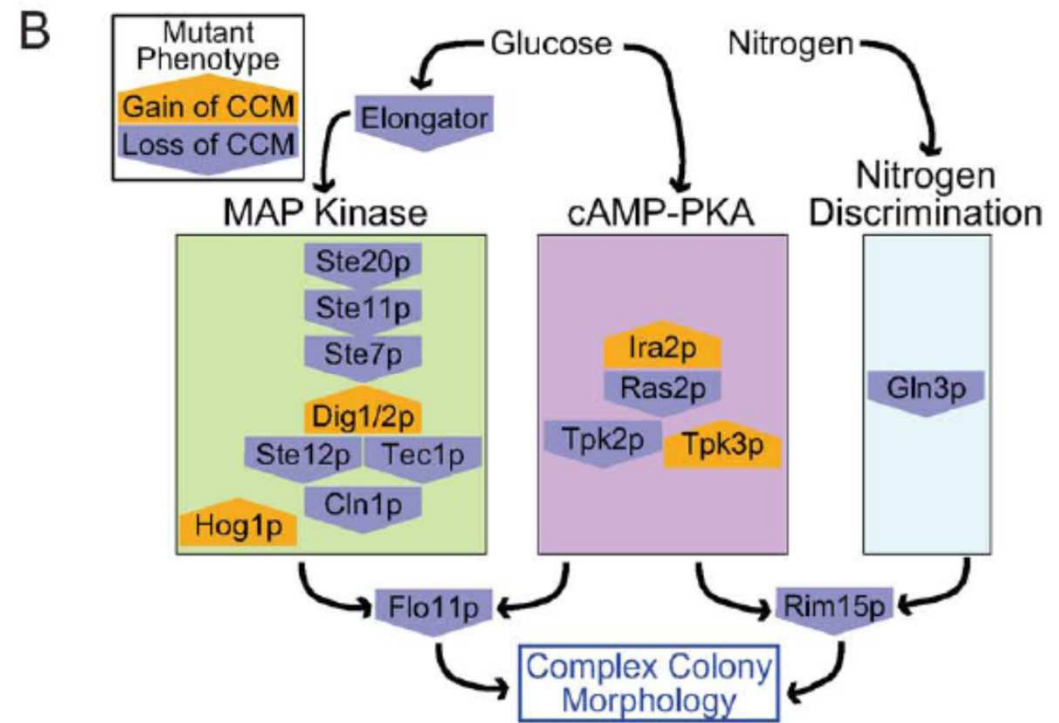
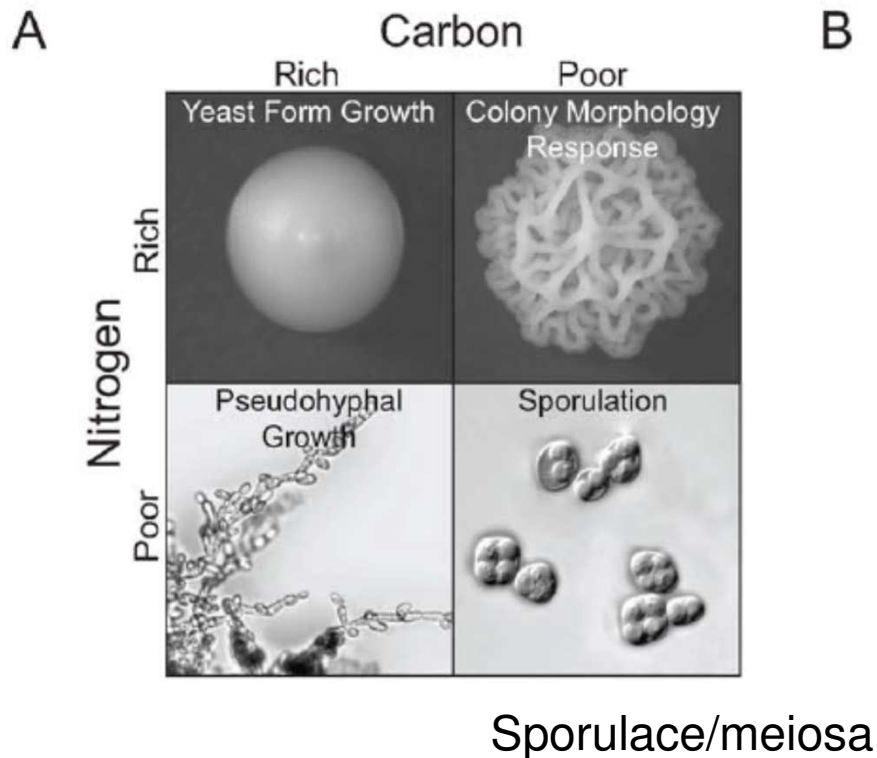
Syntetické SD médium = 6.7g/l yeast nitrogen base w/o amino acids (aminokyseliny se přidávají dle potřeby), 20g/l dextrose (2% glukosa) – např. SD-L,T pro Y2H systém

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



CCM = complex colony morphology

Kvasinková forma - morfologie

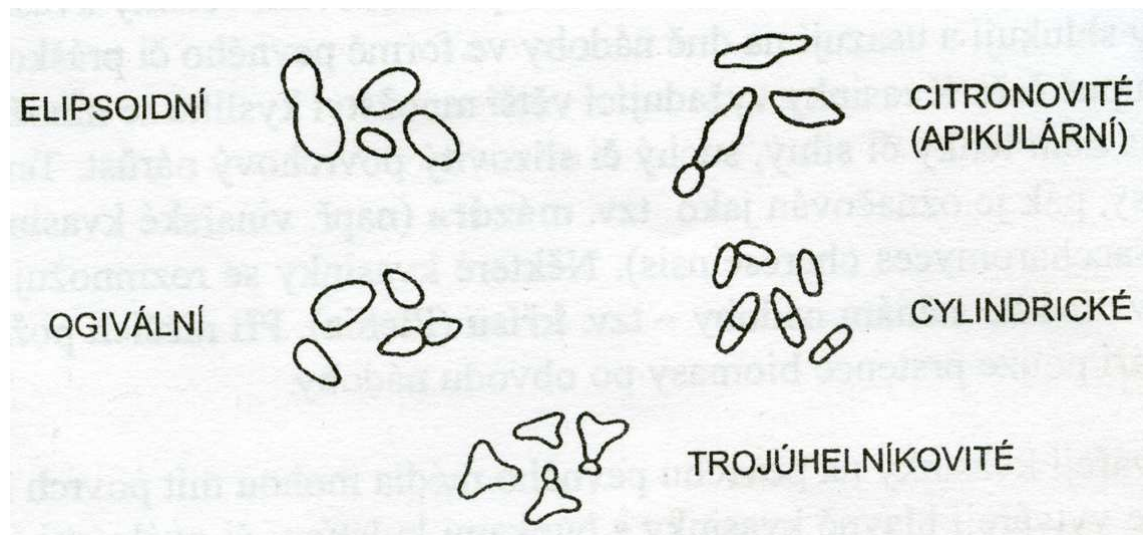
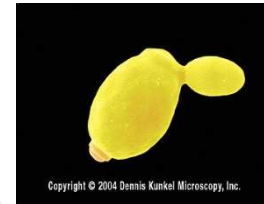
- za běžných podmínek (bohaté C i N zdroje) převládá kvasinková f.
- rotační elipsoid, kulaté, protáhlé – rod *Dipodascus* až 130 mikrometrů
- 3-15 mikrometrů (bakterie < kvasinky < savčí buňky)
- u jednoho druhu (haploidní < diploidní < polyploidní)

<https://vimeo.com/14316828>



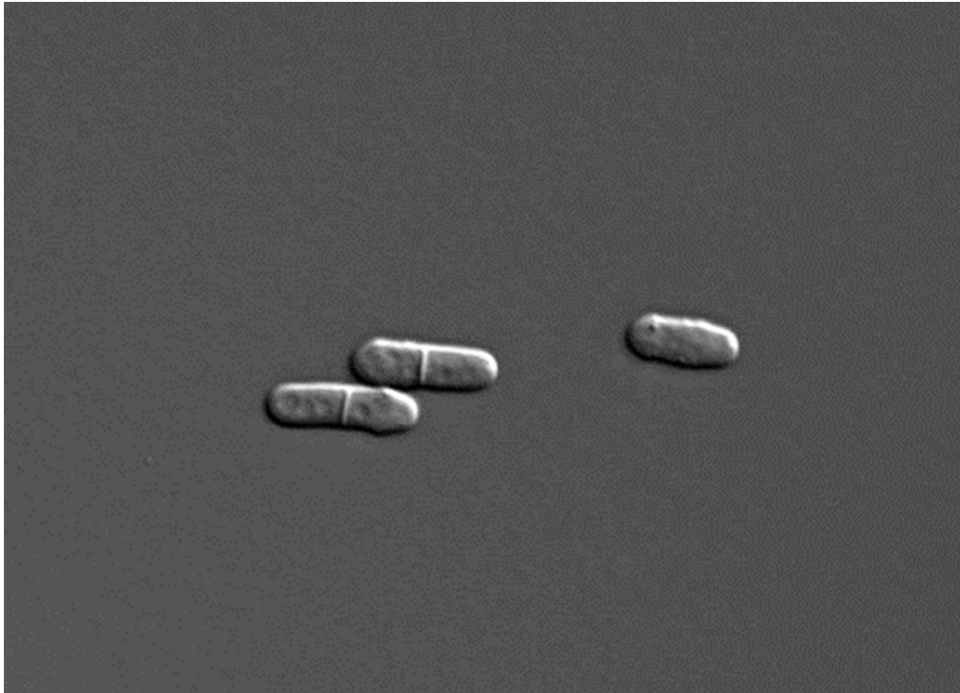
Kvasinková forma - morfologie

- 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

- *Schizosaccharomces* přehrádečné dělení



haploid



diploid

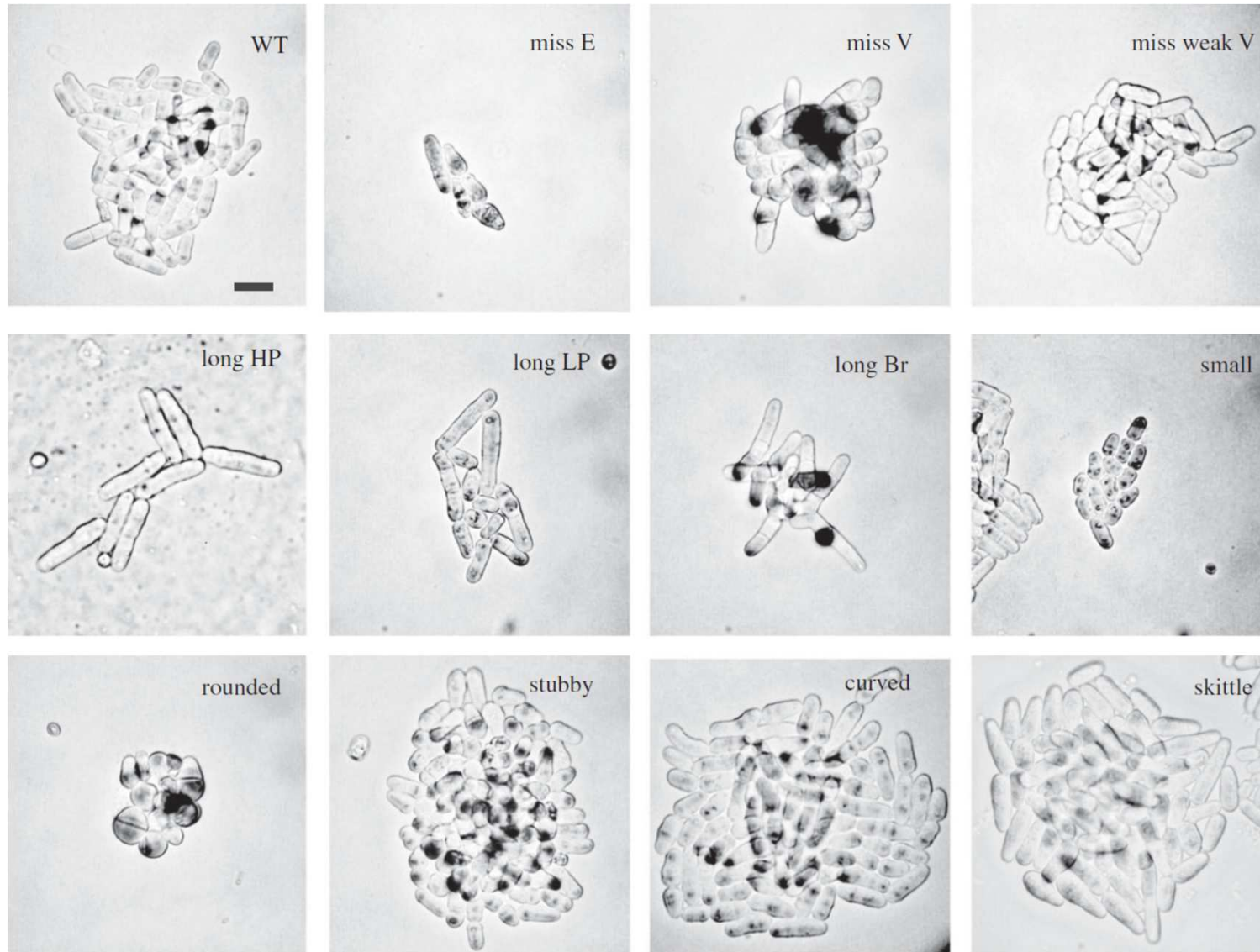
haploidní < diploidní < ...

Hoffmann a spol., Genetics, 2015

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

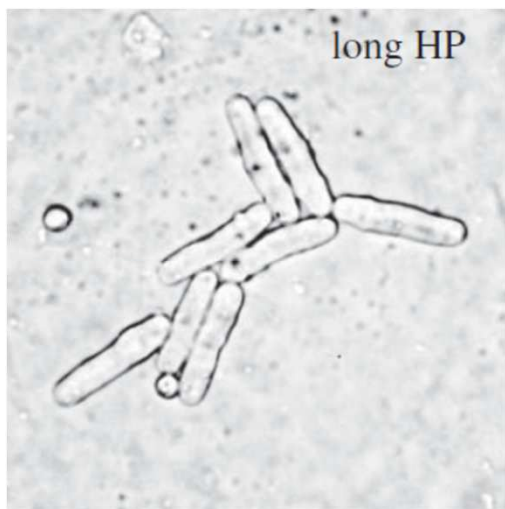
Kvasinková forma - morfologie

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

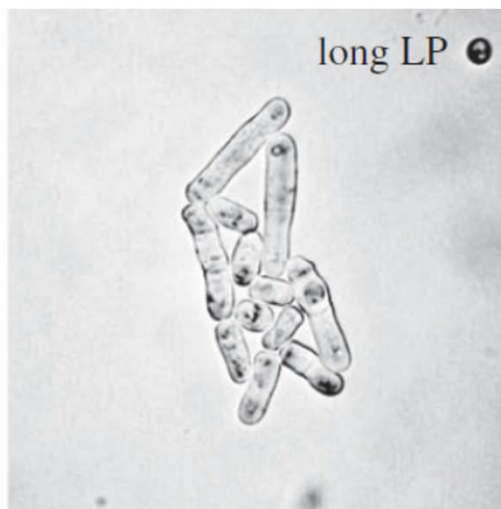


Kvasinková forma - morfologie

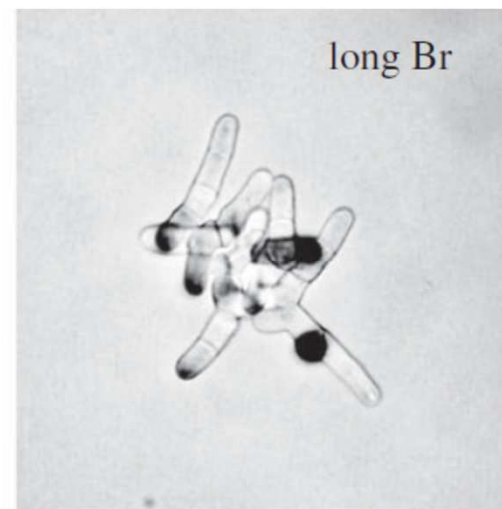
visuální analýza kvasinek deleční knihovny ~3500 kmenů (1. genome-wide)
- např. delece genů regulujících buněčný cyklus *S. pombe* způsobovaly protažený tvar buněk (buňky pokračovaly v růstu, přestože byl buněčný cyklus/mitoza defektní – v důsledku delece genu x)



replikace & transkripce
(spliceing, MCM,
biogenese nukleotidů)



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



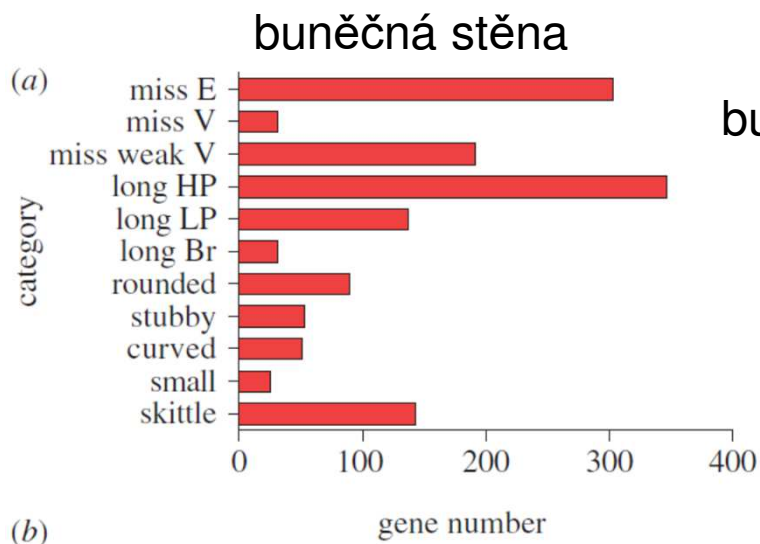
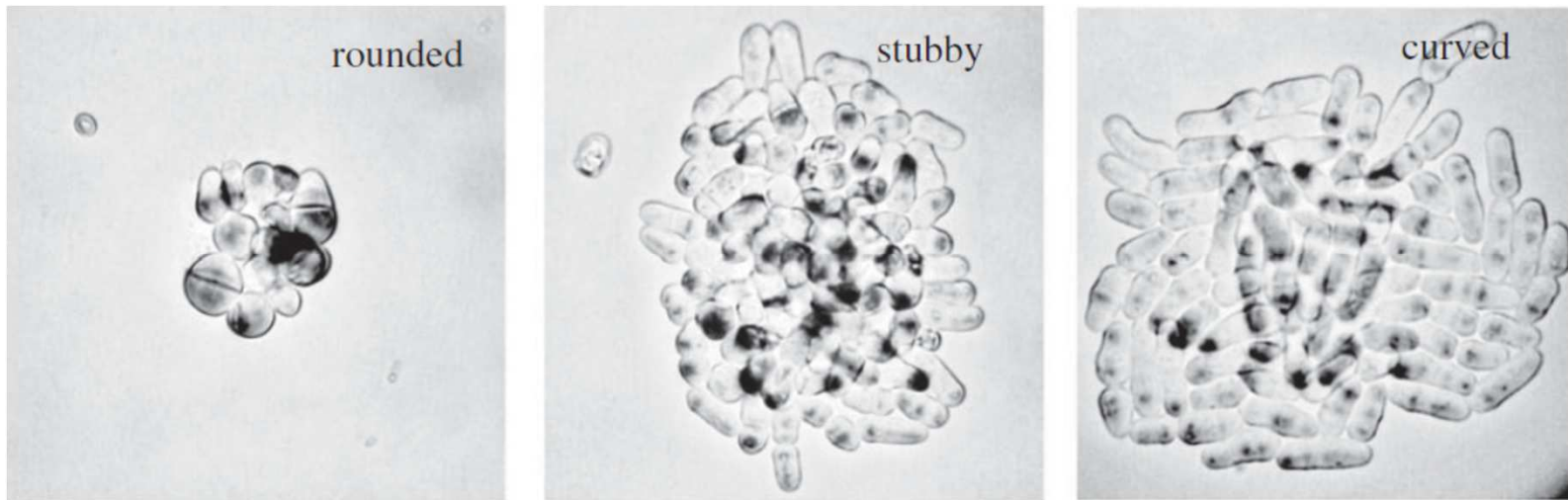
cytokinese & transkripce
(RNA pol, mediator, SAGA)

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

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

Kvasinková forma - morfologie

visuální analýza kvasinek deleční knihovny ~3500 kmenů (1. genome-wide)
 - např. delece genů regulujících buněčnou polaritu *S. pombe* způsobovaly oválný tvar buněk



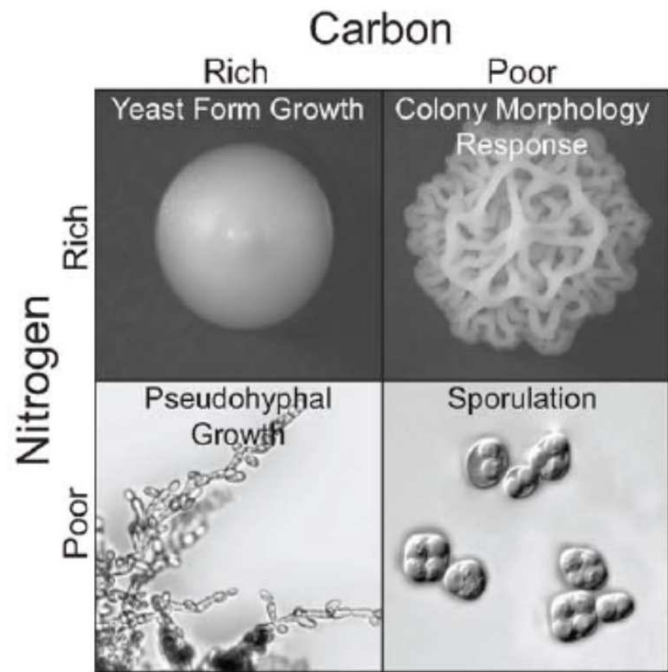
buněčná stěna a aktin
 krátké/tlusté

mikrotubuly

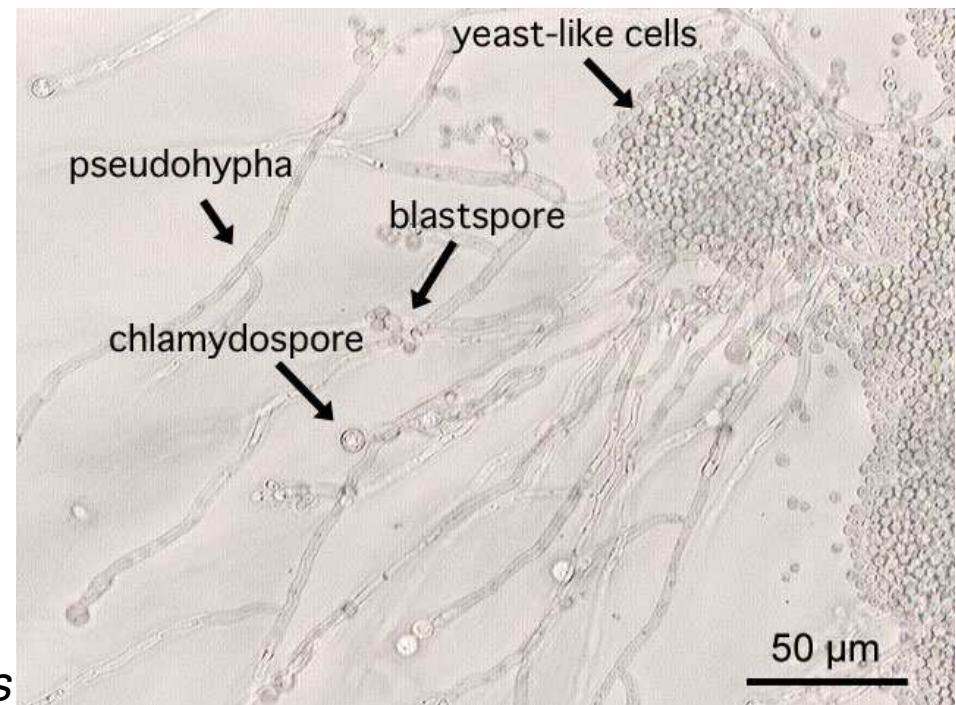
morfologii kvasinek určují různé procesy:
 cytoskelet ... (více v dalších přednáškách)

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)
- na koncích (i mezi buňkami) mohou vznikat **spory** (blastospory), které se dále množí pučením (odlišení *C. albicans* od *C. dubliniensis*)
- **chlamydo-spory** – kulaté, silnostěnné, na koncích nebo po stranách hyf – spory nevykazují tak vysokou odolnost jako u bakterií



Candida albicans



Spory

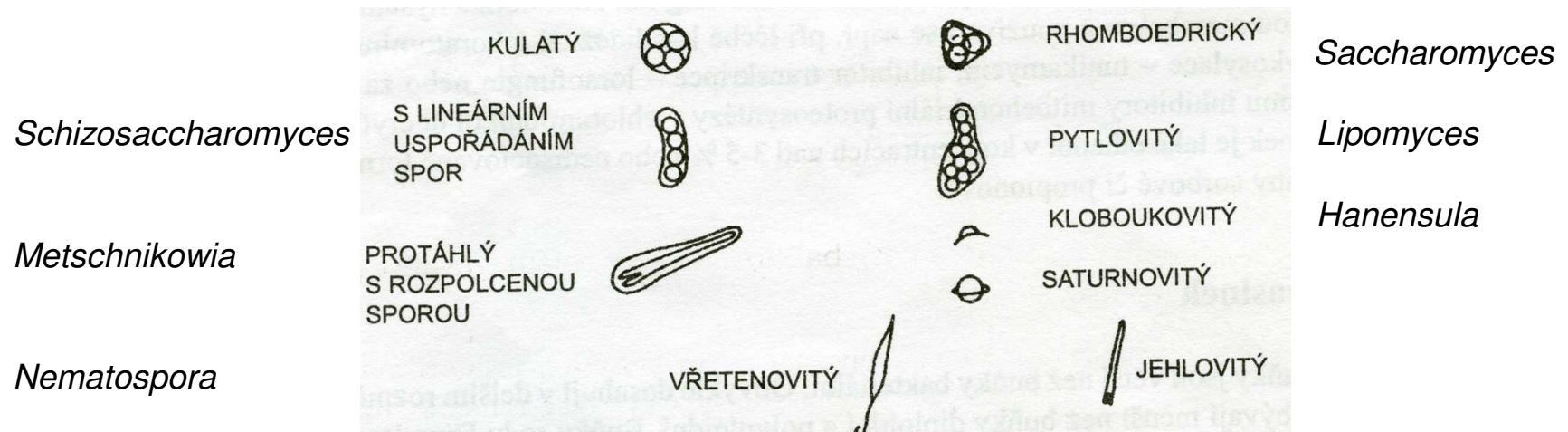
- při nedostatku dusíku v kombinaci s ne-fermentovatelným uhlíkatým zdrojem dochází k indukci meiosis a sporulace

C. dubliniensis:
nadbytek
chlamydospor na
koncích krátkých
pseudohyf



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

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



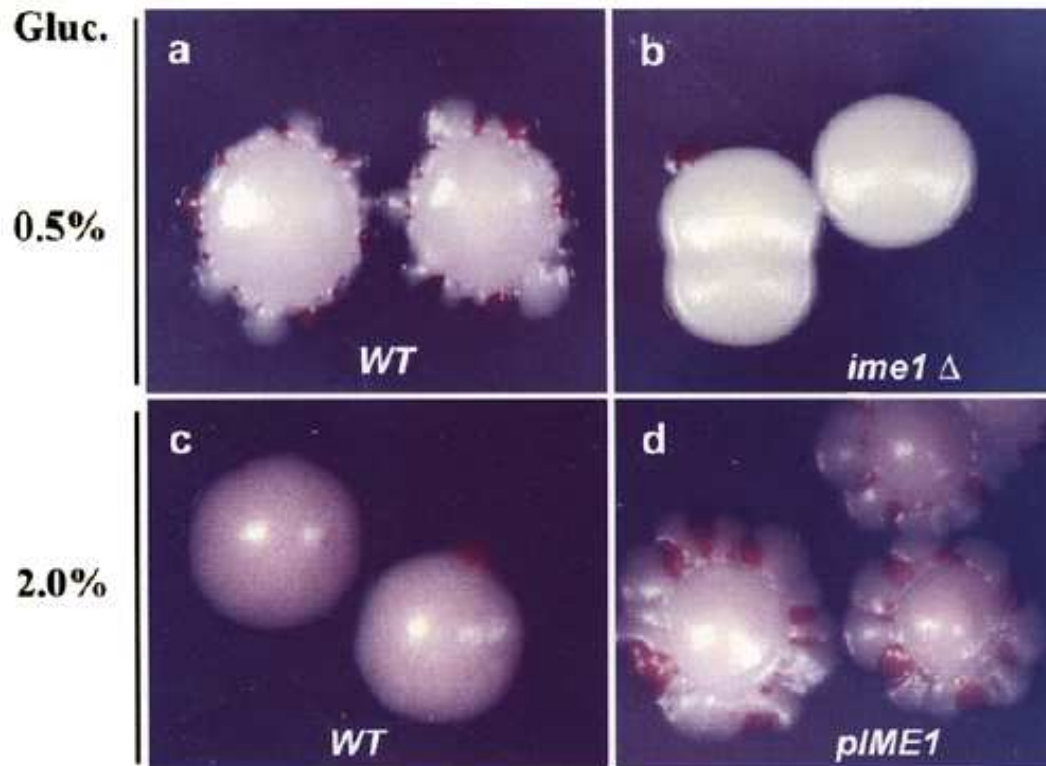
Sporulace

- 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>



Spory - kolonie

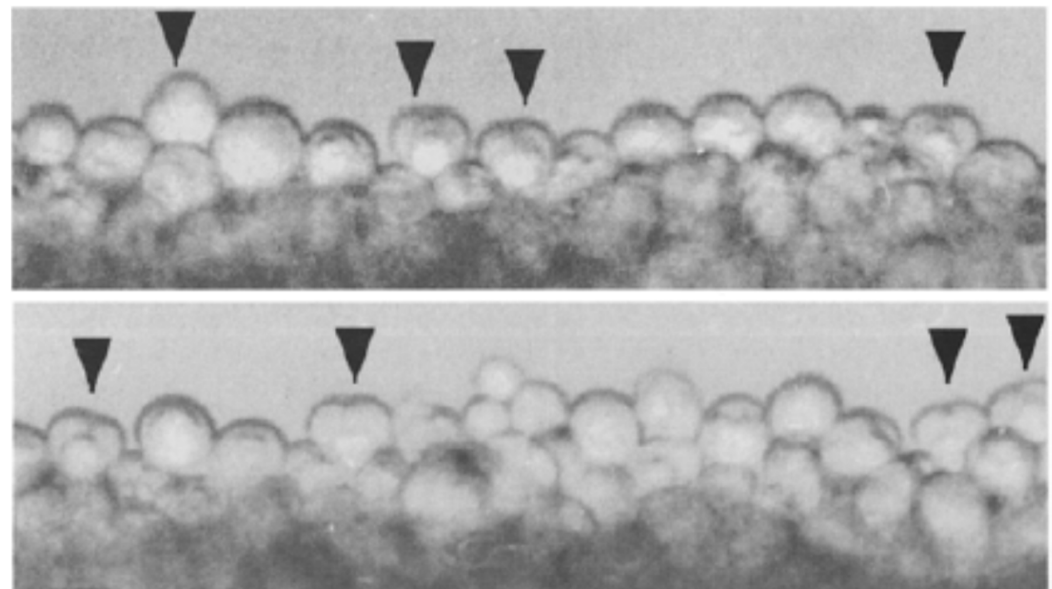
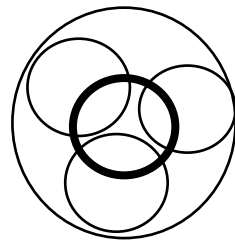


- při vyčerpání živin na misce mohou (krajní) buňky začít meiotické dělení (diploidní *S. cerevisiae*)
- meiosa je indukovaná *IME1* transkripčním faktorem (v *ime1Δ* se meiosa neindukuje vs. v *pIME1* overexprimovaných buňkách je indukována meiosa i bez vyčerpání živin tj. 2% glukosa)

ade2 (červená barva) ukazuje haploidizaci heterozygotního diploida (některé hapl. bílé vs červené)

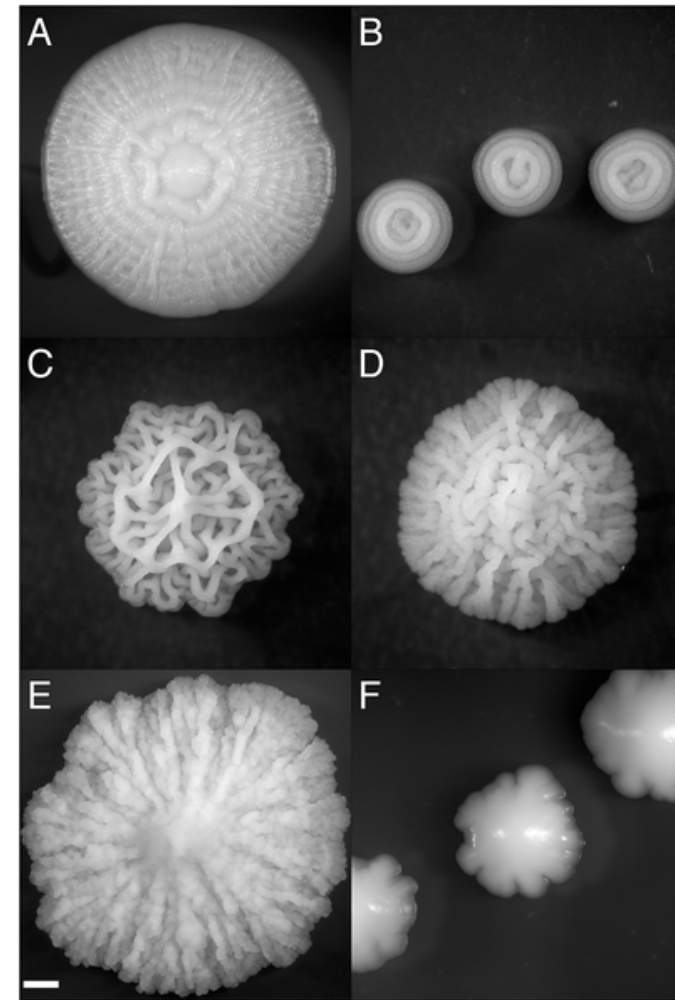
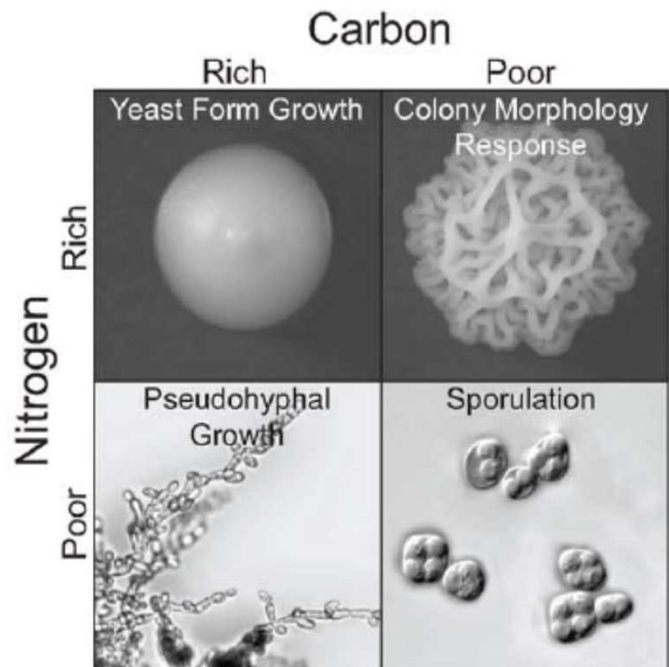
šipky ukazují vřecka se čtyřmi sporami

rhomboedrické



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 – většina
- červený pigment (*Rhodotorula*, *Sporidiobolus*)
- černý pigment (melanin – *Aureobasidium*)

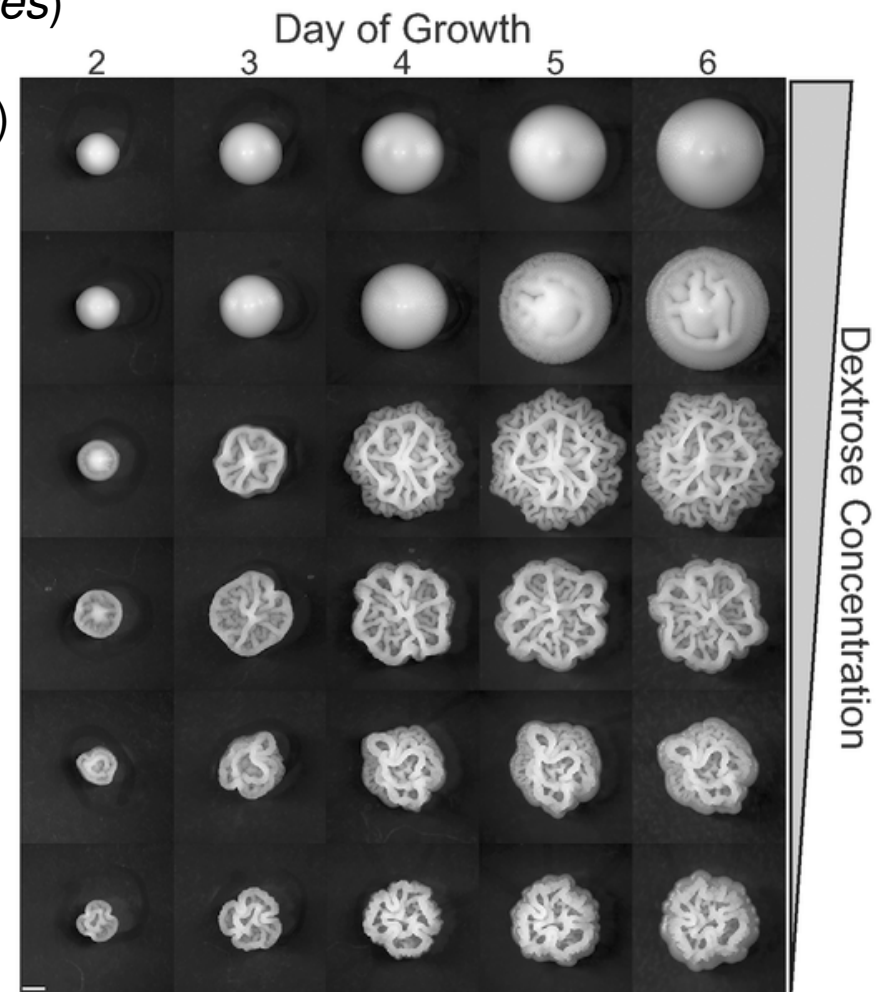
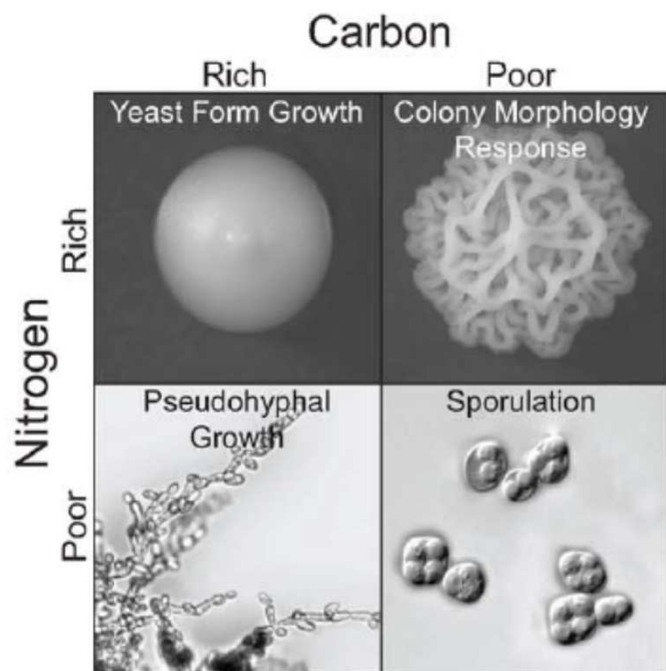


cvičení

Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

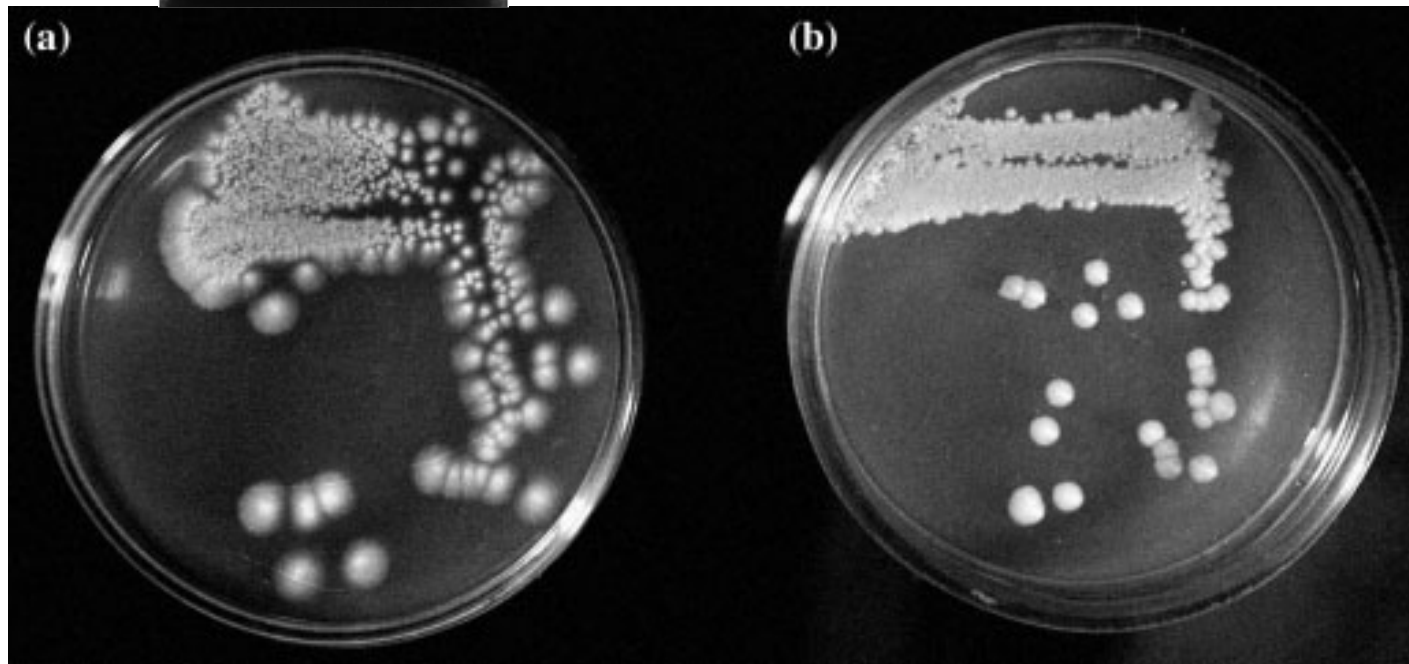
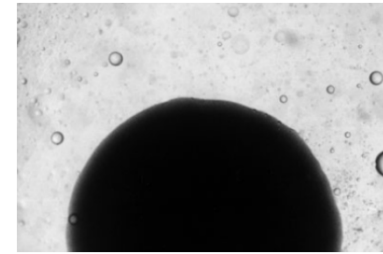
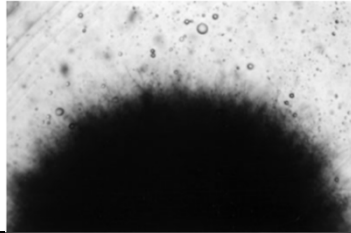
Kolonie

- 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 – většina
 - červený pigment (*Rhodotorula*, *Sporidiobolus*)
 - černý pigment (melanin – *Aureobasidium*)
- vliv živin na morfologii kolonie



Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

Morfologie kolonie - Candida



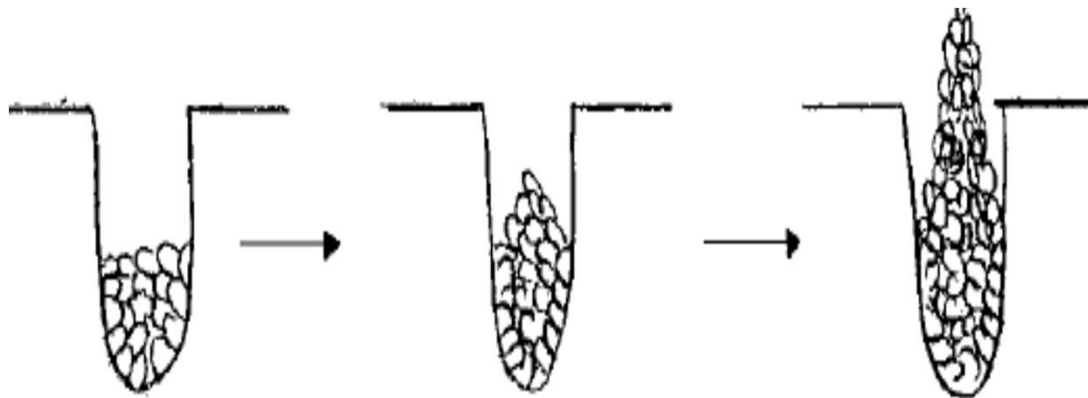
Např. odlišení *C.d.* od *C.a.*: 24h kultivace na Staibově agaru při teplotě 37°C

(a) *C. dubliniensis*

(b) *C. albicans*

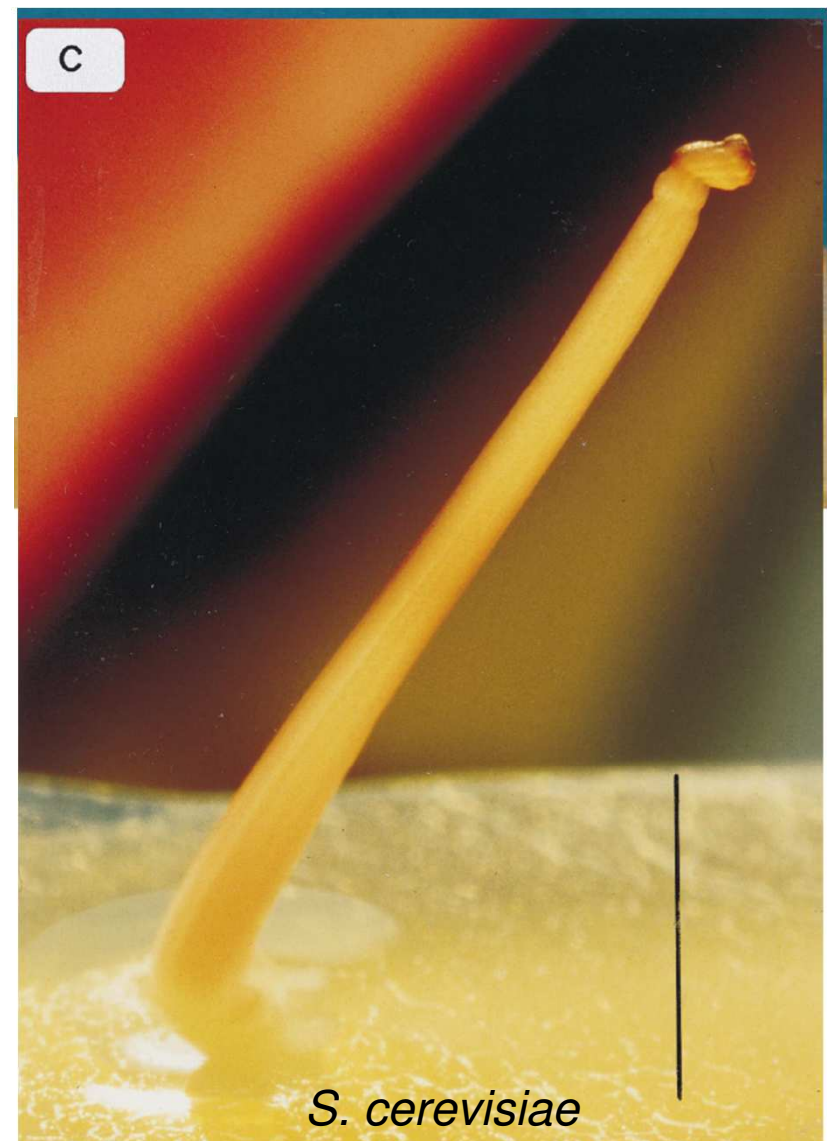
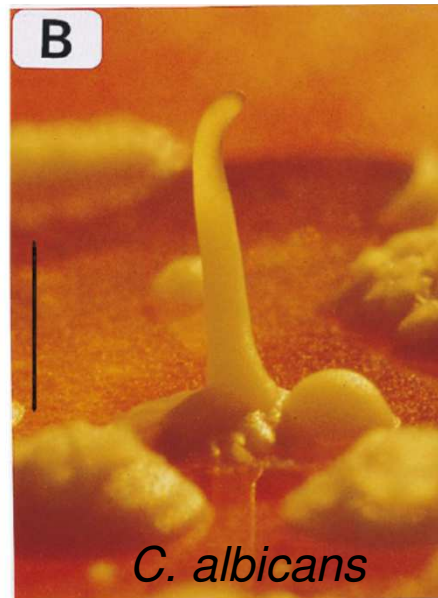
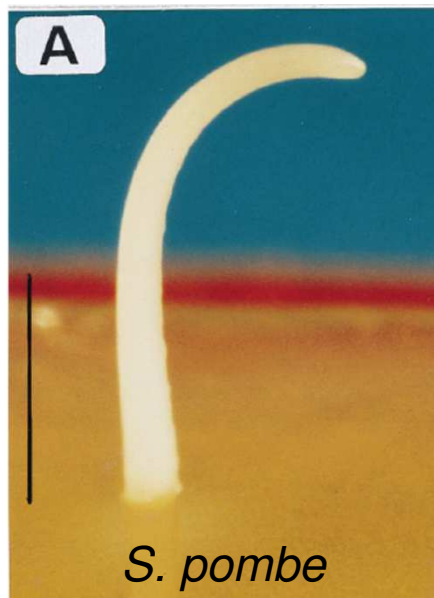
- využívá se např. pro odlišení *C.d.* od *C.a.* (kultivace na Staibově agaru při teplotě 37°C)

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

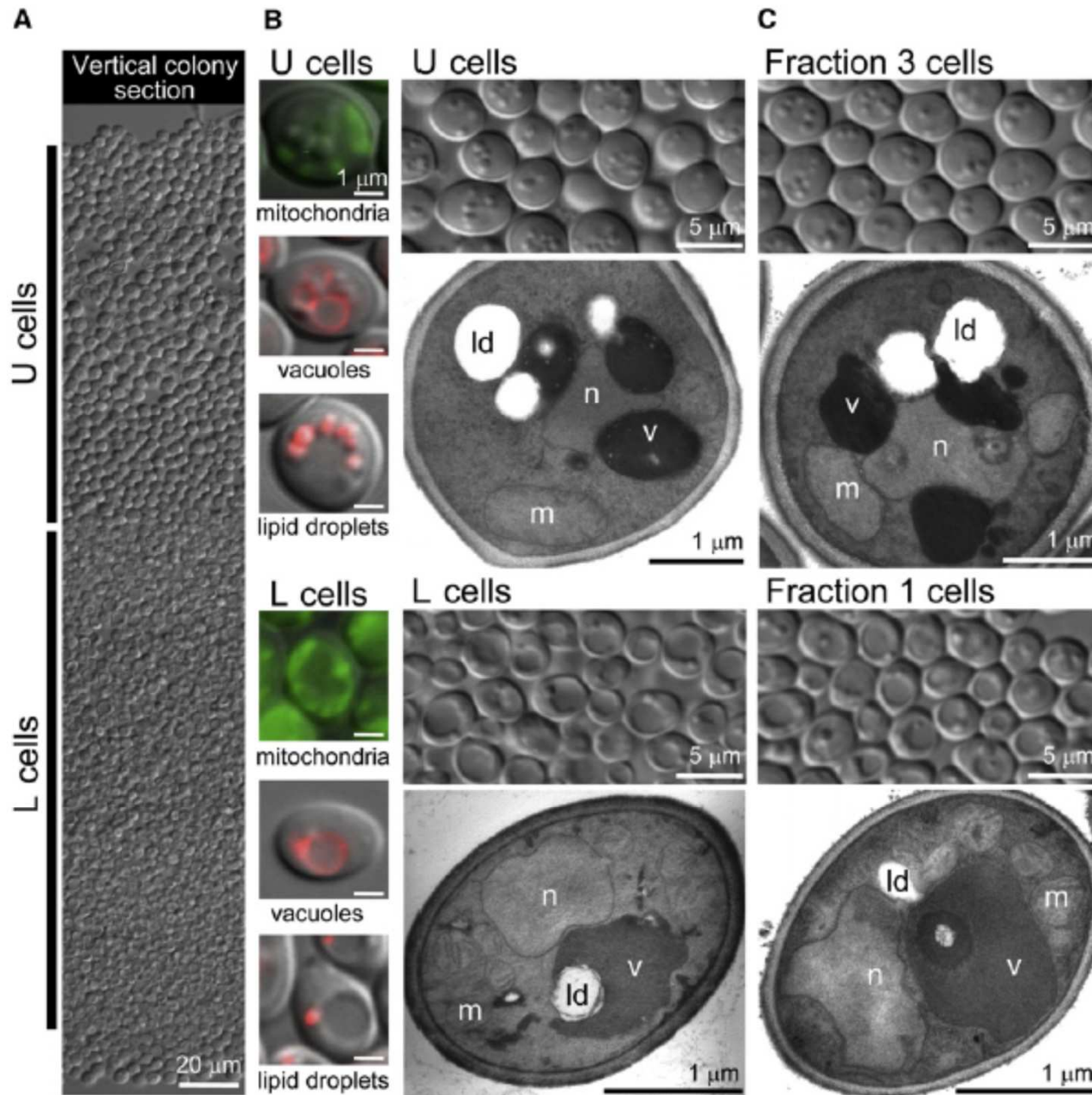


- buňky v jamkách jsou chráněny před UV, zatímco ty na povrchu jsou zabity

Engelberg a spol., J Bacter, 1998



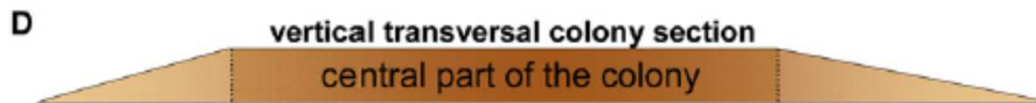
kolonie



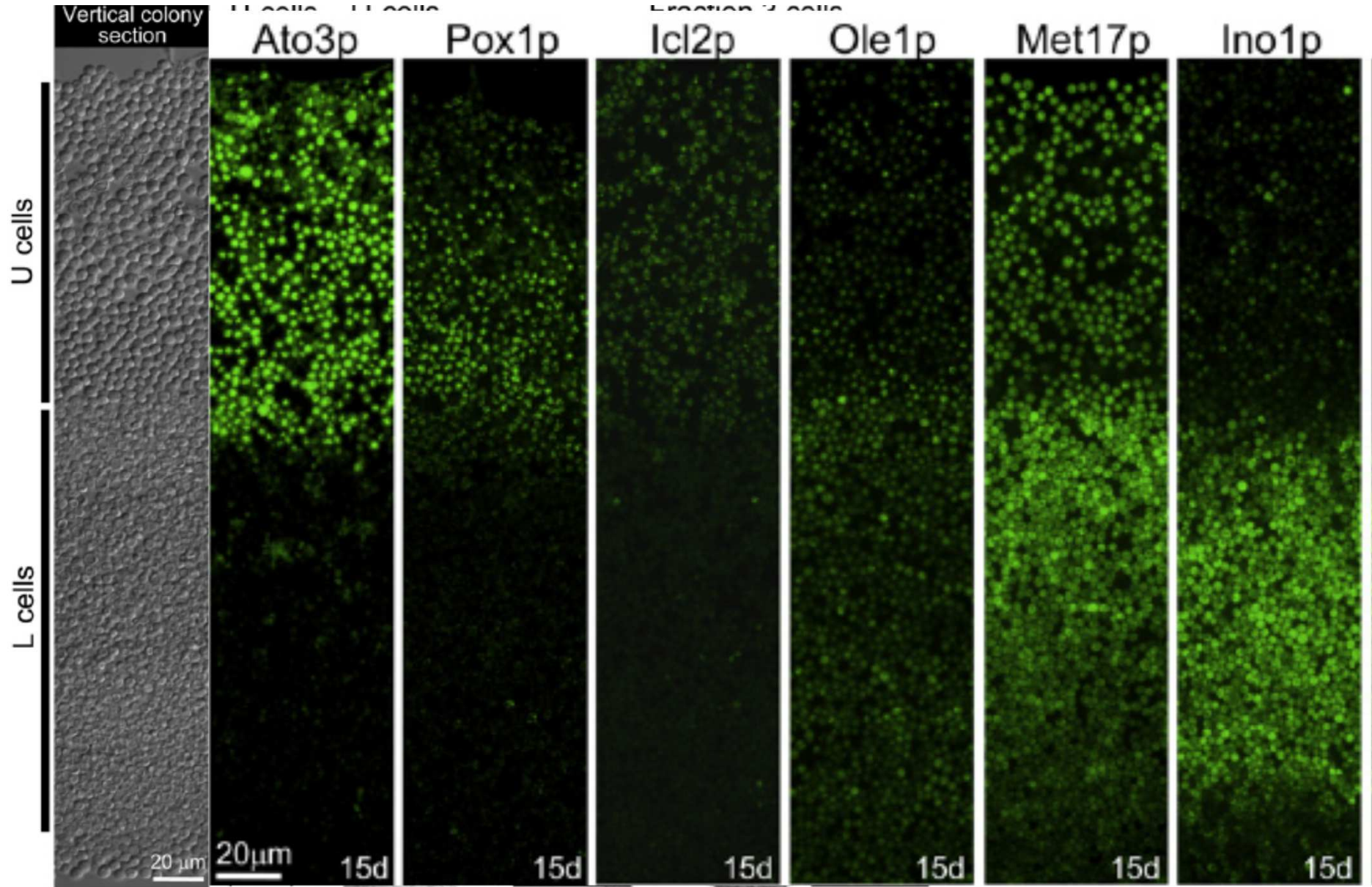
- větší buňky (4 μm)
- malé mitochondrie a vakuoly
- více lipidových váčků

rozdíly jsou patrné i na expresní úrovni proteinů

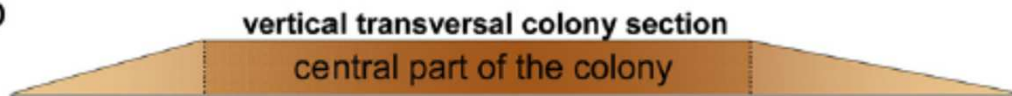
- menší buňky (3 μm)
- velké mitochondrie i vakuoly (aktivnější respirace a více ROS)



rozdíly jsou patrné i na expresní úrovni proteinů

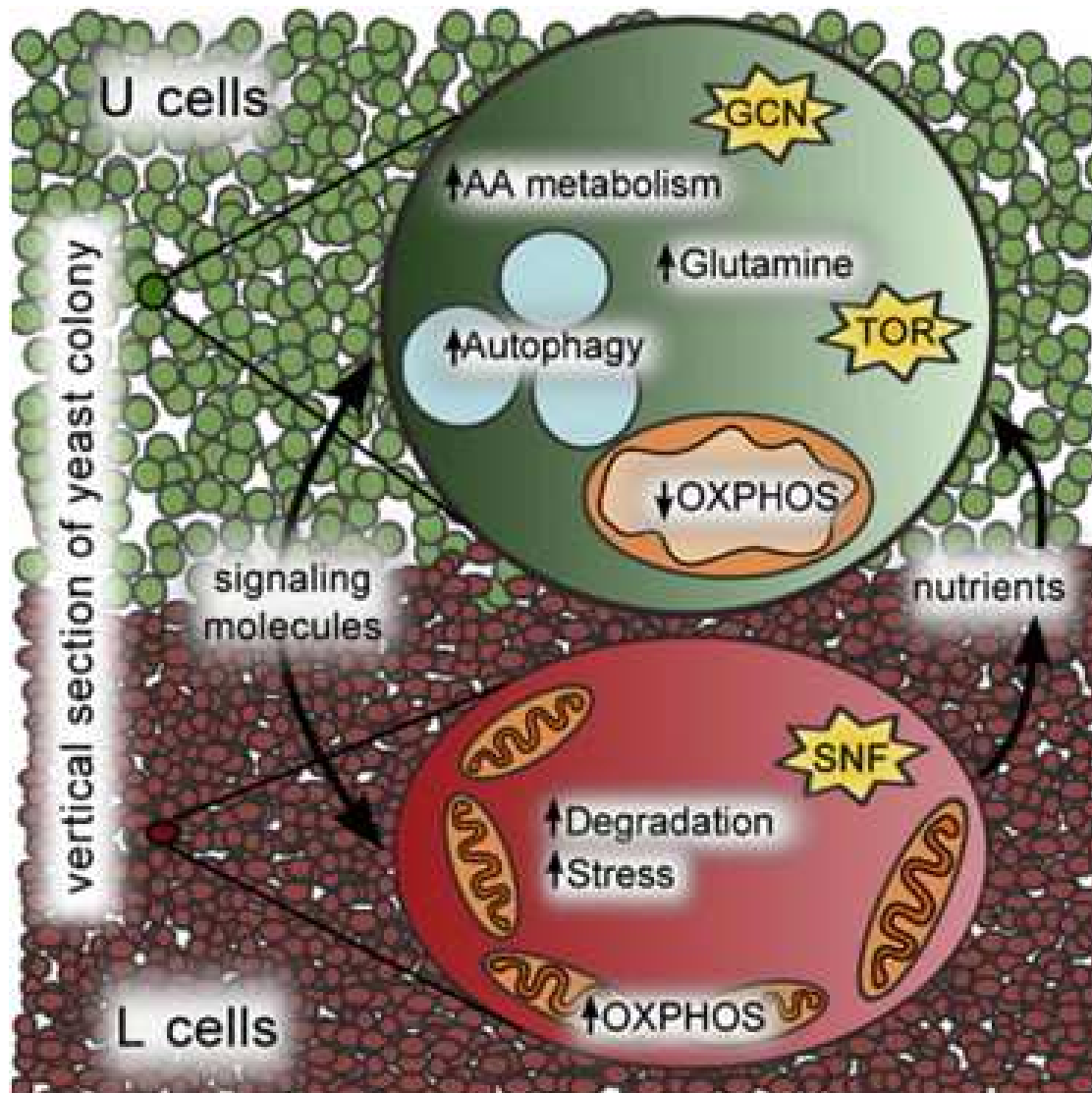


D



Čáp et al., Mol Cell, 2012

Diferenciace *S.cerevisiae* v kolonii



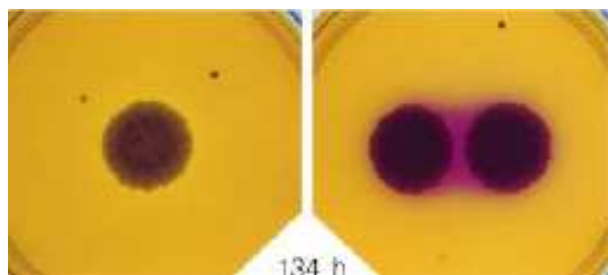
U (upper) buňky - aktivní glutaminem-indukovanou TOR dráhu, sníženou respiraci (málo mitochondrii), AMK-sensing systém (Gcn4) a vyšší „turnover“ AMK (souvisí s produkcí amoniaku), produkují **amoniak** pro komunikaci kolonii

- využívají živiny uvolněné z L buněk (autofagie)
- jsou odolnější vůči stresu – déle přežijí
- schopné proliferovat (po 10 dnech)

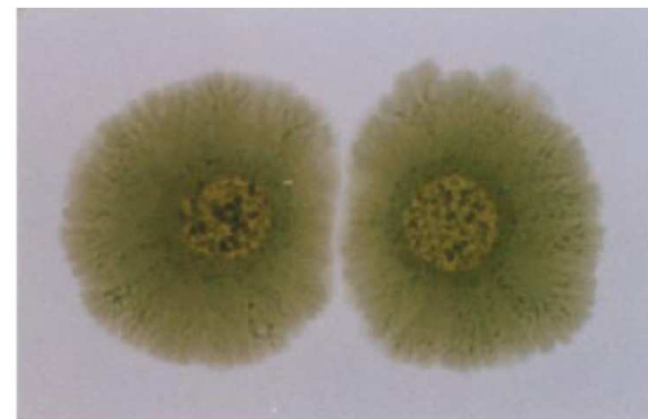
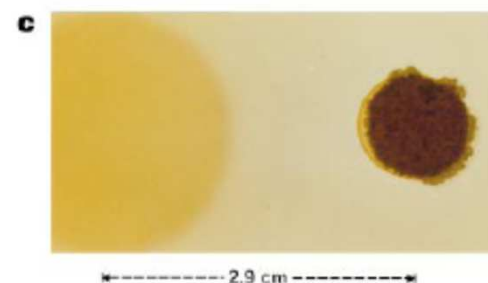
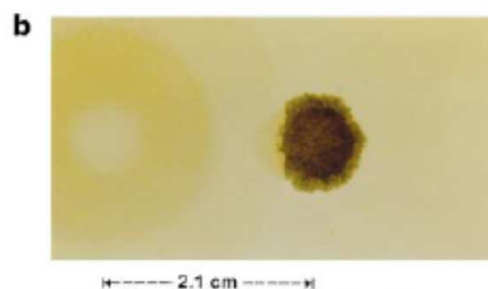
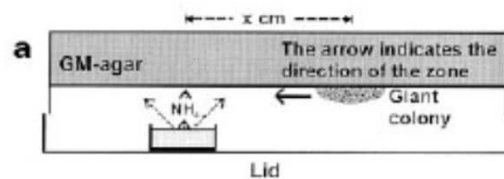
L (lower) buňky – podléhají více **stresu**, hladoví (přestože jsou blíže mediu), aktivují degradační mechanismy (zásobují U buňky)

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

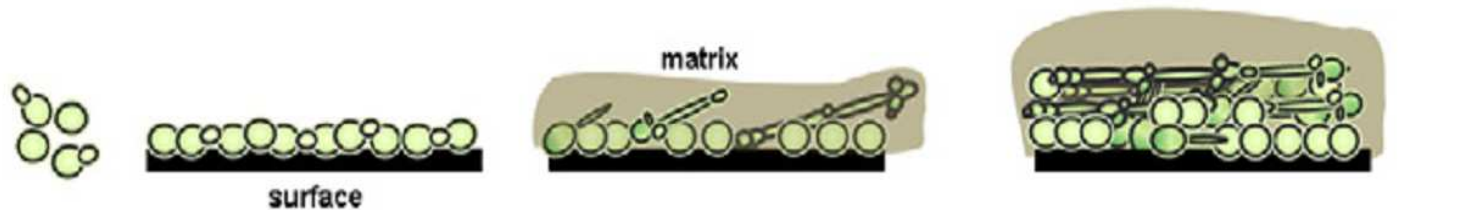


kolonie přesměrovává růst
sousední kolonie –
nekompetují o živiny

Biofilm

různé vývojové programy (formy) vedou k mnoho-buněčným strukturám

- tvorba **biofilmu** na pevném podkladu se sníženým množstvím agaru (málo glukózy)

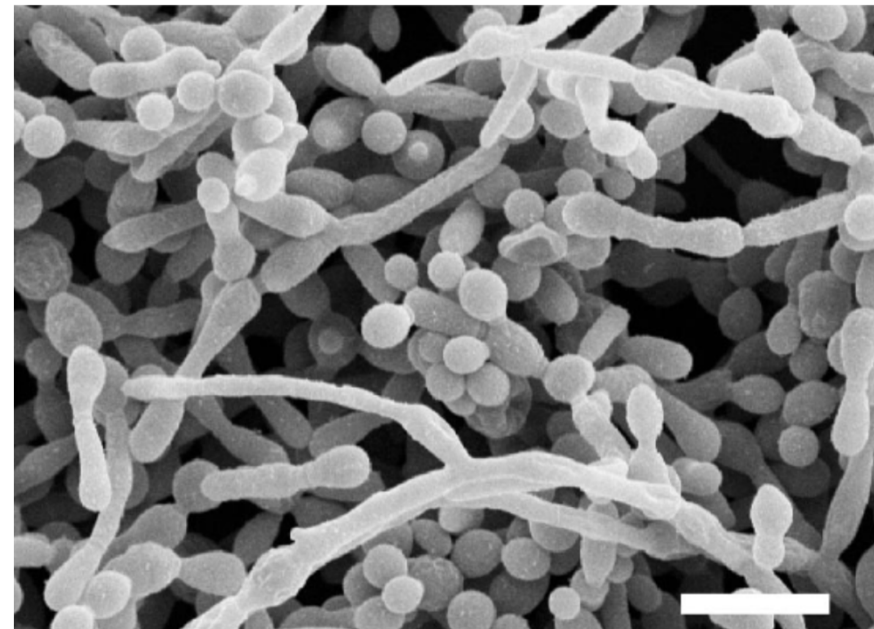


- tvořen EC matrix s mikrokoloniemi kvasinek, hyfami a pseudohyfami (komplexní struktura)

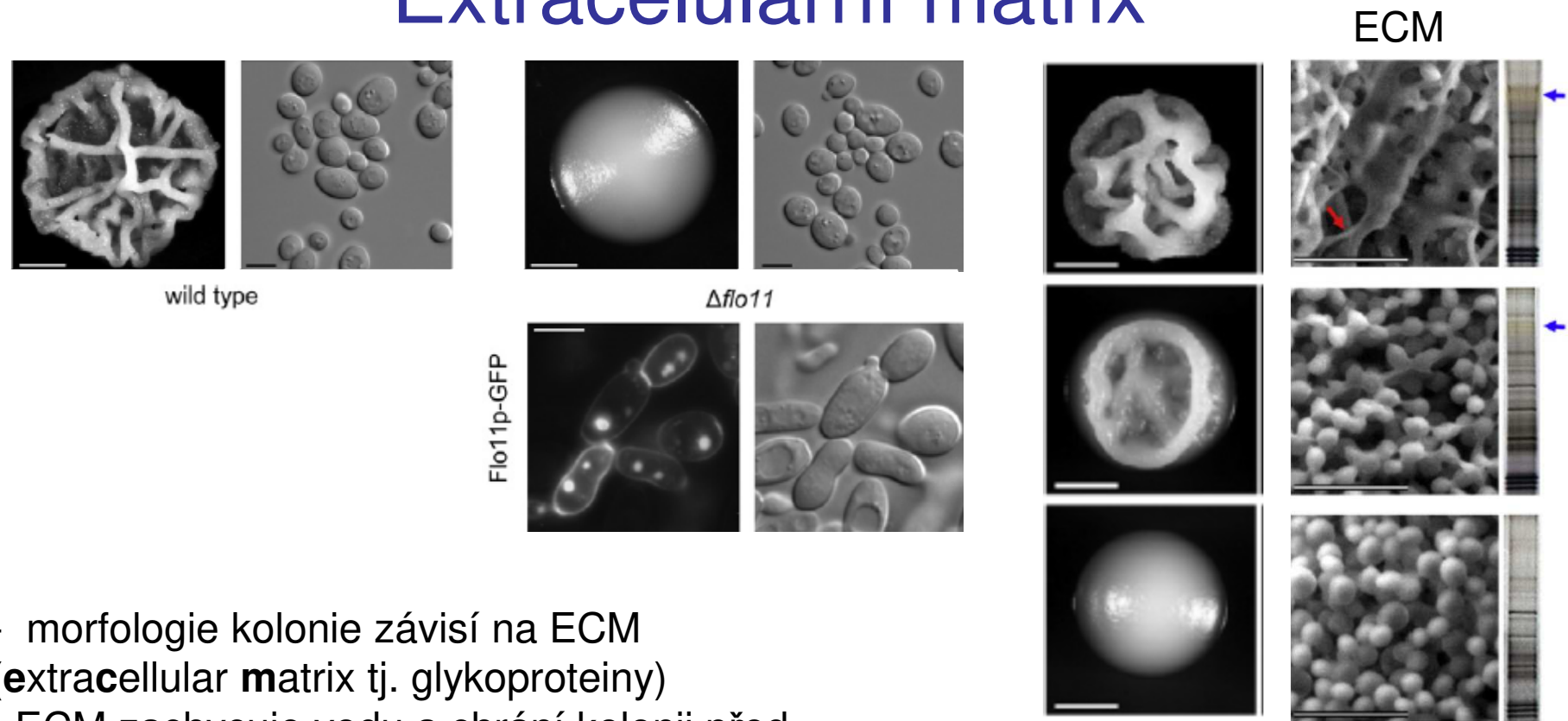
- více rezistentní než planktonické buňky
- významně přispívá k rozvoji a odolnosti kandidóz (**rezistentní** k antimykotickým látkám)

- 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)



Extracelulární matrix

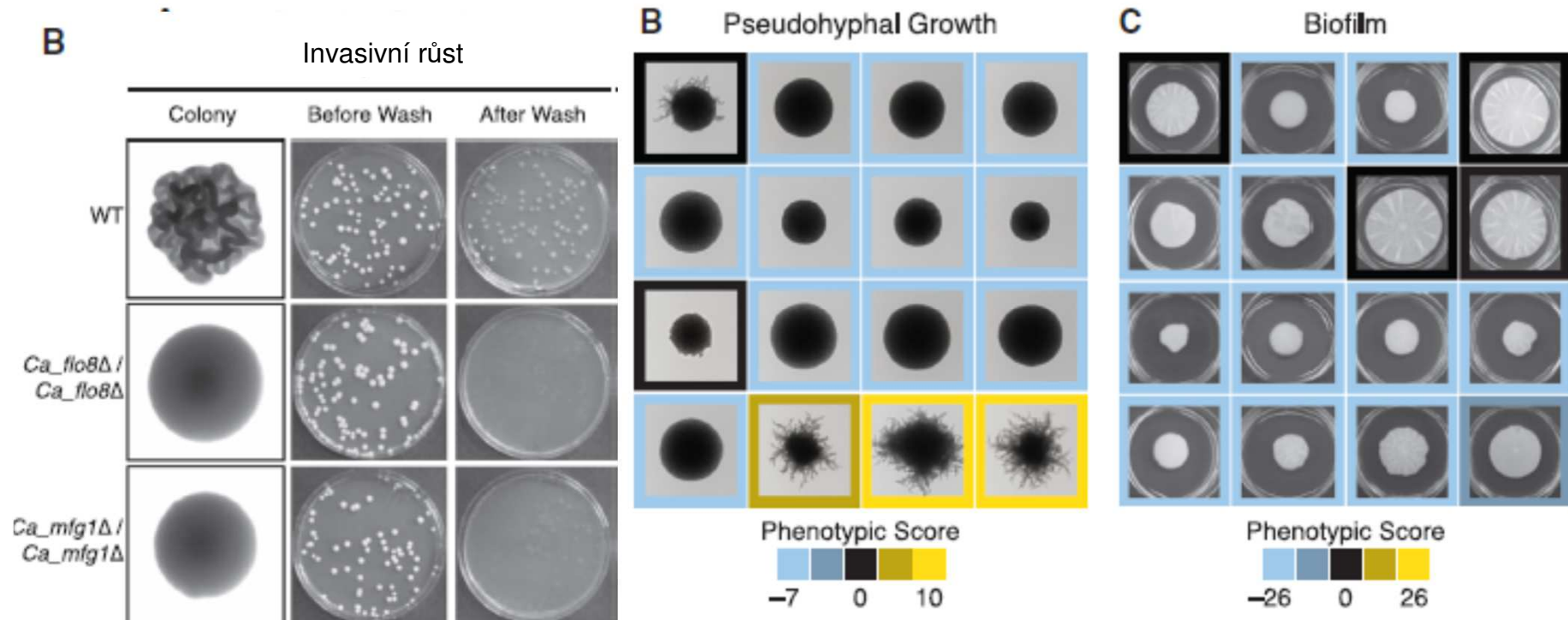


- morfologie kolonie závisí na ECM (extracellular matrix tj. glykoproteiny)
- ECM zachycuje vodu a chrání kolonii před vyschnutím
- buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (... biofilm, flokulace)
- závisí na **FLO11** (adhesin – glykoprotein – faktor důležitý pro flokulaci, biofilm, pseudohyfy)

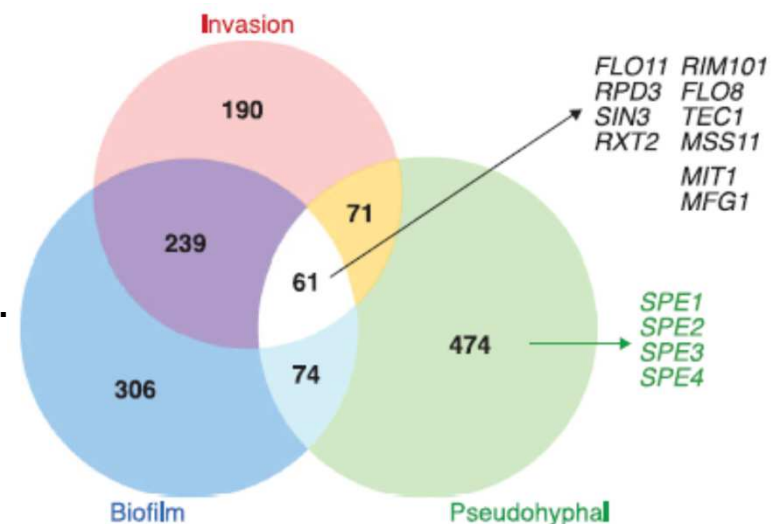
Stovicek et al, Fungal Gen Biol (2010)

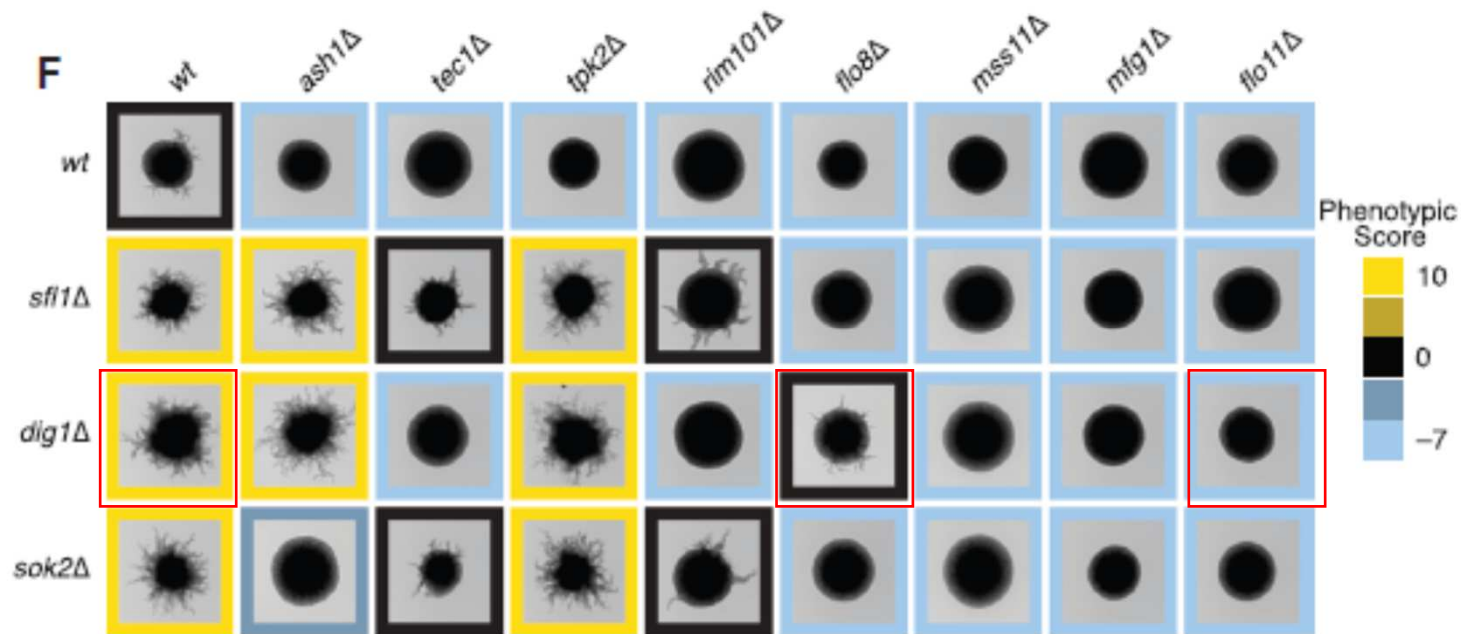
Laboratorní kmeny jsou hladké (např. S288C - Genotyp: *MAT α SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1*)

S.c. kmen Σ1278b



- buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (invasivní růst, pseudohyfy, biofilm, 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 invazivních vlastnostech (virulenci) patogenních kvasinek *C. albicans*

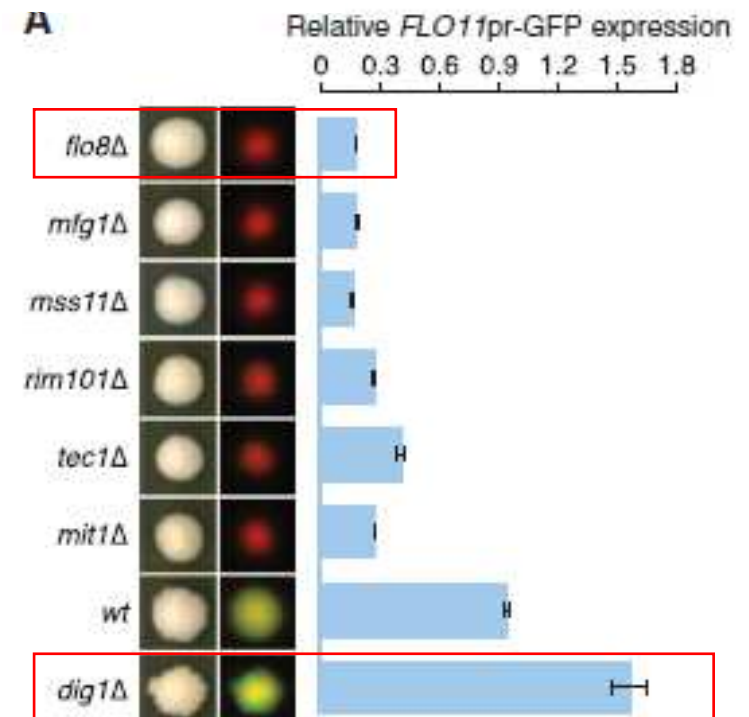




adhesin

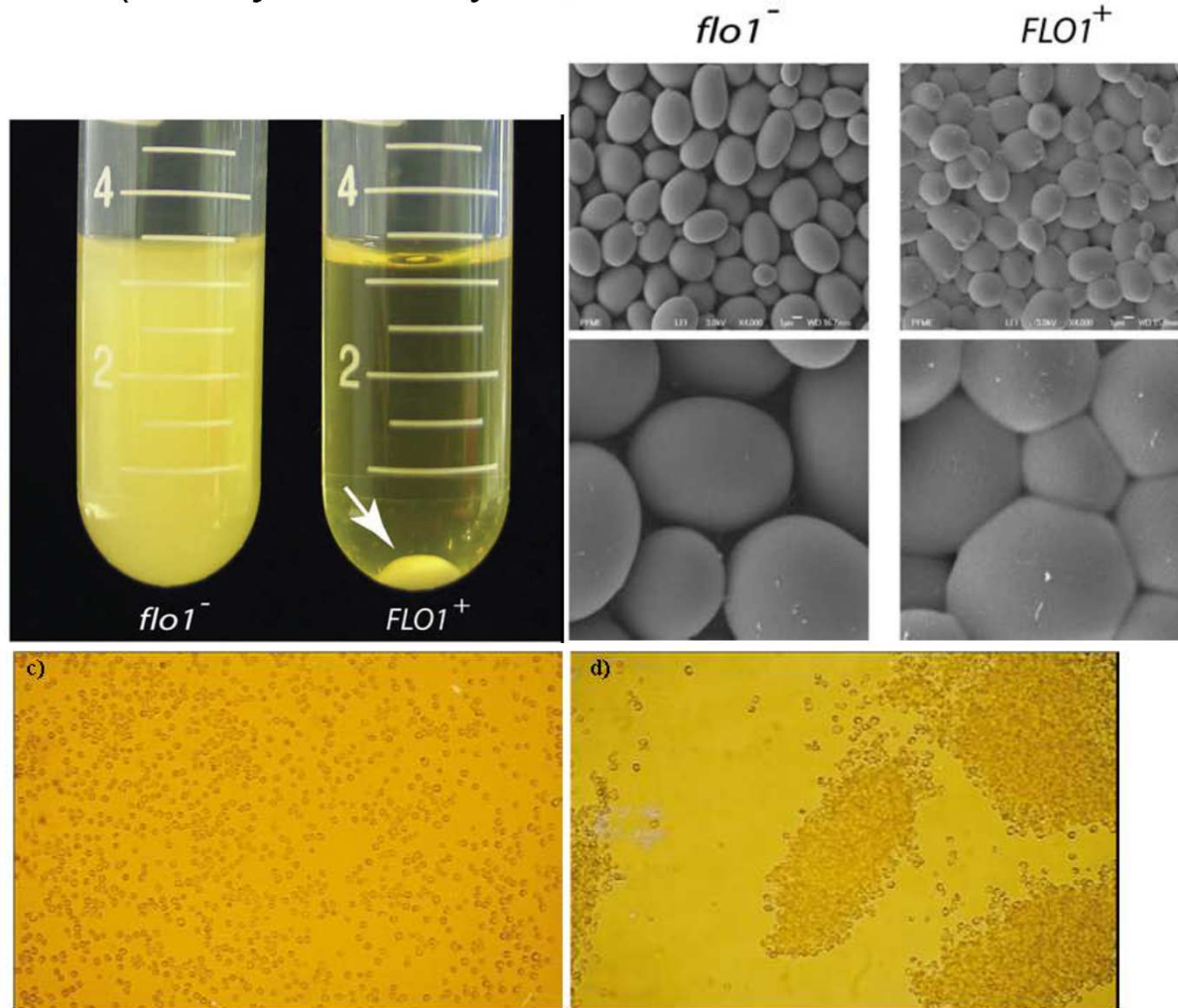
- Flo8, Mfg1 jsou TF aktivující transkripci Flo11
- Dig1 je represor transkripce Flo11
- FLO11 = adhesin (glykoprotein – faktor důležitý pro uchycení - buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (... biofilm, flokulace)

Ryan et al, Science (2012)



Flokulace

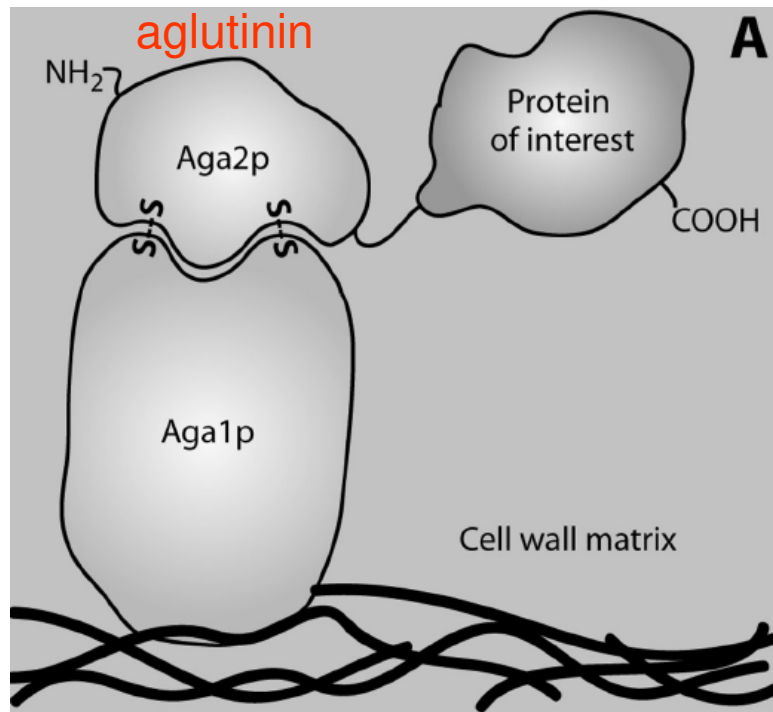
- reverzibilní schopnost kvasinek shlukovat se, tvořit větší celky (vločky, floky); odpověď na stres
- flokulace je významná vlastnost využívaná např. při produkci piva (snižuje náklady na filtraci piva)



- 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

Yeast surface display



- His-His-His-His-His-His
(chelatuje Ni, Cu, Co
kovy)

- *GTS1* transkripční faktor
spouštějící aglutinaci pod
CUP1 promotorem
(další přednášky)

- biosorbce &
sedimentace

- hybrid Aga2 (**aglutininy** nebo Flo1 ...) s testovaným proteinem
- exprese eukaryotních proteinů v kvasince (podobné mechanismy ... posttranslační modifikace) – knihovny lidských cDNA (i protilátek z pacientů)
- využití i pro biotechnologie – vylučování těžkých kovů (dekontaminace)

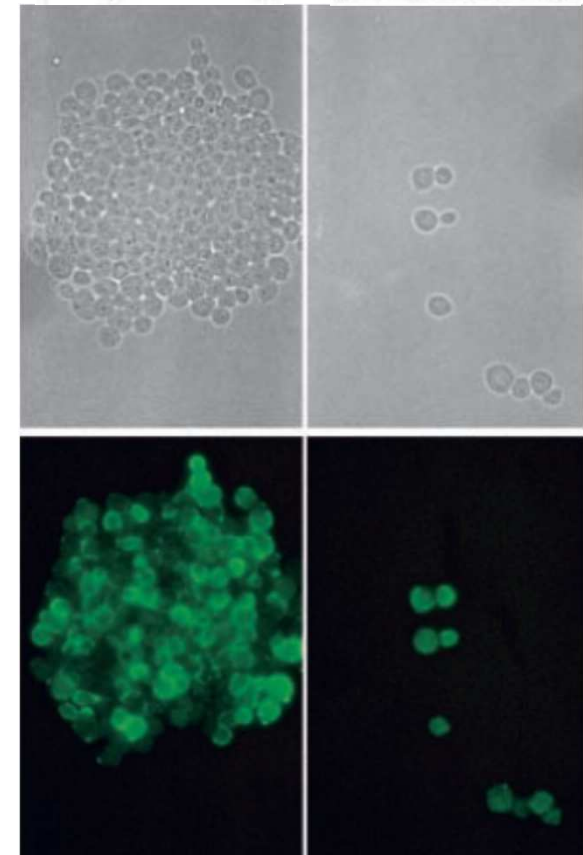
Kuroda et al, Appl Microbiol Biotechnol (2002)

Pepper et al, CCHTS (2008)

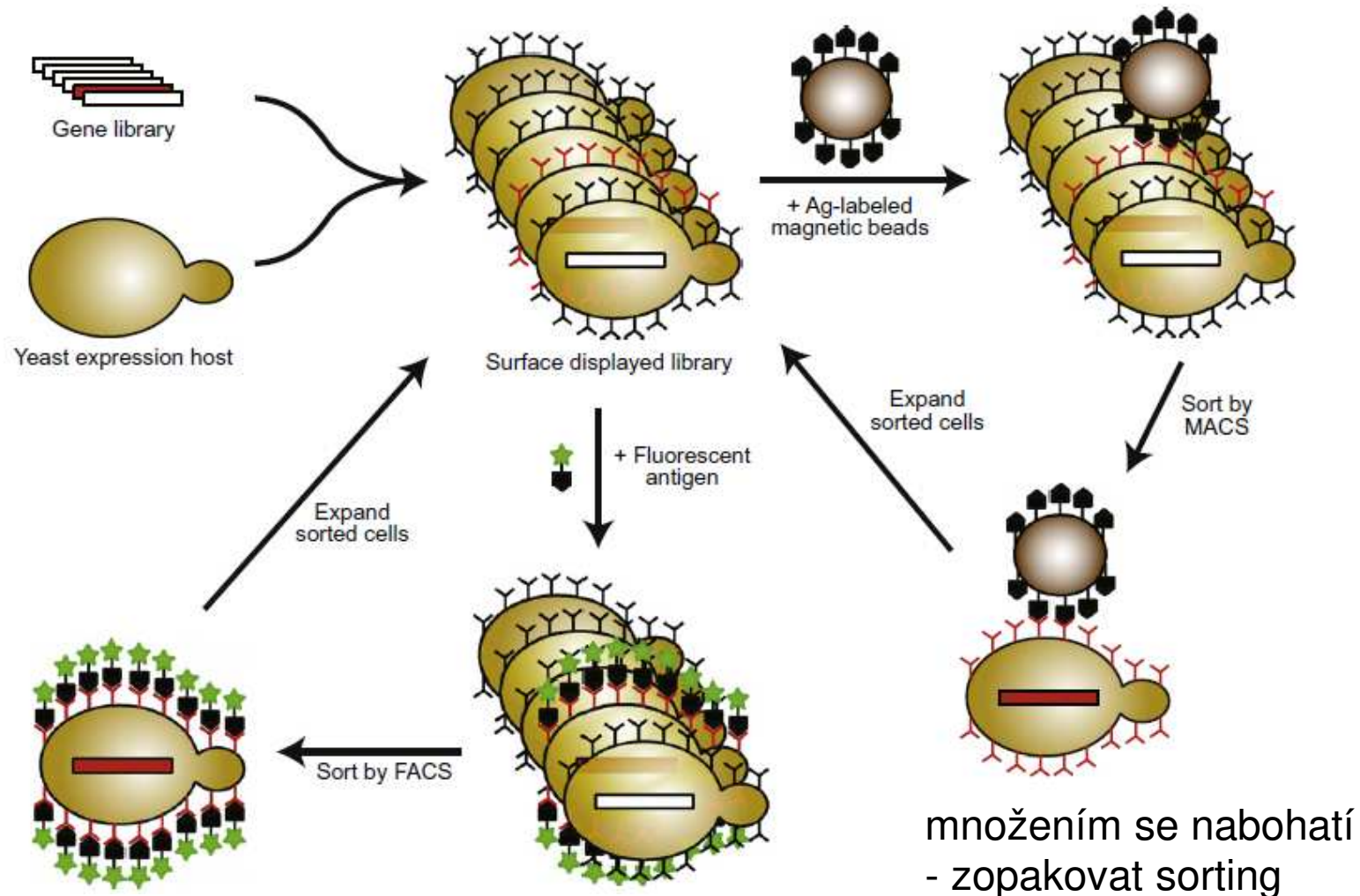


GPMH6/pMCG1
(100 μ M CuSO₄)

GPMH6/pMCG1
(without CuSO₄)



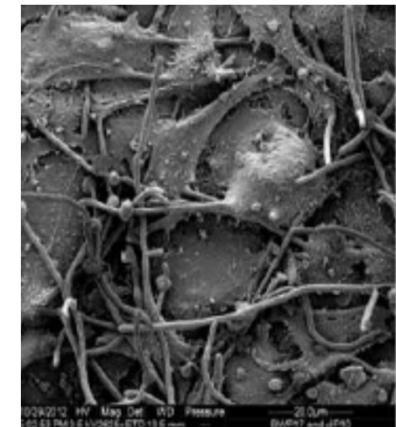
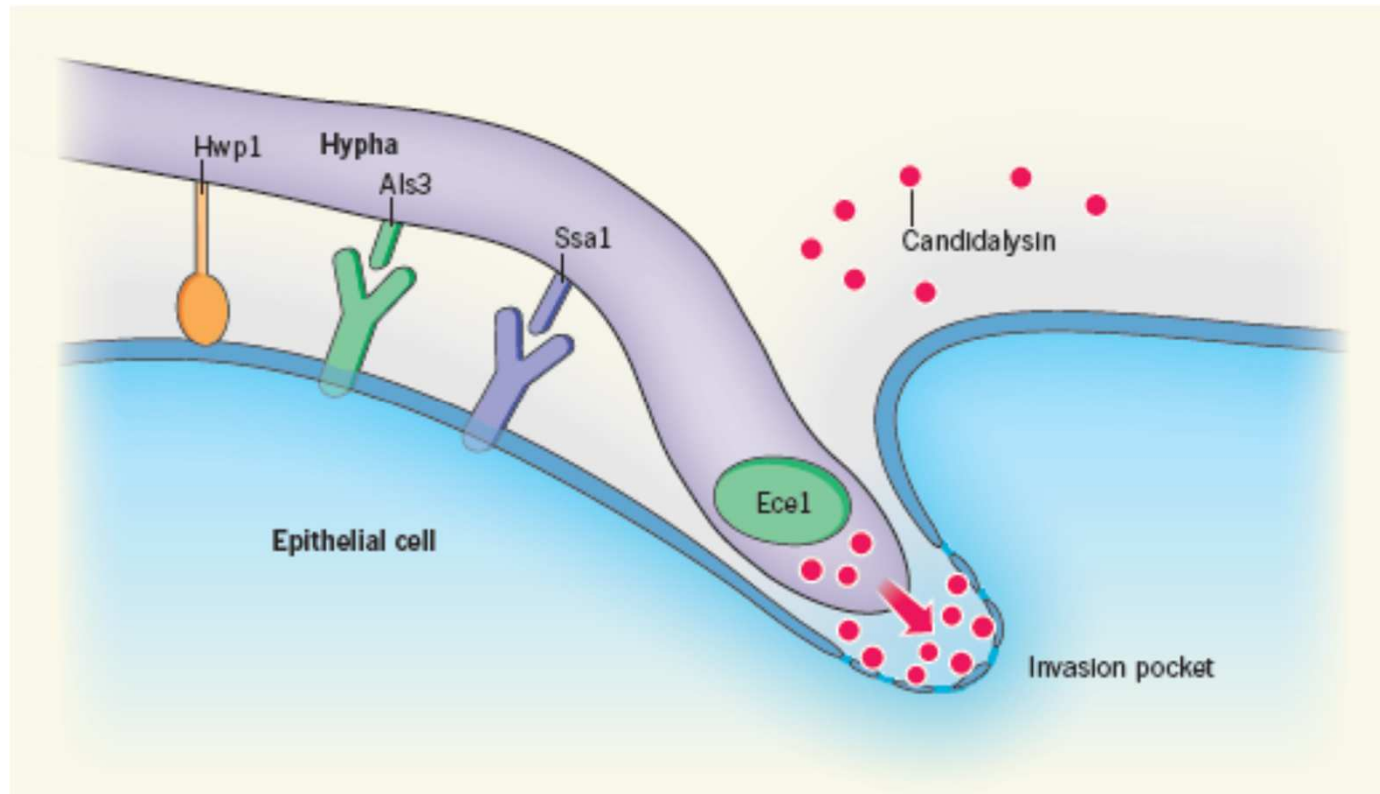
YSD - testy antigen/protilátka



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

Pseudohyfy, adhesiny ... a candidalysin

Kvasinky *C. albicans* jsou schopny se přichytit k epiteliálním buňkám hostitele (pomocí **adhesinů** – Hwp1) – **invasiny** (Als3 a Ssa3 mohou interagovat s receptory) se podílí na vnoření pseudohyfy do buněčné membrány hostitele – Ece1 je rozštěpen Kex2/Kex1 proteasami na peptidy (Golgi), které jsou sekretovány a vytváří (peptid III) póry v cytoplasmatické membráně (jako bakteriální toxiny)



Killer toxiny

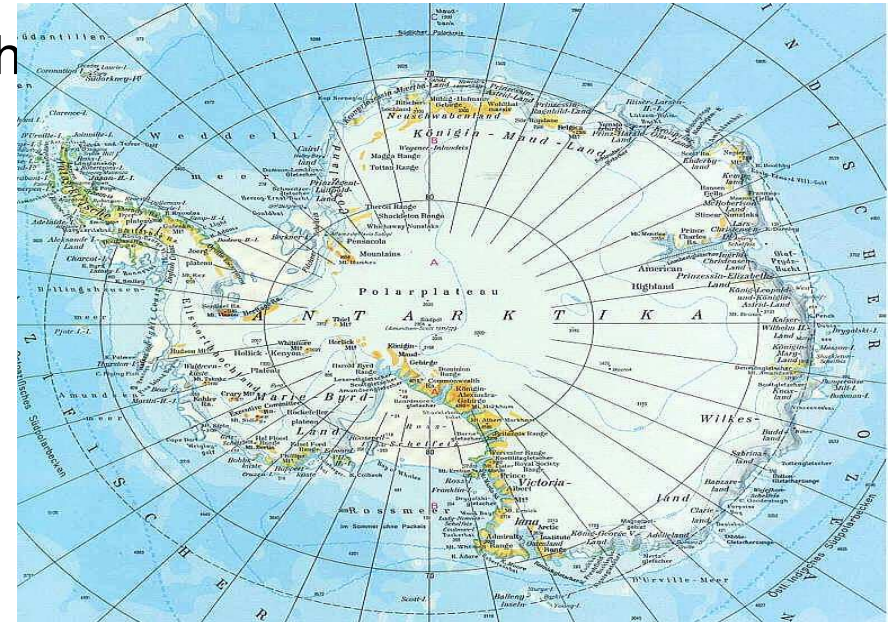
- Některé kmeny *S.cerevisiae* produkují tzv. killer toxiny (proteiny a glykoproteiny sekretované do prostředí), které jsou letální pro citlivé kvasinky i bakterie; ekologická výhoda (výhoda pro vinaře – nepřerostou je cizorodé kmeny)
- Poprvé analyzováno v roce 1963 (Makower a Bevan) kvasinky zabíjí podkladový kmen (K1=laboratorní, K2 a K3=vinařské kvasinky)
- Kvasinky ze stejné skupiny se navzájem nezabíjí (**preprotoxin ...**)
- Geny jsou kódovány na dsRNA obalené ve „**virus-like particles**“ (VLP, připomínají savčí dsRNA viry) – kódují obalové, replikační proteiny (ale potřebují buňku k replikaci ...), transkripční sekvence a toxin
- Samotné VLP nejsou infekční (nejsou uvolňovány z buněk - lze je přenést konjugací buněk nebo fúzí protoplastů) ani toxické (preprotoxin v původní buňce interaguje/inaktivuje maturované/sekretované toxiny)
- Toxin je sekretován a váže se na buněčné stěny (β -1,6-glukany) - způsobuje perforace/póry v cytoplasmatické membráně – ztráta iontů, potenciálu ... buňka hyne
- *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranifaciens* – lineární dsDNA (v cytoplasmě, pGK11), bez kapsidy, toxin se váže na chitin (chitinásová aktivita)
- *Hansenula mrakii* ... - geny na chromosomech, toxin inhibuje syntézu β -1,3-glukanu (v místě růstu pupenu)

Table 2. Killer activity of *P. membranifaciens* CYC 1086 and CYC 1106 against yeasts and fungi of biotechnological interest

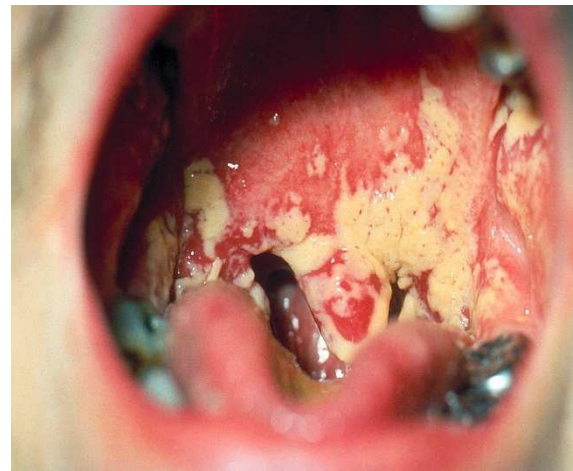
Sensitive strain	Killer activity		Sensitive strain	Killer activity		Sensitive strain	Killer activity	
	1086	1106		1086	1106		1086	1106
<i>S. cerevisiae</i> SGV	-	-	<i>B. bruxellensis</i> 1D007	3+	-	<i>Pichia anomala</i> 1114 ^T	-	-
<i>S. cerevisiae</i> CEG	-	-	<i>B. bruxellensis</i> D013	1+	-	<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1070	2+	-
<i>S. cerevisiae</i> VRB	-	3+	<i>B. bruxellensis</i> D014	1+	-	<i>Aspergillus</i> spp. 27	-	-
<i>S. cerevisiae</i> NEM	-	-	<i>B. bruxellensis</i> D015	1+	-	<i>A. carbonarius</i> B MUM	-	-
<i>S. cerevisiae</i> 2056	-	2+	<i>B. bruxellensis</i> D017	2+	-	<i>A. ochraceus</i>	-	-
<i>S. cerevisiae</i> BM45	-	3+	<i>B. bruxellensis</i> D018	1+	-	<i>A. oryzae</i>	-	-
<i>S. cerevisiae</i> 2323	-	-	<i>B. bruxellensis</i> D019	1+	-	<i>A. tubingensis</i>	-	-
<i>S. cerevisiae</i> ALB	-	3+	<i>B. bruxellensis</i> D027	1+	-	<i>Fusarium culmorum</i>	-	-
<i>S. cerevisiae</i> SLO	-	4+	<i>B. bruxellensis</i> D028	1+	-	<i>F. graminearum</i> NRRL 28525	-	-
<i>S. cerevisiae</i> VN	-	-	<i>B. bruxellensis</i> D029	2+	-	<i>F. graminearum</i> NRRL 29020	-	-
<i>S. cerevisiae</i> 71B	-	4+	<i>B. bruxellensis</i> D031	1+	-	<i>F. pone</i>	-	-
<i>S. cerevisiae</i> CS2	-	1+	<i>B. bruxellensis</i> D032	1+	-	<i>F. proliferatum</i> MM 1-2	2+	-
<i>S. cerevisiae</i> CM	-	-	<i>B. bruxellensis</i> D033	1+	-	<i>F. proliferatum</i> MM 3-1	2+	-
<i>S. cerevisiae</i> HAY	-	-	<i>B. bruxellensis</i> D035	2+	-	<i>F. proliferatum</i> MM 6-2	-	-
<i>S. cerevisiae</i> FS	-	3+	<i>B. bruxellensis</i> D036	1+	-	<i>F. reticuloides</i> MM 6-3	-	-
<i>S. cerevisiae</i> 16	-	-	<i>B. bruxellensis</i> D038	1+	-	<i>F. reticuloides</i> MM 7-3	-	-
<i>S. cerevisiae</i> 17	-	3+	<i>Debaryomyces hansenii</i> 1021	-	-	<i>F. sporotrichoides</i> ITEM 550	-	-
<i>S. cerevisiae</i> 18	-	3+	<i>D. hansenii</i> 1244	-	-	<i>Botrytis cinerea</i> 20003	-	3+
<i>S. cerevisiae</i> 19	-	-	<i>D. hansenii</i> 10388	-	-	<i>B. cinerea</i> 20004	-	1+
<i>S. cerevisiae</i> SC1	-	4+	<i>D. hansenii</i> 10386	-	-	<i>B. cinerea</i> 20005	-	2+

- Kontaminace vinných kultur kmenem *Brettanomyces bruxellensis* může být potlačena *Pichii membranifaciens*
- Význam při ochraně průmyslových kmenů (proti kontaminaci – odolné vůči toxinu a zabijí kontaminanty)
- v léčbě (některé *S.c.* killer kmeny zabijí kmeny *C.a.*, *C. podzolicus* zabijí *C.n.*)

Určení (nových) kmenů v nových lokalitách



Určení kmene v klinických izolátech (odlišení patogenních kmenů *Candida*...)



Kontrola čistoty kmene pro biotechnologické procesy (*Saccharomyces cerevisiae* – pivo)

zpracování vzorků:

- z půdy: promývání v destilované vodě → homogenizace → třepačka
...
- klinické vzorky: tělní tekutiny, stěr nebo pomocí lepicí pásky ...
a pak vyšetří na Sabouraudův agar nebo bohaté médium → kultivace
2-7 dní při teplotách 22-42°C (37°C)

Lékařská mykologie – Bi3390

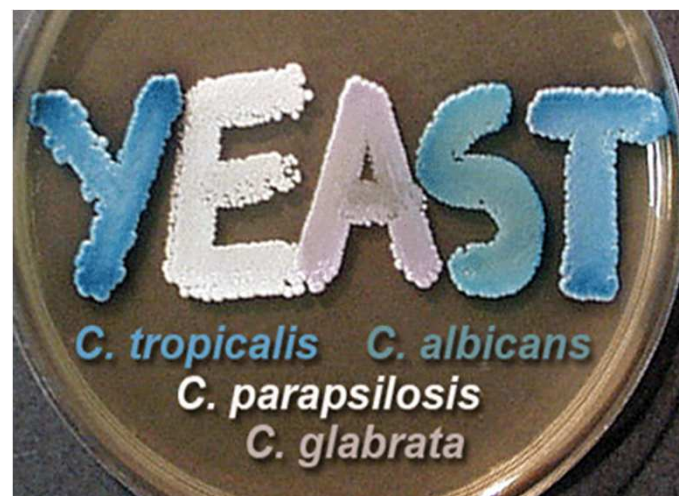


identifikace/analýza:

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

moderní metody

- PCR (nested, multiplex, RFLP),
- sekvenační (NGS technologie),
- hmotnostní spektrometrie



V klinické praxi je důležitější rychlost než přesnost (při zachování správné léčby)

Tab. 1 – Nejčastěji používané metody pro identifikaci kvasinek

Charakter identifikace	Princip	Způsob detekce	Hodnocení
orientační	selektivní a diagnostické půdy	aktivita enzymů, produkce pigmentu	fluorescence, barevná změna
	mikromorfologie	nativní preparát	klíční hyfy
	sérologie	monoklonální protilátky	aglutinace
	enzymatické testy	aktivita enzymů	barevná změna
podrobná	mikromorfologie	nativní preparát	chlamydozpy artrospory mycelium/pseudomycelium
		barvený preparát	askospory pouzdra
	biochemie	asimilace	Intenzita zánalu barevná změna
		fermentace	produkce CO ₂
	molekulární biologie	analýza DNA	FISH (fluorescence) PCR
		analýza RNA analýza proteinů	NASBA MALDI-TOF MS
FISH – fluorescenční hybridizace <i>in situ</i> , PCR – polymerázová řetězová reakce, NASBA – amplifikace založená na sekvencích nukleové kyseliny, MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrometrie „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight“			

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

doc. P. Hamal, UP Olomouc

Sérologické testy

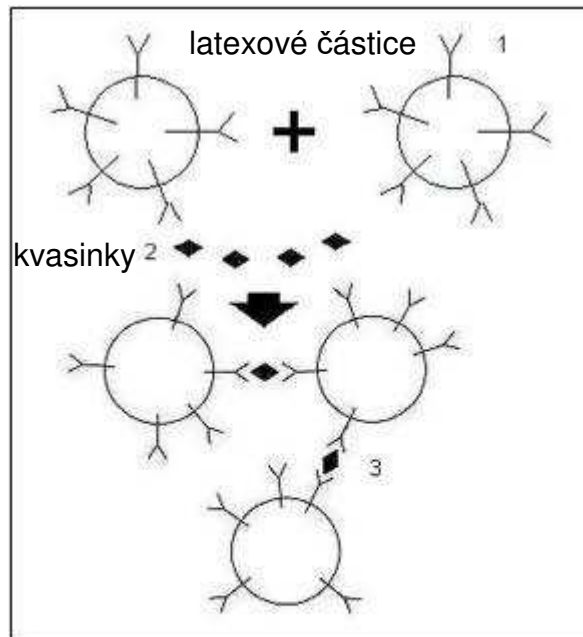
- souprava Iatron Serological Candida Check Kit (Iatron Laboratories) nebo Bichro-latex Albicans (Fumouze Diagnostics)

Tab. 1 – Nejčastěji používané metody pro identifikaci kvasinek

Charakter identifikace	Princip	Způsob detekce	Hodnocení
orientační	selektivní a diagnostické půdy	aktivita enzymů, produkce pigmentu	fluorescence, barevná změna
	mikromorfologie	nativní preparát	křehčí hyfy
	serologie	monoklonální protilátky	aglutinace
	enzymatické testy	aktivita enzymů	barevná změna
podrobná	mikromorfologie	nativní preparát	chlamydospory artrospory mycelium/pseudomycellium
		barvený preparát	askospory pouzdra
	biochemie	asimilace	intenzita zákalu barevná změna
		fermentace	produkce CO ₂
	molekulární biologie	analýza DNA	FISH (fluorescence) PCR
		analýza RNA analýza proteinů	NASBA MALDI-TOF MS

FISH – fluorescenční hybridizace in situ, PCR – polymerázová řetězová reakce, NASBA – amplifikace založená na sekvenčních nukleové kyseliny, MALDI-TOF MS – hmotnostní spektrometrie „Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight“

Specifické protilátky proti antigenům buněčné stěny

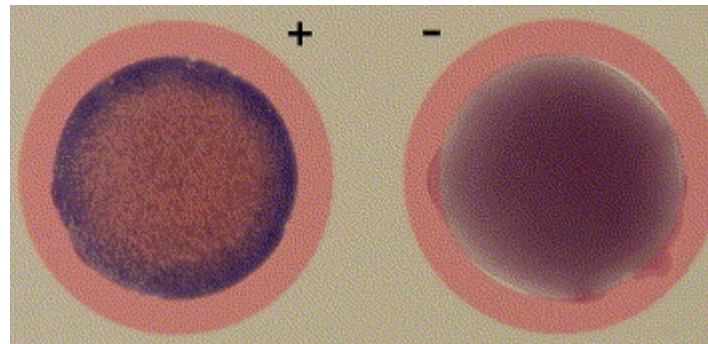


Obr. 2: 1 – latexová částice s navázanou specifickou protilátkou na povrchu; 2 – virová částice; 3 – shluk latexových částic s viry, který vytváří zákal ve vzorku Totéž platí pro kvasinky

Latexová aglutinace

C. dubliniensis

C. albicans



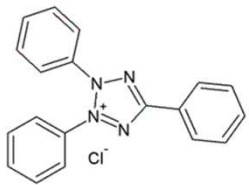
Teplotní test

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

Chromogenní testy

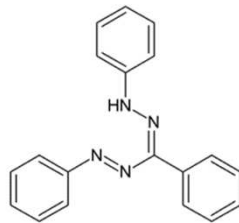
- test enzymových aktivit - chromogenní substráty – např. tetrazoliové soli

tetrazoliová sůl



TPH (White color)

electron donor (eg NADH)
Succinate dehydrogenase
redukce

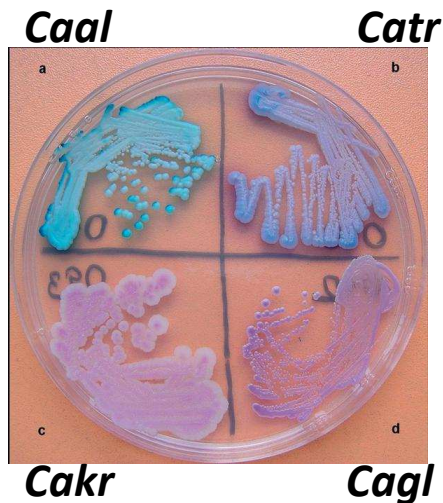


TPF (Red Color)

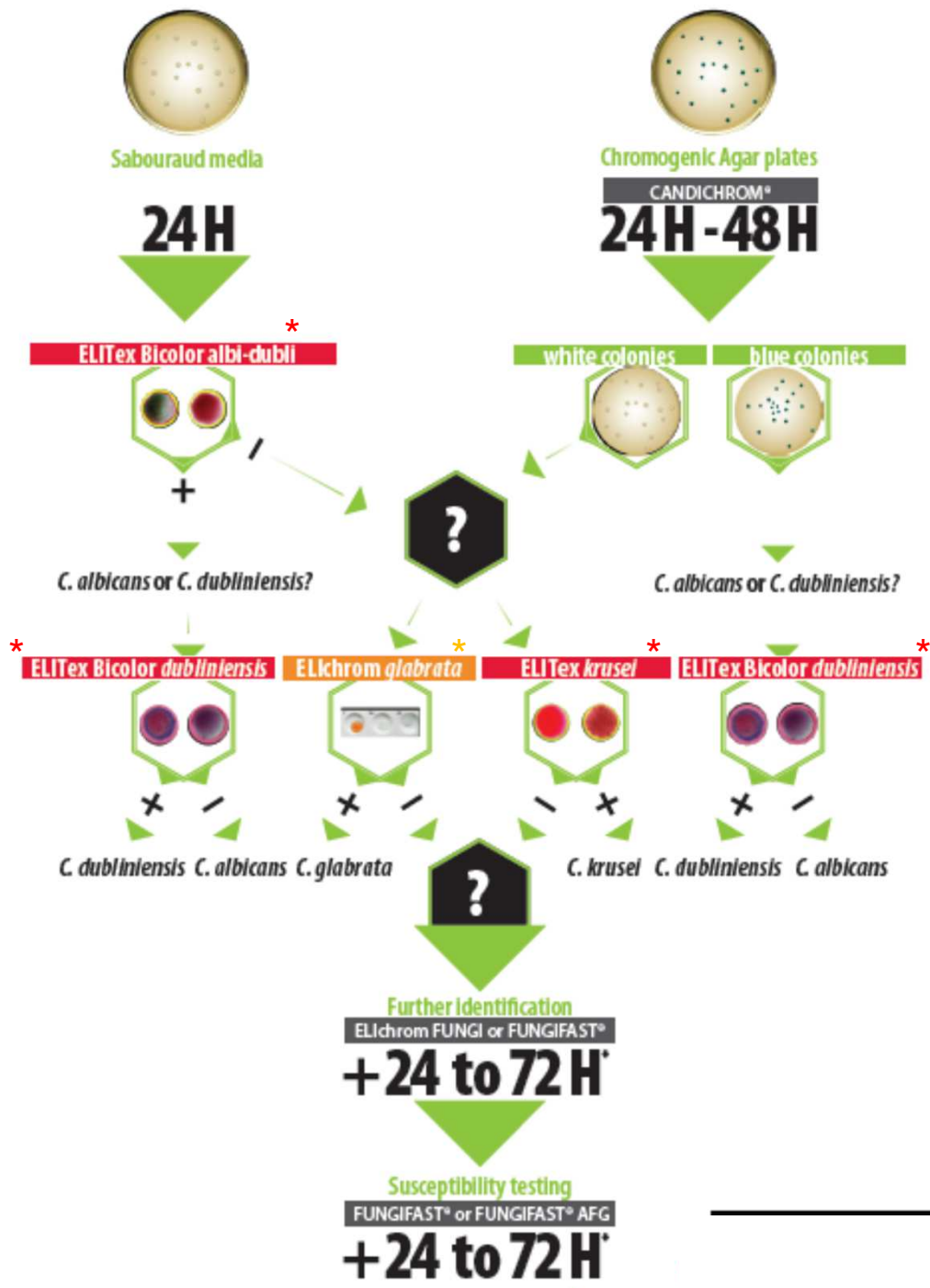
ATCC 10231 (*C. albicans*) at 48 h.



ATCC 13803 (*C. tropicalis*) at 48 h.



Agar	Basis of differentiation	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Tetrazolium salt médium	Colony color determined by the ability to reduce the <u>tetrazolium salt</u>	Pale pink to whitish colonies	Red to maroon colonies
Chromagar Candida (Chromagar, Paris, France; M-Tech Diagnostics Ltd, Cheshire, UK)	Colony color determined by <u>β-N-acetylgalactosaminidase</u> activity	Light green, light-blue or blue green colonies	Dark green colonies
Candida ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)	Colony color determined by <u>hexosaminidase</u> activity and other chromogenic substrate	Blue-green colonies	Dark-bluish green colonies



Příklad analýzy:

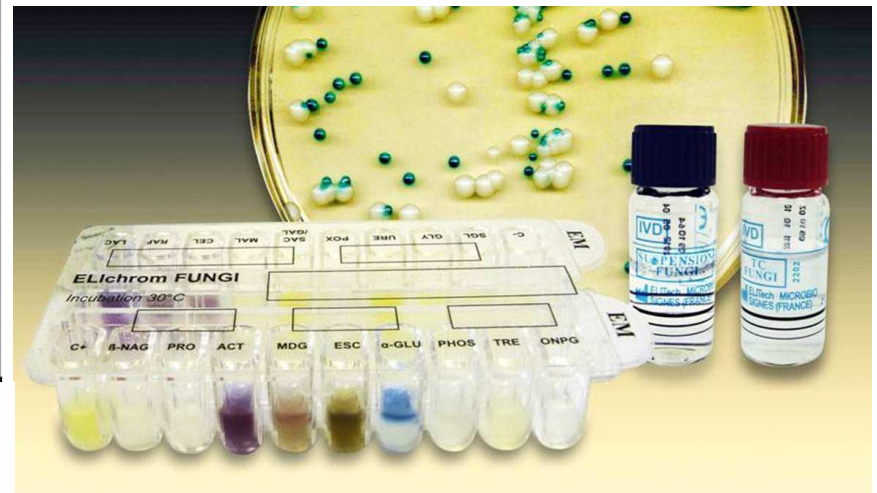
CANDIchrom – chromogenní metoda (enzymatická přeměna tetrazoliové soli) 1-2 dny

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

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

ELIchromFUNGI – biochemické testy 1-2 dny

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

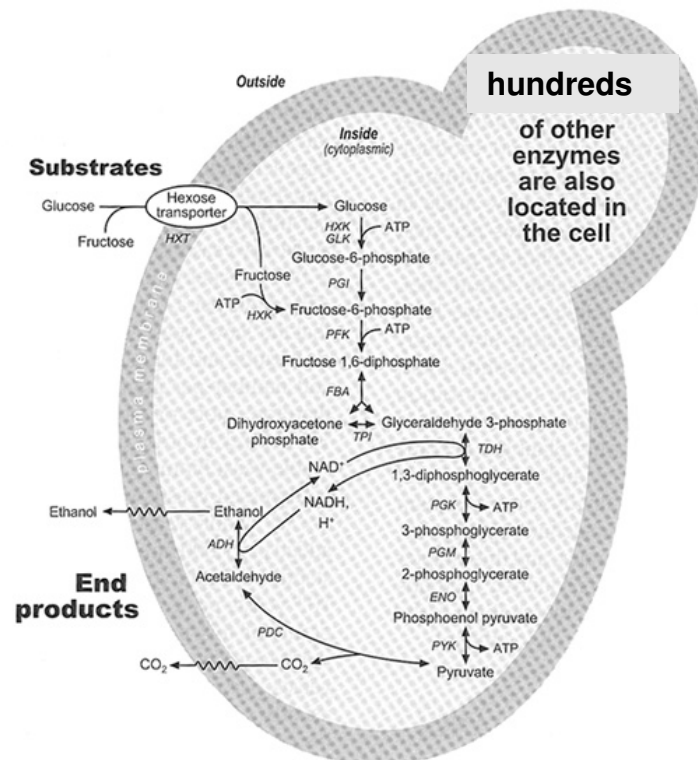


Biochemické testy

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

A.J. Kluyver – počátek 20. stol.

biochemie	asimilace	intenzita zákalu barevná změna
	fermentace	produkce CO ₂



Phenotypic criteria	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
Growth on glycerol	-	+
Growth on D-xylose	+	-
Growth on methyl- α -D-glucoside	+	-
Growth on D-trehalose	+	-
β -D-glucosidase activity	+	-

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

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

A1 Water	A2 Acetic Acid	A3 Formic Acid	A4 Propionic Acid	A5 Succinic Acid	A6 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	A7 L-Aspartic Acid	A8 L-Glutamic Acid	A9 L- Proline	A10 D-Gluconic Acid	A11 Dextrin	A12 Inulin
B1 D-Cellobiose	B2 Gentiobiose	B3 Maltose	B4 Maltotriose	B5 D-Melezitose	B6 D-Melibiose	B7 Palatinose	B8 D-Raffinose	B9 Stachyose	B10 Sucrose	B11 D-Trehalose	B12 Turánose
C1 N-Acetyl-D-Glucosamine	C2 α-D-Glucose	C3 D-Galactose	C4 D-Psicose	C5 L-Sorbose	C6 Salicin	C7 D-Mannitol	C8 D-Sorbitol	C9 D-Arabitol	C10 Xylitol	C11 Glycerol	C12 Tween 80
D1 Water	D2 Fumaric Acid	D3 L-Malic Acid	D4 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	D5 Bromo-Succinic Acid	D6 L-Glutamic Acid	D7 γ-Amino-Butyric Acid	D8 α-Keto-Glutaric Acid	D9 2- Keto-D-Gluconic Acid	D10 D-Gluconic Acid	D11 Dextrin	D12 Inulin
E1 D-Cellobiose	E2 Gentiobiose	E3 Maltose	E4 Maltotriose	E5 D-Melezitose	E6 D-Melibiose	E7 Palatinose	E8 D-Raffinose	E9 Stachyose	E10 Sucrose	E11 D-Trehalose	E12 Turánose
F1 N-Acetyl-D-Glucosamine	F2 D-Glucosamine	F3 α-D-Glucose	F4 D-Galactose	F5 D-Psicose	F6 L-Rhamnose	F7 L-Sorbose	F8 α-Methyl-D-Glucoside	F9 β- Methyl-D-Glucoside	F10 Amygdalin	F11 Arbutin	F12 Salicin
G1 Maltitol	G2 D-Mannitol	G3 D-Sorbitol	G4 Adonitol	G5 D-Arabitol	G6 Xylitol	G7 i-Erythritol	G8 Glycerol	G9 Tween 80	G10 L-Arabinose	G11 D-Arabinose	G12 D-Ribose
H1 D-Xylose	H2 Succinic Acid Mono-Methyl Ester plus D-Xylose	H3 N-Acetyl-L-Glutamic Acid plus D-Xylose	H4 Quinic Acid plus D-Xylose	H5 D-Glucuronic Acid plus D-Xylose	H6 Dextrin plus D-Xylose	H7 α-D-Lactose plus D-Xylose	H8 D-Melibiose plus D-Xylose	H9 D-Galactose plus D-Xylose	H10 m-Inositol plus D-Xylose	H11 1,2-Propanediol plus D-Xylose	H12 Acetoin plus D-Xylose

FIGURE 1. Carbon Sources in YT MicroPlate



Oxidation Tests

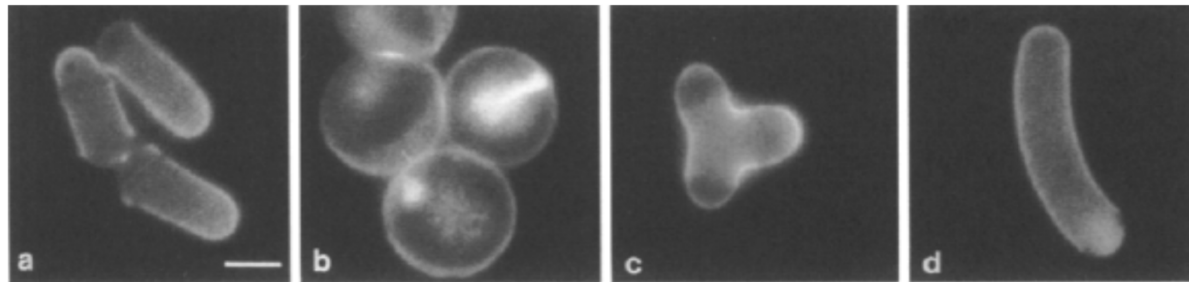


Assimilation Tests

nárůst kvasinek

Molekulární taxonomie

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



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

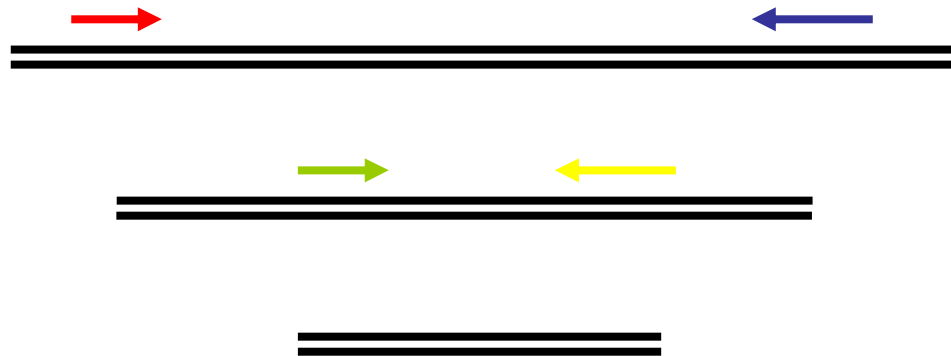
Identifikace založená na odlišnosti typických sekvencí DNA

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



Nested („zahnížděná“) PCR

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



Multiplex PCR

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



Candida glabrata
397bp

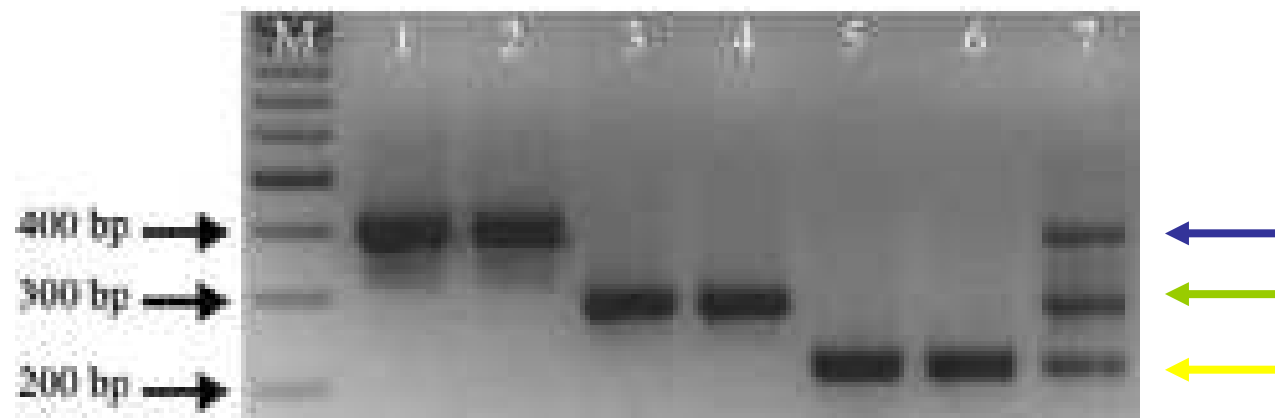


Candida nivariensis
293bp



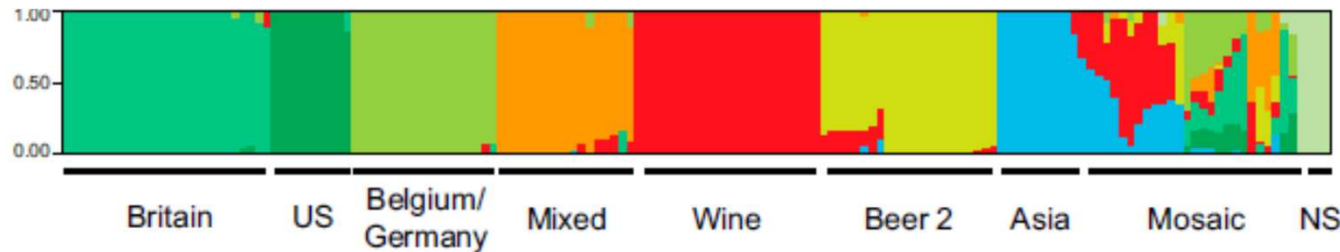
Candida braccarensis
223bp

univerzální
primer (konzervativní oblast 5.8S rDNA)



Studie populací *S. cerevisiae*

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

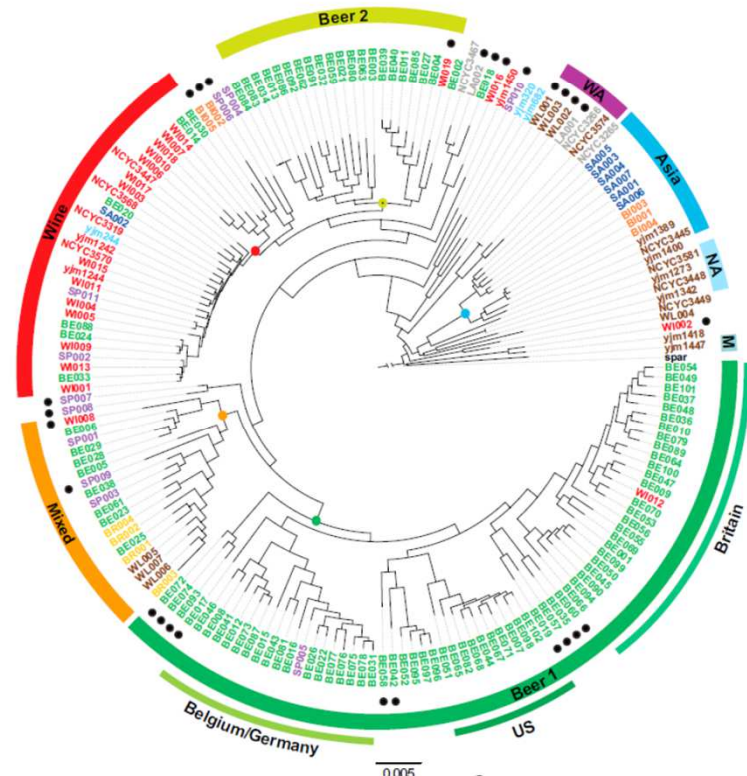


pivní linie ve VB, US, Belgii ... a další linie č.2

sake v Asii (i bioetanol v Číně)

mixed

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



Mosaikové kmeny

Gallone et al, Cell, 2016

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

Lineage

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



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

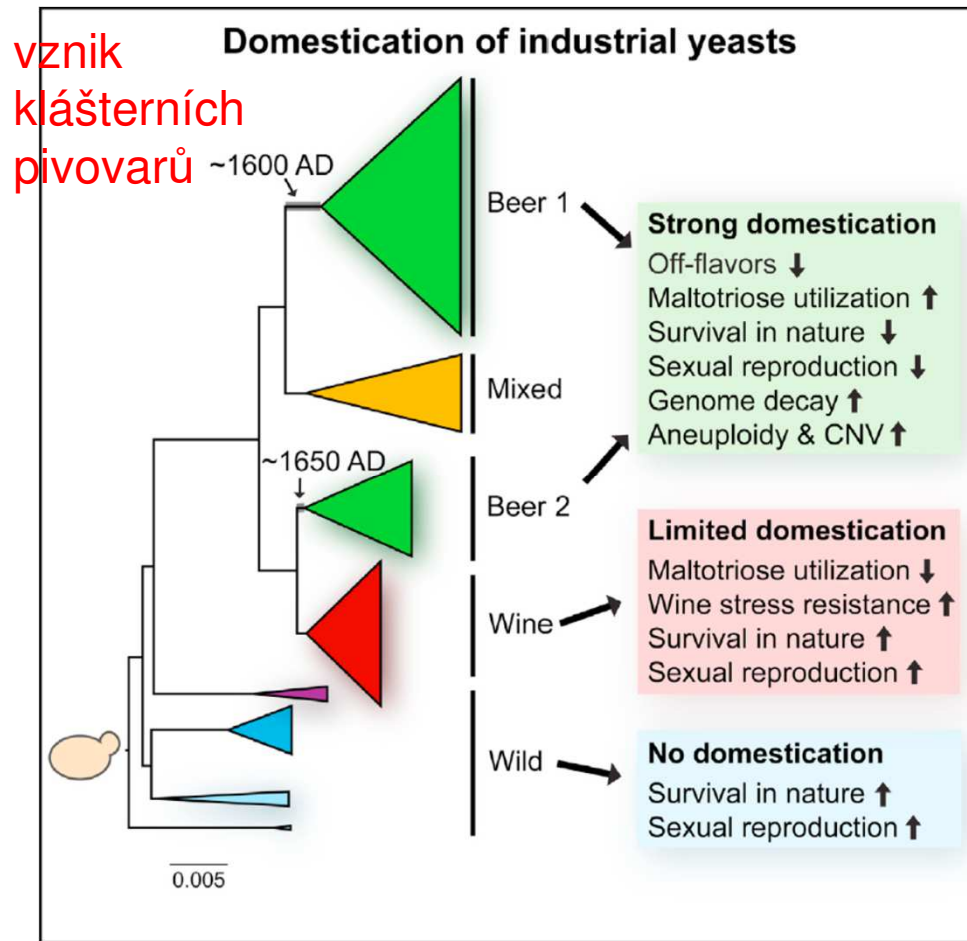
← *S. paradoxus* outgroup

← americké pivo má kořeny v Británii

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

analýza genomu a fenomu:

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

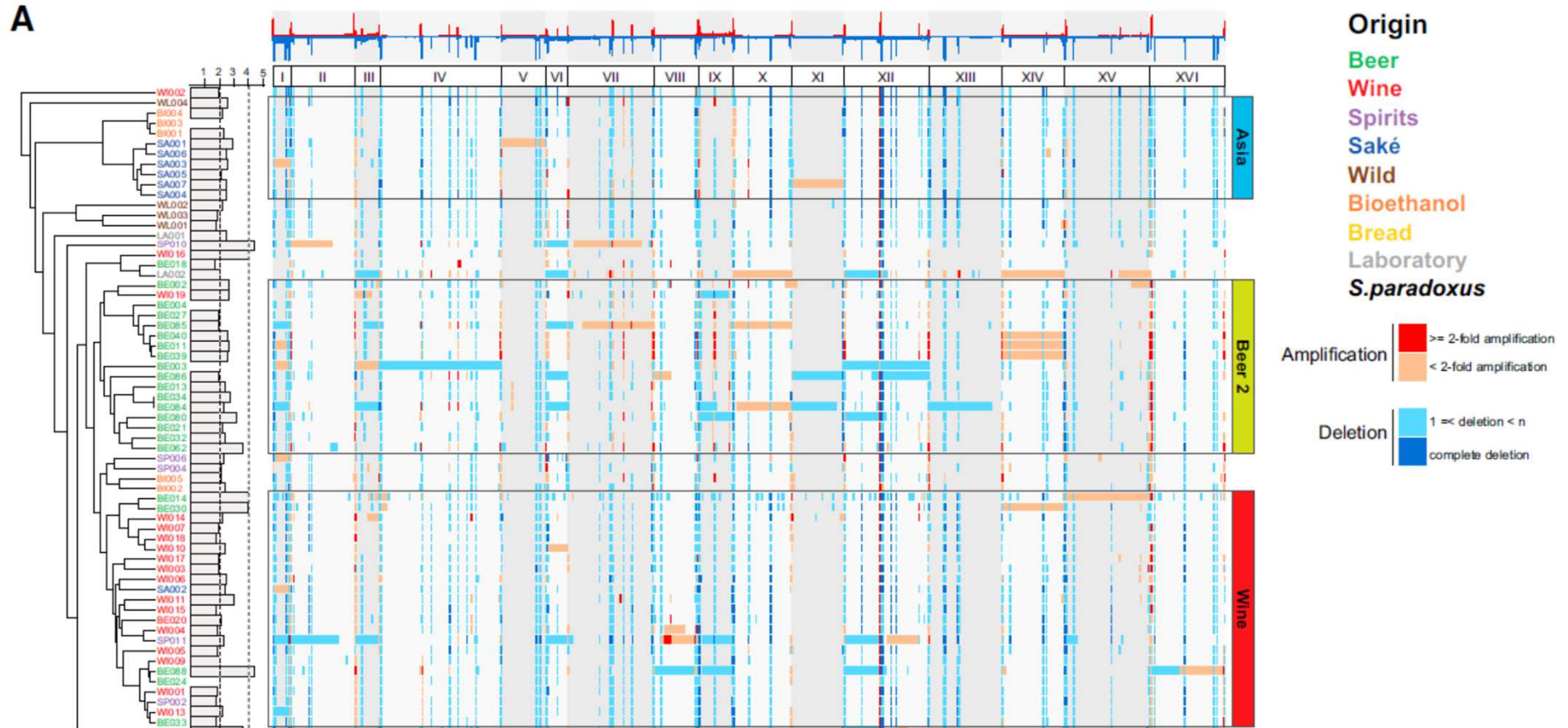


„očkovaním“ předchozích pivních kultur do nových kvasných procesů (ztráta kontaktu s přírodním prostředím - ~75 000 generací) – např. ztráta schopnosti sporulovat (stále bohaté médium), rychlejší evoluce ... nebo naopak zvýšení resistance vůči sulfátům (přidávaným kvůli konzervaci)

mutace a duplikace v MAL genech – zlepšení schopnosti utilizace maltosy

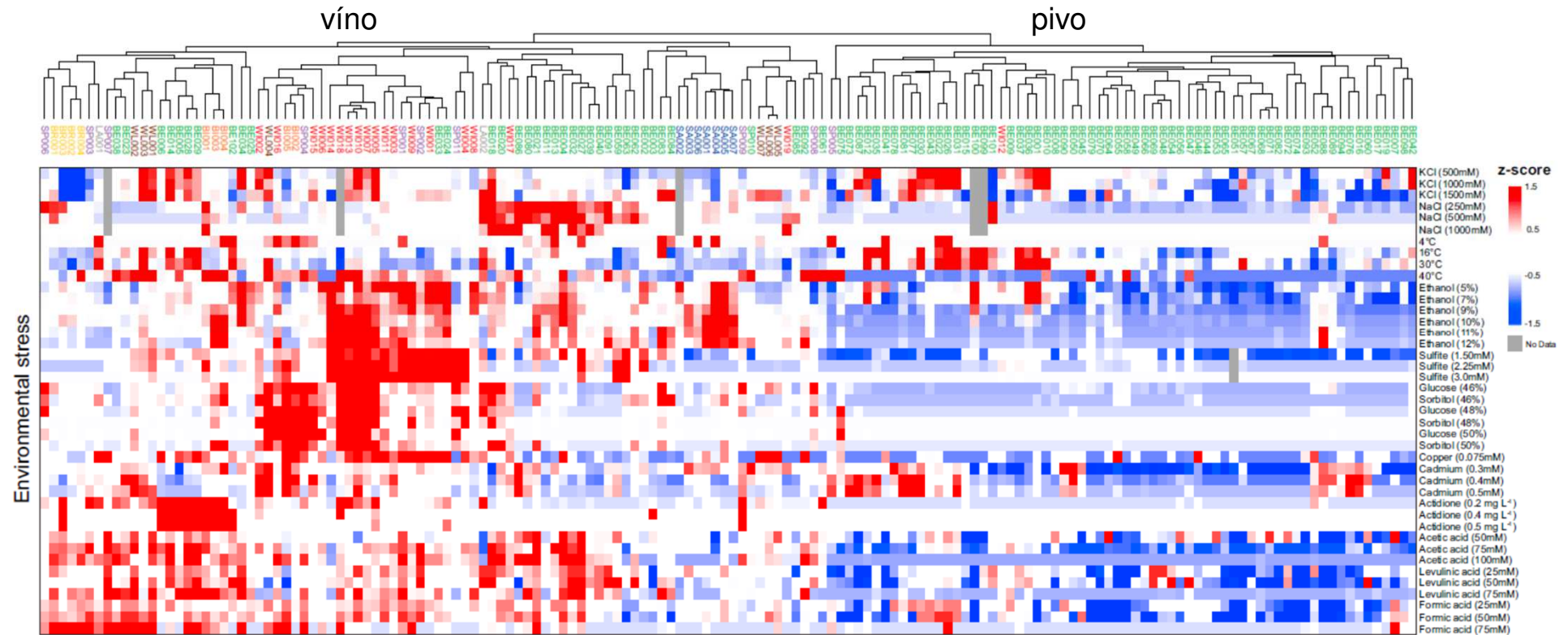
- nonsense mutace PAD1 a FDC1 (snížení produkce 4-vinyl guaiacolu odpovídajícího za nepříjemné aroma piva) ...

analýza genomu



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

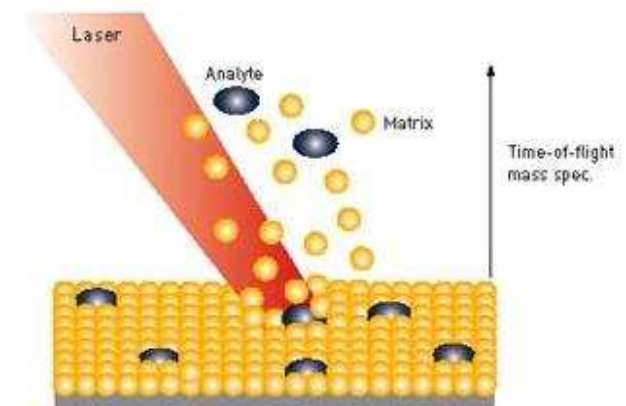
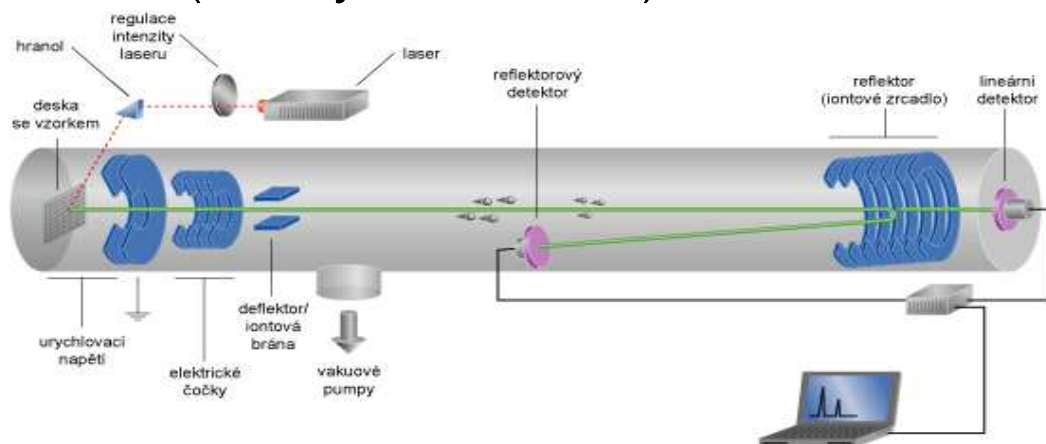
analýza fenomu



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

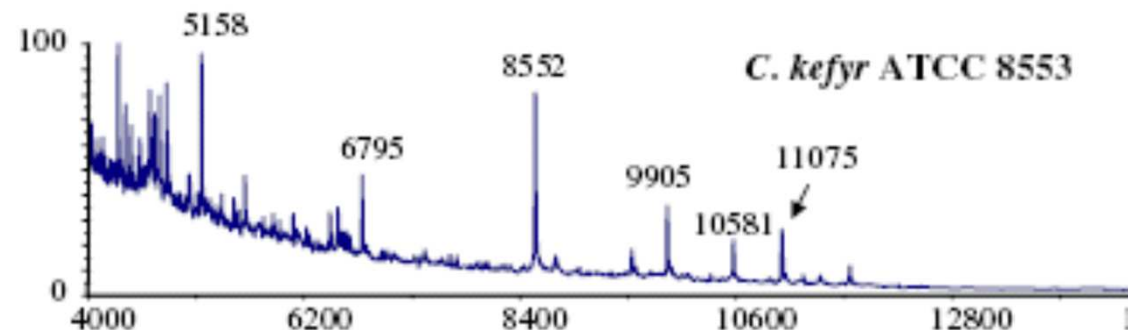
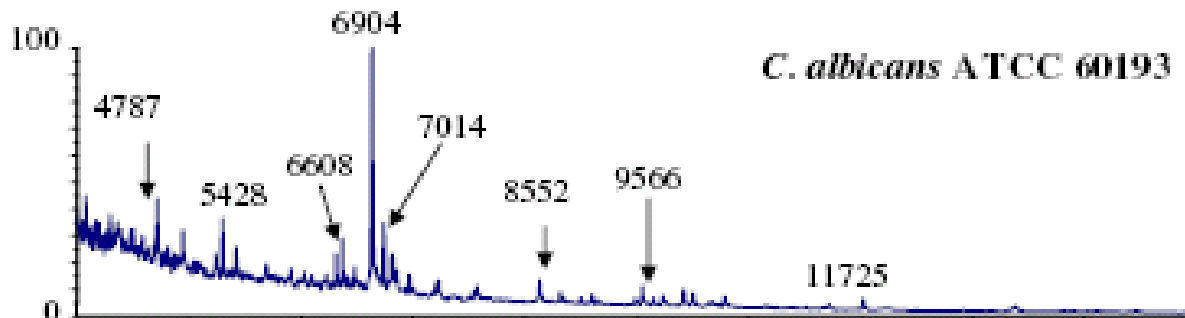
MALDI-TOF

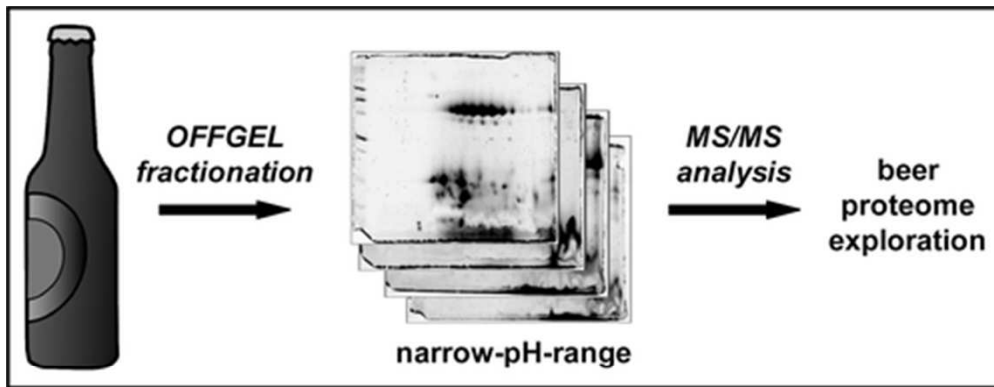
- hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry– MALDI-TOF)
- Umožňuje odpaření a ionizaci netěkavých biologických vzorků z pevné fáze přímo do plynné
- Vzorek je smíchán s tzv. matricí, směs se nanese na speciální kovovou destičku a nechá zaschnout
- Destička se vloží do iontového zdroje a ve vakuu je ozářena pulsním laserem (UV)
- energii laserového pulsu absorbuje matrice a předá ji molekulám analytu – odpaří se
- ion vstupuje do vakuu v trubici detektoru - z jeho pohybu vakuovaným prostorem lze vypočítat poměr jeho hmotnosti a náboje (z doby letu částice)



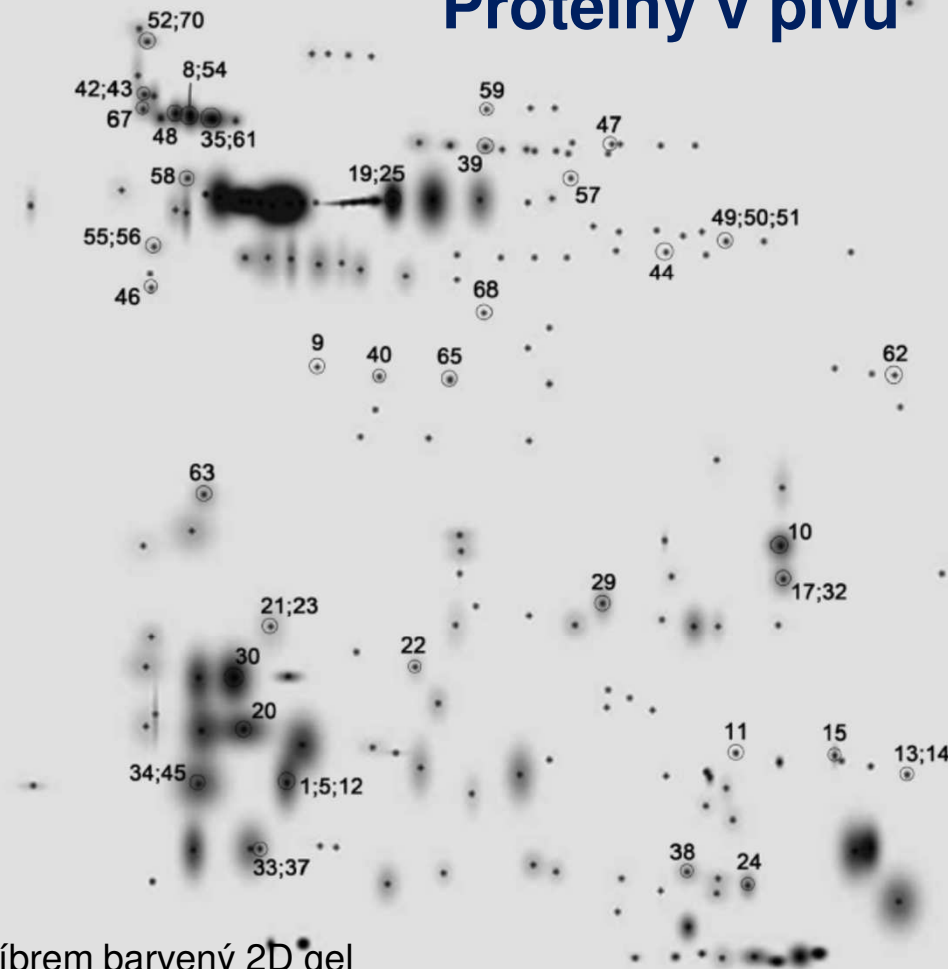
MALDI-TOF

- Charakter spektra závisí na krystalizaci a ionizačních vlastnostech vzorku → výška píku je rovna relativní koncentraci proteinu v místě ionizace
- Při srovnávání spekter druhů uvnitř rodu se hledají rodově charakteristické signály píků
- Identifikace na úroveň kmenů možná díky detekci charakteristických proteinů a peptidů





Proteiny v pivu

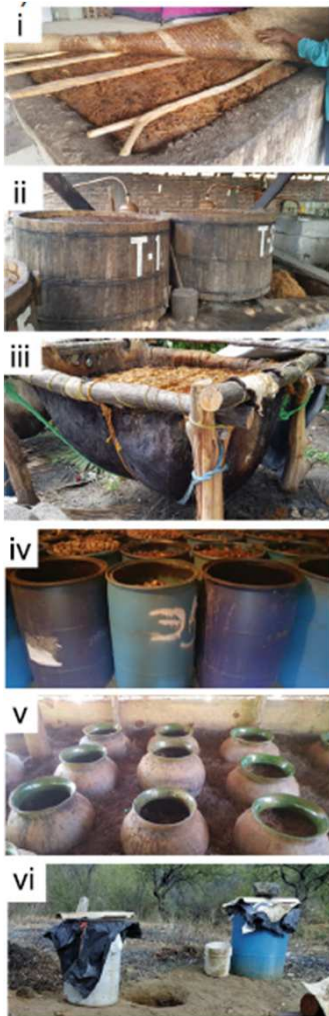


Stříbrem barvený 2D gel

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

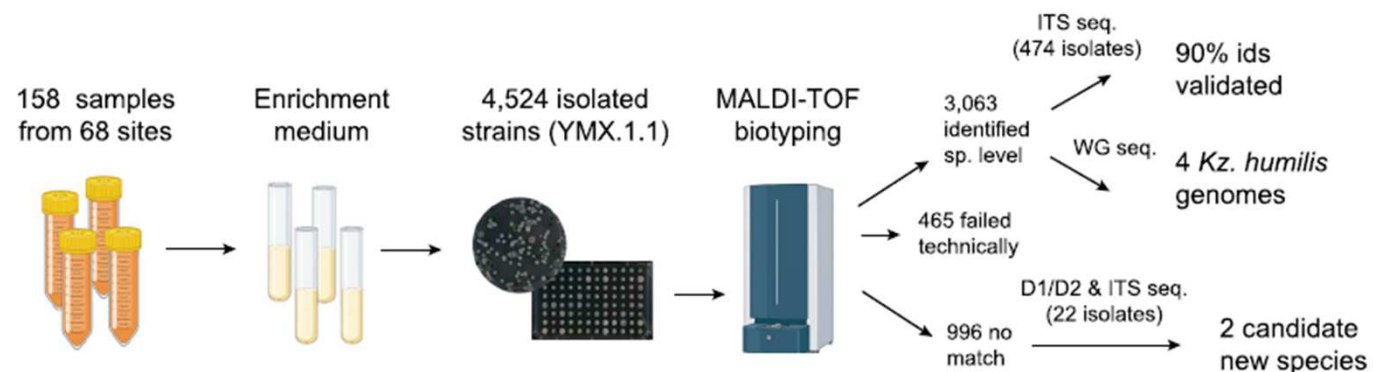
Rostliny a kvasinky

- především na kazících se plodech
- na spadlých rozkládajících se plodech (vinná réva, **agave** ...) tequila, mezcal, bacanora, raicilla

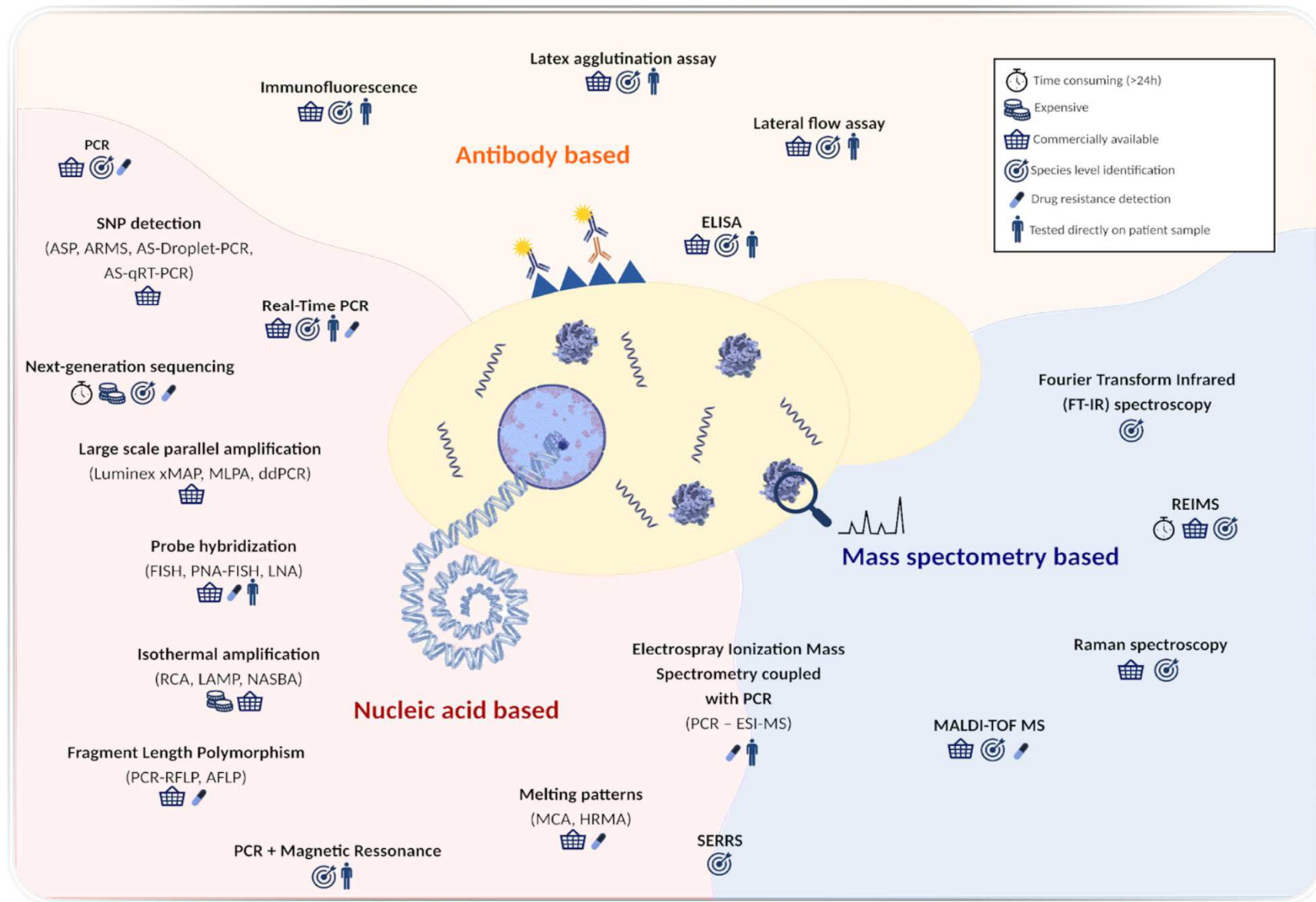


Take-away

- We isolated and identified 4524 yeast strains from open agave fermentations in Mexico.
- A core set of six yeast species was consistently found across diverse regions.
- *Kazachstania humilis* genomes differed significantly from those of isolates in other regions of the world.
- We report two candidate new species related to the *Pichia* clade.



Gallegos-Casillas et al, Yeast, 2023



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