

# Osnova

24.9.2009	10-12hod	Dr. Paleček	Úvod – houby, význam, historie, srovnání, <i>S. cerevisiae</i> a <i>S. pombe</i> , kultivace
1.10.2009	10-12hod	Dr. Paleček	Genetika a molekulární biologie kvasinek
8.10.2009	10-12hod	Dr. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces, HO endonukleasa, lokalizovaná exprese
15.10.2009	10-12hod	Dr. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
22.10.2009	10-12hod	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
29.10.2009	10-12hod	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt

...

...

...

...



- *Saccharomyces cerevisiae* apod. žijí/fermentují sladké šťávy ...

- *Tana pestroocasá* pije nektar z květu bertram palmy ...

PNAS 105, (2008), p.10426

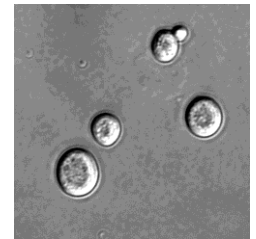
# ... trochu historie

- savci pili alkoholický nektar miliony let
- lidé vyráběli nápoje podobné dnešnímu pivu a vínu již před ~9000 roky (chleba před ~4000 lety)
- poprvé kvasinky pozoroval A. van Leeuwenhoek v roce 1680
- název Zuckerpilz („cukerná houba“) tj. *Saccharomyces* od roku 1837 (T. Schwann)
- L. Pasteur dokázal aktivní účast při kvašení (publikoval 1866, 1876)
- první čisté kultury *S. cerevisiae* izolovány z piva (E.Ch.Hansen) a z vína (Muller-Thorgau) v 80.letech 19. století (*cerevisiae* = pivo v latině, *pombe* = pivo ve swahili) ... M. Rees popsal a pojmenoval *S. ellipsoideus* (fermentuje ovocné šťávy)
- první systém pro klasifikaci (patogenních) kvasinek, založený na morfologii buněk a několika fyziologických testech (fermentace monosacharidů...) vytvořil A. Guilliermond v roce 1912

- ... nejintenzivněji studovaná eukaryotní buňka ...

- první (*S.c.*) kompletně osekvenovaný eukaryontní genom v dubnu 1996 (*S. pombe*, 2002; v současnosti osekvenovaných >25 druhů kvasinek, + *S.c.* populační genomika => SNP polymorfismus)

SGD databáze: <http://www.yeastgenome.org/>



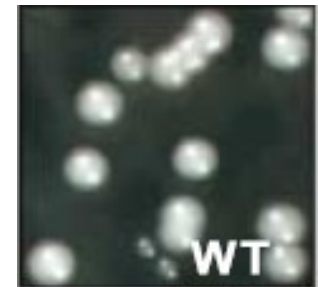
Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu (2001 – Nurse, Hartwell, Hunt)



Science 272 (1996), p.481 + Nature 458, (2009), p337

# Základní charakteristika kvasinek

- Eukaryota – rostlinný systém – vyšší houby (1500 druhů) – rozdělení dle způsobu pohlavního rozmnožování (asko-, basidio- a deuteromycetes + kvasinkové mikroorganismy)
  - Většinou jednobuněčné organismy (+ hyfy, + kolonie)
  - Nejčastěji kulaté a oválné (3-15 mikrometrů)
  - Množí se většinou pučením (+ jediné rod *Schizosaccharomycetes*: dělením - podlouhlé)
  - Zpracovávají zdroje uhlíku kvašením (vyjímky *Lipomyces* ...)



# Potřebují vodné prostředí, kyslík a živiny

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

$a_w$  = poměr tlaku vodních par nad substrátem (potravinou) a tlaku par destilované vody

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

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

Aktivitu vody lze snížit proslazováním nebo solením (marmelády, nasolování masa ... lze takto potlačovat i růst bakterií v kvasinkových izolátech)

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 %), na 10 % NaCl

# Podmínky růstu - kyslík

- Většina kvasinek je **fakultativně anaerobní** (vyžadují aspoň stopová množství kyslíku nezbytné pro syntézu některých esenciálních metabolitů – ergosterol, nenasycené mastné kyseliny)
  - fermentativní typy (*S.c.*, *S. p.*, rod *Brettanomyces*) - i v aerobních podmínkách fermentují (respirace i na glukóze představuje 10 % uhlíkového metabolismu)
  - respirativní typy (většina) – převládá energeticky výhodnější respirace nad fermentací
- **obligátorně aerobní** – nefermentativní typy (nemají alkoholdehydrogenázu - neprodukují ethanol) – rody *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Saccharomycopsis*
- teploty, při nichž mohou kvasinky růst:
  - mezofilní (0 – 48 C) – většina druhů
  - psychrofilní (-2 – 20 C) – voda, půda v Antarktidě (některé *Leucosporidium*, *Cryptococcus*, *Candida*)
  - 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 (jsou schopny hydrolyzovat i polysacharidy jako škrob, xylany či celulozu ... nebo methanol, alkany apod.)
- Zdrojem dusíku jsou amonné ionty a aminokyseliny



Laboratorní podmínky:

YPD – bohaté médium = 10g/l yeast extract, 20g/l pepton, 20g/l dextrose (2% glukosa)

SD – minimální (syntetické) médium = 6.7g/l yeast nitrogen base w/o amino acids (aminokyseliny se přidávají dle potřeby), 20g/l dextrose (2% glukosa)

# 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*)
- **na listech rostlin, květech** (červené kvasinky rodu *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, černá *Aureobasidium pullulans*)
- **na kazících se plodech . . .** (zahnívající kaktusy => pektolytické bakterie => kvasinky *Pichia cactophila*, *P. opuntiae* => přenos a výživa drosofila)
- **přenášeny hmyzem** (izolována *Metschnikowia orientalis* nalezena v květech a přenášena čmeláky na Cookových ostrovech, Int J Syst and Evol Microbiology, 2006)
- **v půdě** (mnohem méně než bakterií, do 15cm hloubky – naproti tomu v Antarktadě jsou dominantní; podobné kmeny jako na listech či ovoci – *Schwanniomyces*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*, schopny hydrolyticky štěpit cellobiosu, lignin nebo produkty bakteriálního metabolismu)

# Význam

-praktický –

- výroba piva, vína, etanolu a pekařského droždí (*S.c.*), různé kmeny pro spodní a svrchní kvašení, vinařské a lihovarské
- krmná biomasa (*Candida utilis*), příprava mléčných výrobků (*Candida kefyr*, *Kluyveromyces lactis*), získávání ergosterolu (prekurzor vitamínu D), zdroj komplexu vitamínů skupiny B ...
- štěpení škrobu amylytickými enzymy (*Saccharmycopsis fibuligera*, *Schwanniomyces occidentalis*)
- štěpení dřevní hmoty (*Aureobasidium*, *Candida utilis*)

-lékařský – 15 druhů je potenciálními lidskými patogeny (vyvolávají onemocnění u oslabeného organismu – imunosupresiva, cukrovka ...- antibiotika na eukaryota nezabírají) – více prof. Svoboda

- Kandidózy (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C.glabrata*, *C. krusei*, *C. 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 tzv. pityriázy (lupy)
- 3 druhy *Trichosporon* (kůže)

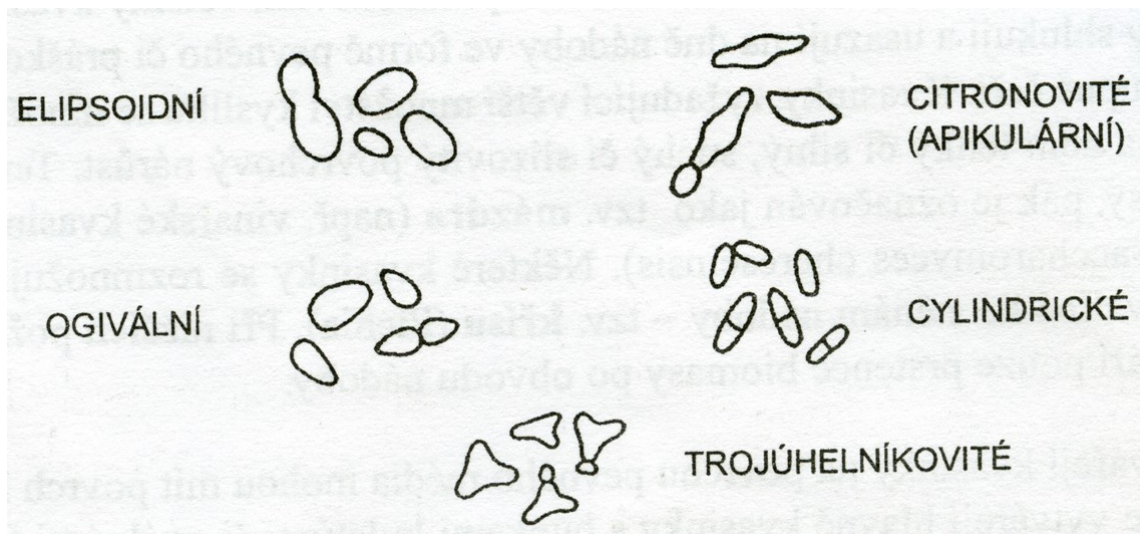
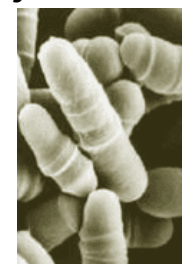
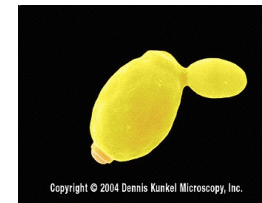
-výzkumný – *S. cerevisiae* a *S.pombe* jsou modelovými organismy

- Rychle rostoucí eukaryontní buňka ...
- Metody využívající kvasinek (2-H, FASAY)
- Expres proteinů (posttranslační modifikace, štěpení ... hepatitis B core antigen)



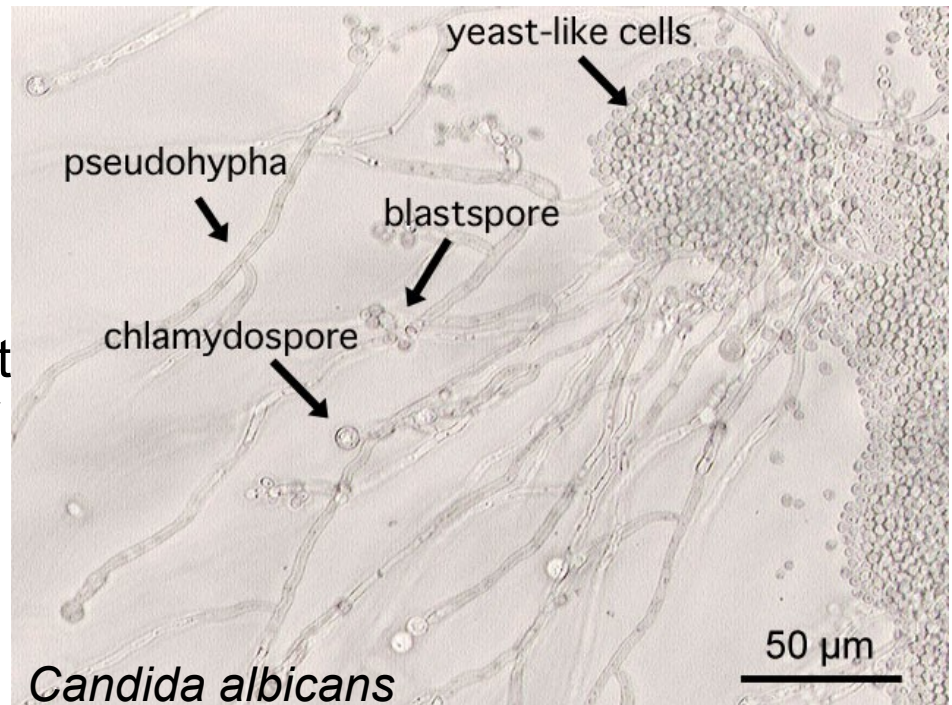
# Morfologie kvasinek

- rotační elipsoid, kulaté, protáhlé – rod *Dipodascus* až 130 mikrometrů
- 3-15 mikrometrů (bakterie < kvasinky < savčí buňky)
- u jednoho druhu (haploidní < diploidní < polyploidní)
- Tvar souvisí se způsobem vegetativního rozmnožování:
  - Většinou pučení – monopolární (rod *Malassezia*), bipolární (střídavě na obou pólech = citronovitý tvar) nebo multipolární (*Saccharomyces*, kdekoli, ale nikdy ne na stejném místě), na sterigmě (pupen spojen s mateřskou buňkou úzkou stopkou)
  - jedině *Schizosaccharomycetes* přehrádečné dělení
  - Zvláštní tvar má za některých kultivačních podmínek rod *Trigonopsis*



# Morfologie kvasinek-hyfy

- Nedojde-li při pučení k úplnému oddělení dceřinné buňky, zůstávají buňky spojeny a vytváří se tzv. pseudomycelium (na rozdíl od mycelia má zaškrcení)
- Poslední buňka pseudomycelia je nejmenší = pupen (v myceliu je největší = roste a dělí se přehrádečně)
  - vždy se jedná pouze o jednu z možností vegetativního rozmnožování (při nedostatku živin) – za jiných kultivačních podmínek se množí pučením (jednobuněčná forma)
- Na koncích (i mezi buňkami) mohou vznikat spory (blastospory), které se dále množí pučením –
- rozpad mycelia na valcovité buňky (arthrospory) rod *Trichosporon* – balistospory na stopkách u *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*
- Nevykazují zvýšenou odolnost jako u bakterií – těm se podobají spíše chlamydo-spory (nižší odolnost)



# Morfologie kvasinek-spory

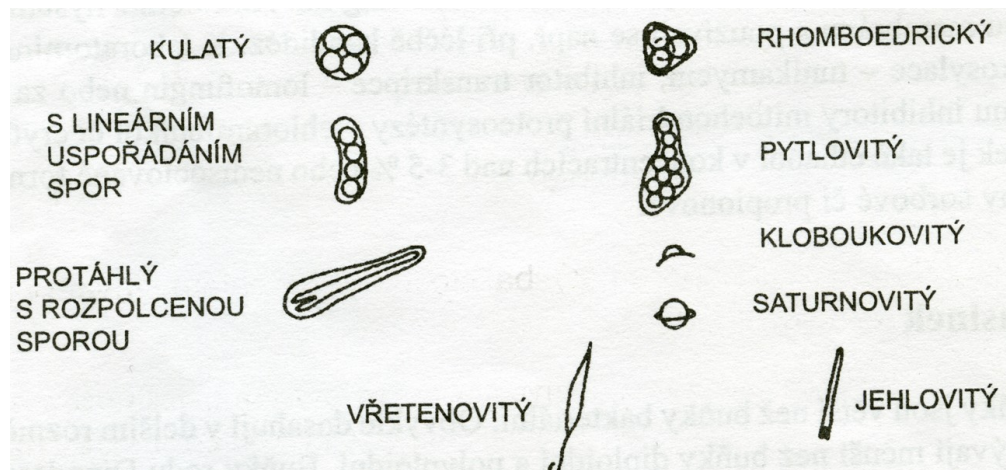
- Haploidní spory askomycetových kvasinek vzniklé při sporulaci diploidních buněk (pohlavní rozmnožování)

*Saccharomyces*

*Schizosaccharomyces*

*Metschnikowia*

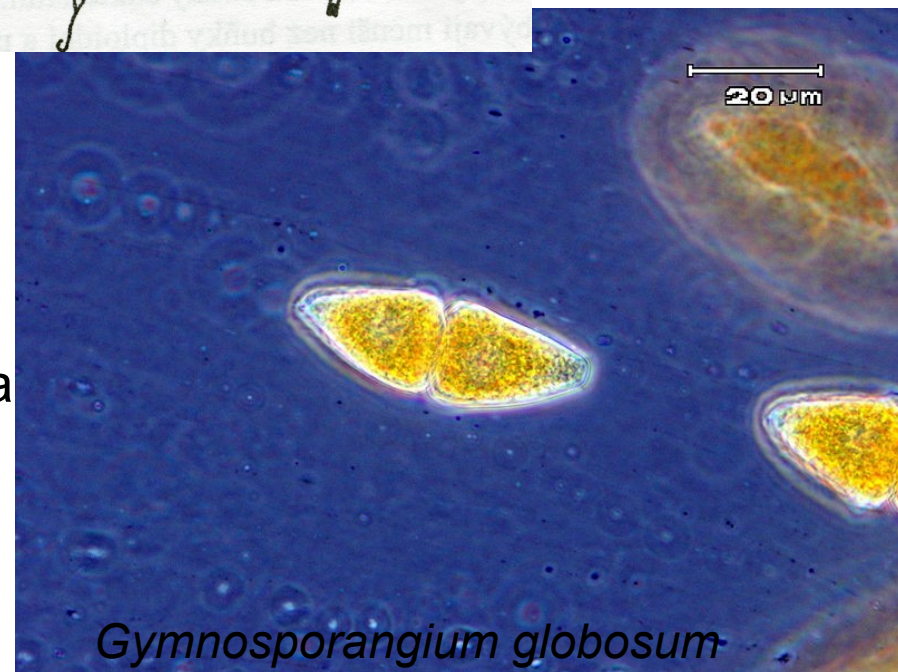
*Nematospora*



*Lipomyces*

*Hanensula*

- Teliospory vznikají v životním cyklu basidiomycetes – při splynutí jader v buňce dvoujaderného mycelia



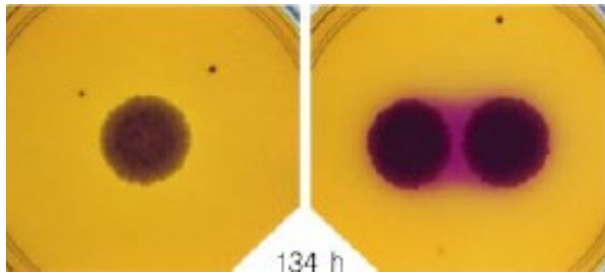
# Kolonie – na povrchu pevného média

- hladké kolonie – kulaté a oválné buňky (*S.c.*)
- drsné kolonie – protáhlé buňky (*Pichia*)
- slizovité kolonie – pouzdra (*Lipomyces*)
- obvykle krémová barva –

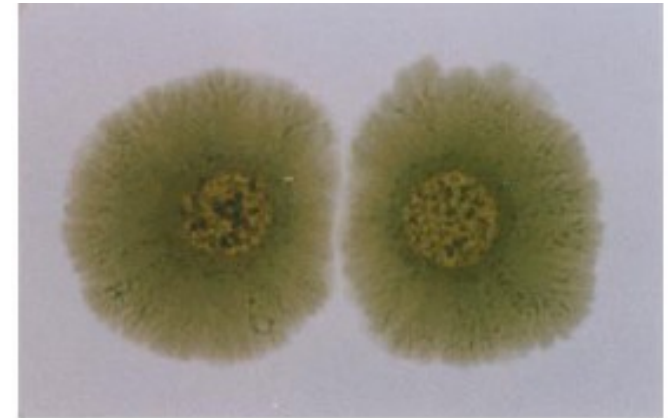
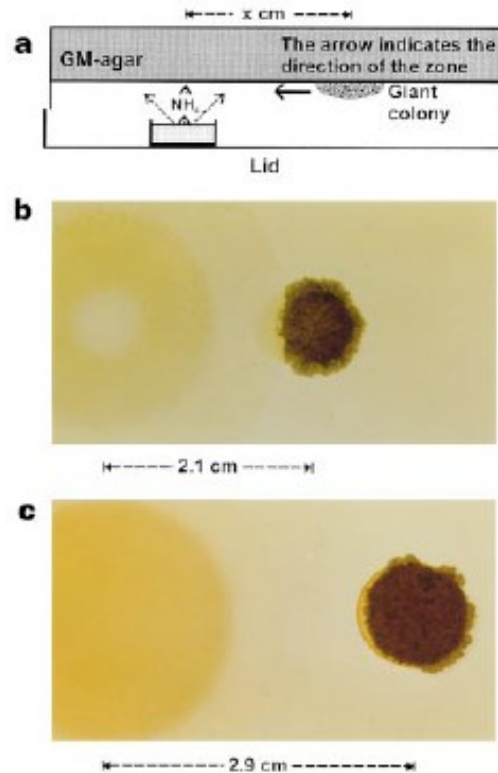
červený pigment (*Rhodotorula*, *Sporidiobolus*) – černý pigment (melanin – *Aureobasidium*)



Kvasinkové kolonie spolu „komunikují“ pomocí amoniaku – inhibuje růst sousední kolonie



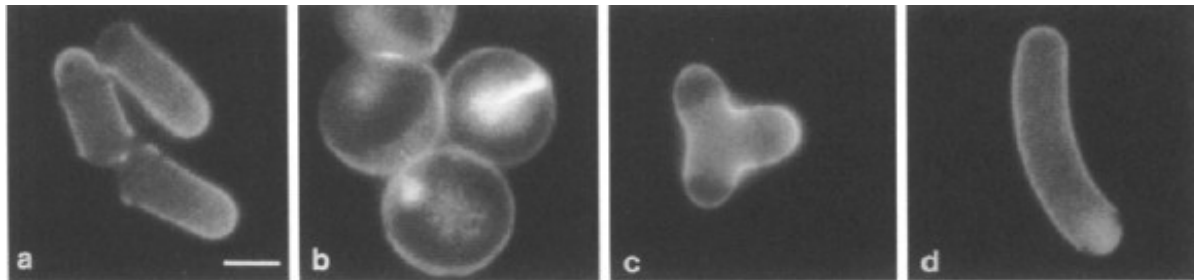
Aktivní inhibice růstu  
sousední kolonie nikoli  
(pasivní) důsledek  
spotřebování živiny



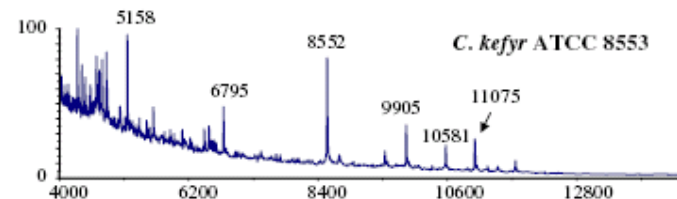
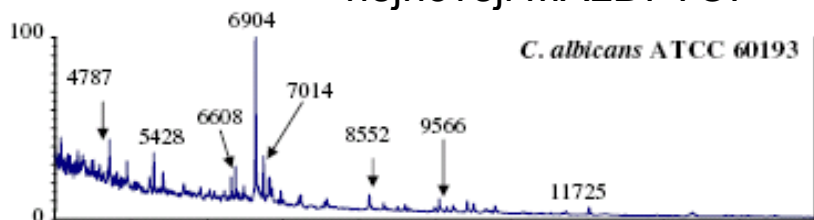
kolonie přesměrovává růst  
sousední kolonie –  
nekompetují o živiny -

# Identifikace kvasinek

- Eukaryota – rostlinný systém – vyšší houby (Eumycota)
  - rozdělení dle způsobu pohlavního rozmnožování (asko-vřecko, basidio-stopkovýtrusé a deuteromycetes; basidiosporogenní produkují ureasu – na močovině s fenolčervení se barví červeně ...)
  - dále dle morfologie, fermentace atd. (viz předchozí kritéria)
  - konvenční taxonomie je ovšem problematická :
    - morfologie kvasinek není stabilní→ různé varianty kvasinek náležejí do jednoho rodu
    - Většinu fyziologických charakteristik lze zvrátit mutací v jediném genu



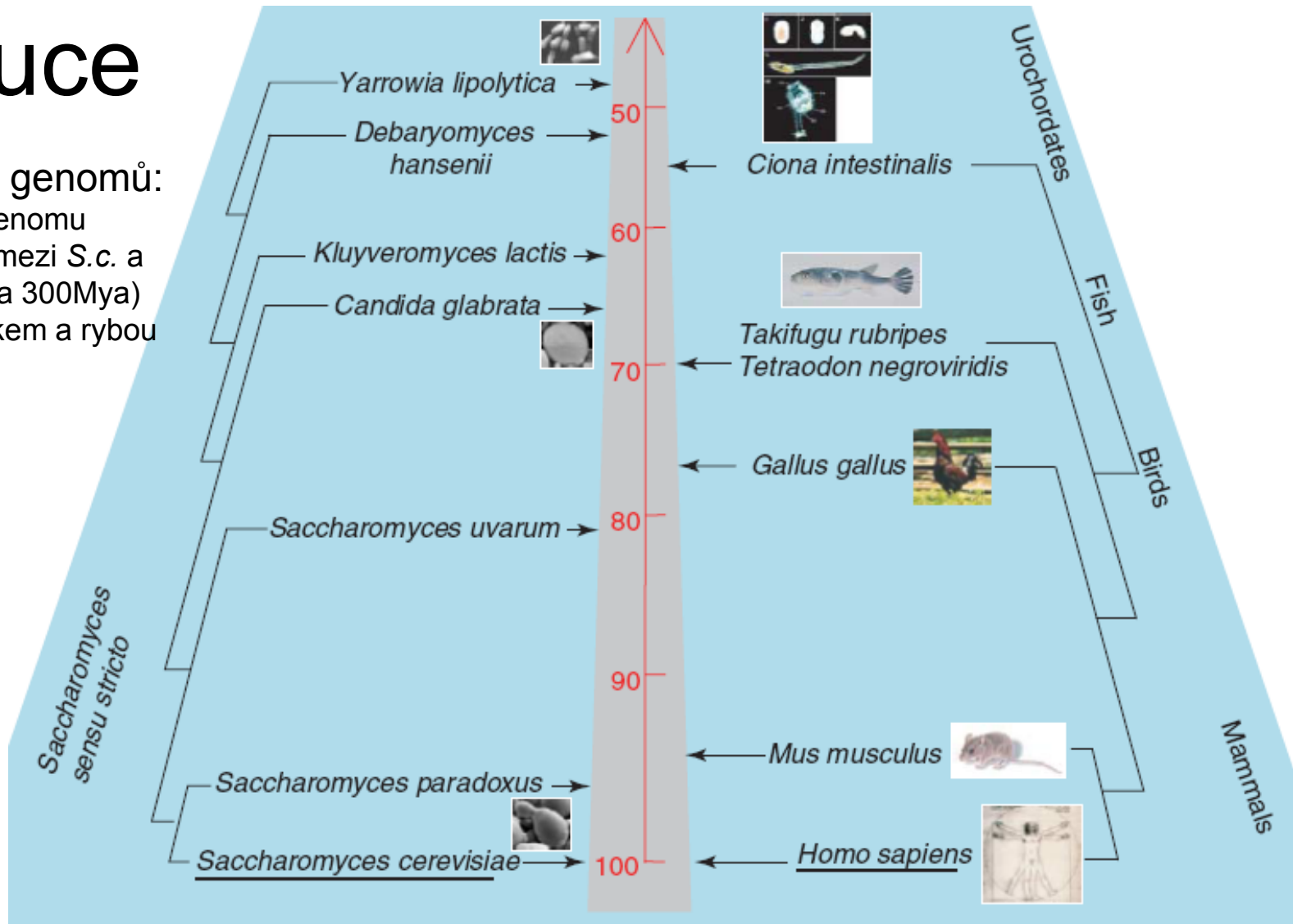
- molekulární taxonomie (navíc pro komerční účely je třeba odlišit kmeny druhu *S.c.*)
- karyotyp pomocí pulsní gelové elektroforézy, restrikční polymorfismus chromosomální nebo mitochondriální DNA, PCR analýza (nejčastěji PCR-RFLP = restriction fragment length polymorfism – 26S rDNA)
- nejnověji MALDI-TOF



Přes značnou morfologickou podobnost vykazují kvasinky velké rozdíly v genomu

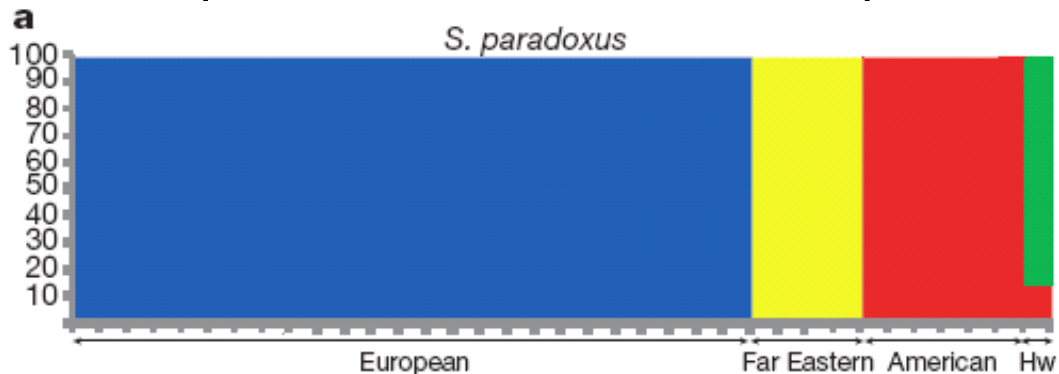
# Evoluce

Porovnání  
kompletních genomů:  
Velký rozdíl v genomu  
kvasinek např. mezi *S.c.* a  
*S.p.* je větší (cca 300Mya)  
než mezi člověkem a rybou



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

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



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

