



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDĚM  
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

23.9.2010	10-11.30hod	Dr. Paleček	Úvod – houby, význam, historie, kultivace
30.9.2010	10-11.30hod	Dr. Paleček	Metody studia, genetika a molekulární biologie kvasinek
7.10.2010	10-11.30hod	Prof. Farkaš	Buněčná stěna
14.10.2010	10-11.30hod	Dr. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces, HO endonukleasa, lokalizovaná exprese
21.10.2010	10-11.30hod	Dr. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
28.10.2010	státní svátek		
4.11.2010	10-11.30hod	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
11.11.2010	10-11.30hod	prof. Svoboda	Sekreční dráhy a endocytóza
18.11.2010	10-11.30hod	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
25.11.2010	8-12hod	prof. Svoboda+Dr.Paleček - Cvičení k přednášce	
2.12.2010	8-12hod	prof. Svoboda+Dr.Paleček - Cvičení k přednášce	
9.12.2010	10-11.30hod	Dr. Paleček	Organizace chromatinu a oprava DNA
16.12.2010	8-12hod	Dr. Paleček	Zkouška

# ... trochu historie

- savci pili alkoholický nektar miliony let (PNAS, 2008)
- lidé vyráběli nápoje podobné dnešnímu pivu a vínu již před ~9000 roky (chleba před ~4000 lety) ...

- *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

# ... trochu historie

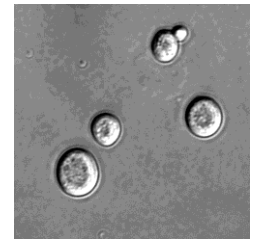
- savci pili alkoholický nektar miliony let (PNAS, 2008)
- lidé vyráběli nápoje podobné dnešnímu pivu a vínu již před ~9000 roky (chleba před ~4000 lety)
- poprvé kvasinky pozoroval A. van Leeuwenhoek v roce 1680
- název Zuckerpilz („cukerná houba“) tj. *Saccharomyces* od roku 1837 (T. Schwann)
- L. 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
- v Československu prof. Kratochvilová ...
- ... nejintenzivněji studovaná eukaryotní buňka ...

- první (*S.c.*) kompletně osekvenovaný eukaryotní 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





# 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*, *Cryptococcus*, schopny hydrolyticky štěpit cellobiosu, lignin nebo produkty bakteriálního metabolismu)

- naproti tomu v Antarktidě jsou dominantní
- výzkum v letech 2003-4: Izolovány 2x asco- a 16x basidiomyceta (7x nové druhy)

Conell et al., *Microb Ecol* 56 (2008)

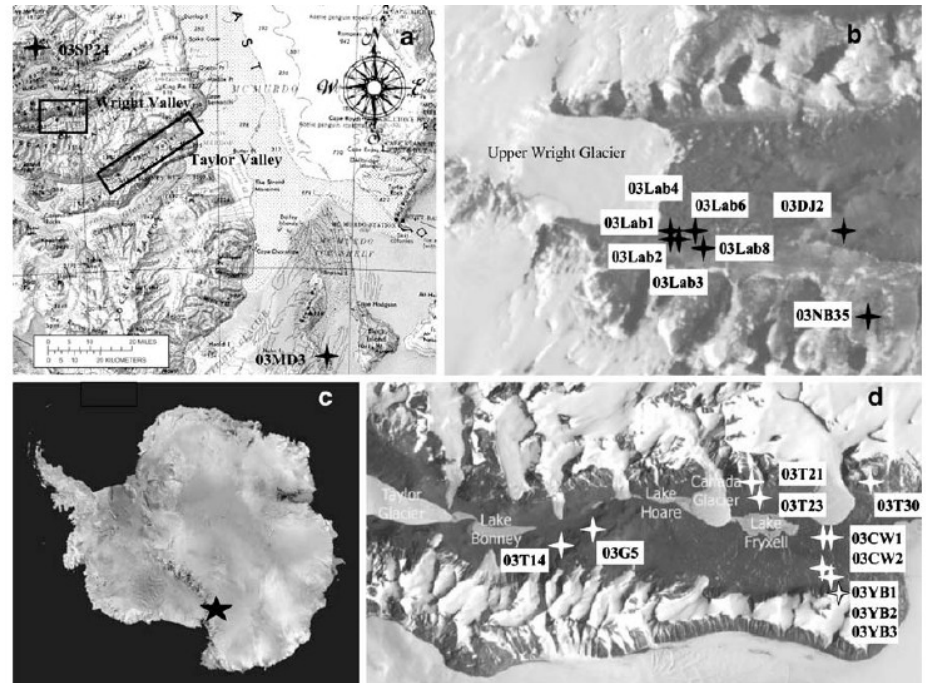


Figure 1 Sample site locations in South Victoria Land, Antarctica (2003–2004). Sites are identified by stars and labels. The entire study area with specific sites 03SP24 and 03MD3 is shown in (a). Sites in Wright

Valley are shown in (b) and Taylor Valley in (d). The location of the study area on the Antarctic continent is indicated with a star in (c)

**Table 2** Species isolated from Southern Victoria Land soil

Species	Site isolated	Isolate number	GenBank accession	Closest match	Percent match
<i>Clavispora lusitaniae</i> <sup>a</sup>	03YB2	CBS 10625	EU149777	AY321475	99
<i>Cryptococcus nyarrowii</i>	03T21	CBS 10614	EU149778	AF400697	100
	03T23	CBS 10632	EU149780		
	03YB2	CBS 10740	DQ402536		
	03YB2	ANT 03-028	EU149779		
<i>Cryptococcus saitoi</i>	03DJI	CBS 10631	EU149783	AF444372	99
	03Lab1	CBS 10628	EU149782		
	03Lab2	CBS 10630	DQ402537		
	03Lab6	CBS 10618	EU149781		
<i>Cryptococcus</i> sp 1	03YB1	ANT 03-149	EU149784	AB035045	94
<i>Cryptococcus carnescens</i>	03 G5	CBS 10755	EU149786	AB035050	99
	03CW1	CBS 10634	EU149785		
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	03Lab8	CBS 10619	EU149787	AF145325	100
<i>Cryptococcus vishniacii</i>	03Lab3	CBS 10616	EU149788	AF145320	100
<i>Debaryomyces hansenii</i> <sup>a</sup>	03Lab1	CBS 10629	EU149790	EF222227	100
	03Lab4	CBS 10751	EU149791		
	03T23	CBS 10686	EU149789		
<i>Dioszegia</i> sp 1	03CW2	CBS 10623	EU149792	AB049613	95
	03YB1	ANT 03-101	EU149793		
<i>Dioszegia</i> sp	2 03CW2	CBS 10637	EU149798	AF444379	91
<i>Leucosporidium</i> sp 1	03MD3	CBS 10633	EU149802	AF444529	87
	03T14	CBS 10684	EU149803		
	03T30	CBS 10641	EU149804		
<i>Leucosporidium</i> sp 2	03MD3	CBS 10638	EU149805	AF444529	96
	03CW1	CBs 10639	EU149806		
<i>Leucosporidium</i> sp 3	03MD3	CBS 10620	EU149807	AF444529	85
<i>Leucosporidium</i> sp 4	03MD3	CBS 10636	EU149808	AF444529	97
	03YB2	CBS 10640	EU149809		
<i>Mrakia stokesii</i>	03T30	CBS 10622	EU149810	AF144486	100
<i>Rhodosporeidium kratochvilovae</i>	03Lab6	CBS 10617	DQ402534	AF444520	100
<i>Rhodotorula laryngis</i>	03T23	CBS 10621	EU149811	AF444617	98
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	03NB35	CBS 10685	DQ402533	AF444635	99
	03SP24	CBS 10752	EU149812		

Representative isolates with ITS GenBank accession numbers are listed. Isolates currently in the CBS collection are noted using the CBS accession number. The accession number of the closest match to described species listed in GenBank are shown

<sup>a</sup>Members of Ascomycota

# Přirozený výskyt

- **na kazících se plodech** (na spadlých plodech ... schopny hydrolyticky štěpit cellobiosu, lignin nebo produkty bakteriálního metabolismu - zahnívajcí kaktusy => pektolytické bakterie => kvasinky *Pichia cactophila*, *P. opuntiae* => přenos a výživa drosofila)
- **na listech rostlin, květech** (nektar palmy Bertramové ... červené kvasinky rodu *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Sporobolomyces*, černá *Aureobasidium pullulans*,)
- **přenášeny hmyzem** (v zažívacím traktu mušek *Drosophila* z potravy, izolována *Metschnikowia orientalis* nalezena v květech a přenášena čmeláky na Cookových ostrovech, Int J Syst and Evol Microbiology, 2006)



- Kvasinky nalezeny 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, že 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 ;-))
- kvasinky tvoří jen malou část stálé mikroflóry ve střevě - méně než 0,1 % mikroflóry

- nejčastěji je z gastrointestinálního traktu izolována *C. albicans*
- kůže, ústní dutina, sputum, vaginální sekrety, výtěry zvukodů, moč, stolice ...

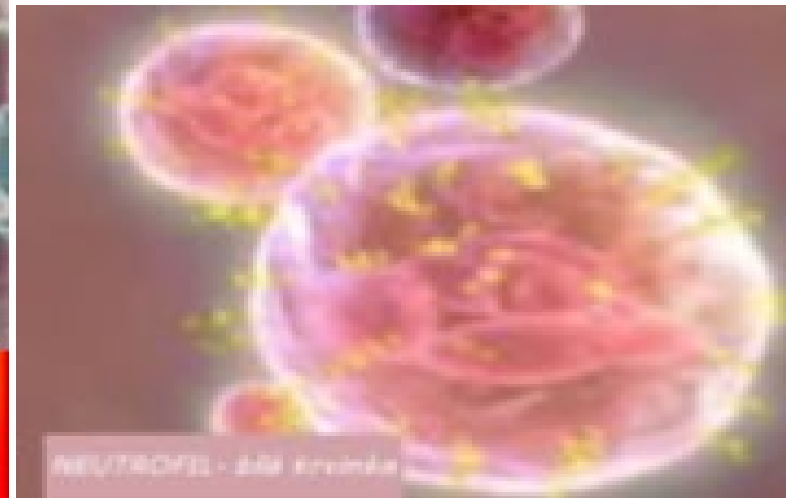




-*Saccharomyces boulardii* – izolován z čínské švestičky Lyči - nepatogeni kolonizace střev (pouze dočasná) - používán jako probiotikum při střevních potížích (Enterol) - ochrana proti patogenům (*Salmonella typhimurium*) – modulují imunitní systém, inhibují účinky bakteriálních toxinů

-Immiflex – obsahuje beta 1-3,1-6 glukany z buněčných stěn kvasinek *S.c.* – aktivují imunitní systém (neutrofilů) a zvyšují tak obranyschopnost organismu

-Pangamin – kvasinkové lyzáty – vitaminy, nenasycené mastné kyseliny, minerály ...





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

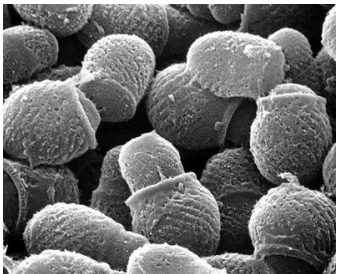
-Kandidózy (*C. albicans, dubliniensis, krusei, tropicalis, parapsilosis, glabrata, utilis, lipolytica*)

-*Candida albicans* – urogenitální a krevní infekce (vyskytuje se u člověka přirozeně)

-*Cryptococcus neoformans* – 8% AIDS pacientů – plicní onemocnění až do mozku - (přenáší švábi a holubi – kreatinin z trusu používají jako zdroj dusíku)

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

-3 druhy *Trichosporon* (kůže)



*Malassezia furfur*  
pityriasis versicolor



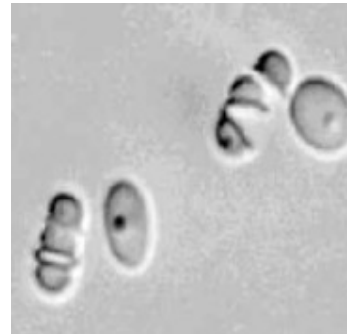
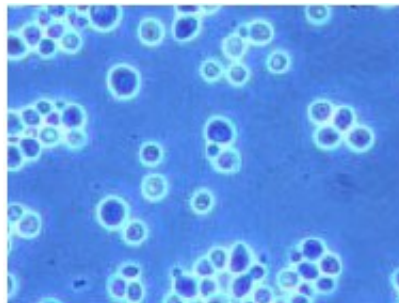
# Význam

## -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 kefir*, *Klyuveromyces lactis*), získávání ergosterolu (prekurzor vitamínu D), zdroj komplexu vitamínů skupiny B ...
- štěpení škrobu amylytickými 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*)

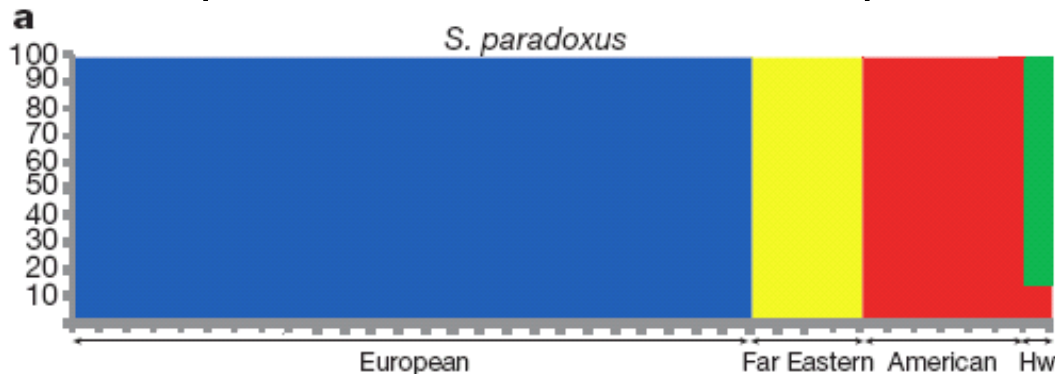
## -výzkumný

- *S. cerevisiae* a *S.pombe* jsou modelovými organismy
- Rychle rostoucí eukaryotní buňka ...
- Metody využívající kvasinek (2-H, FASAY)
- Expres proteinů (posttranslační modifikace, štěpení ... hepatitis B core antigen, antithrombin proti srážení krve; *Pichia pastoris*)

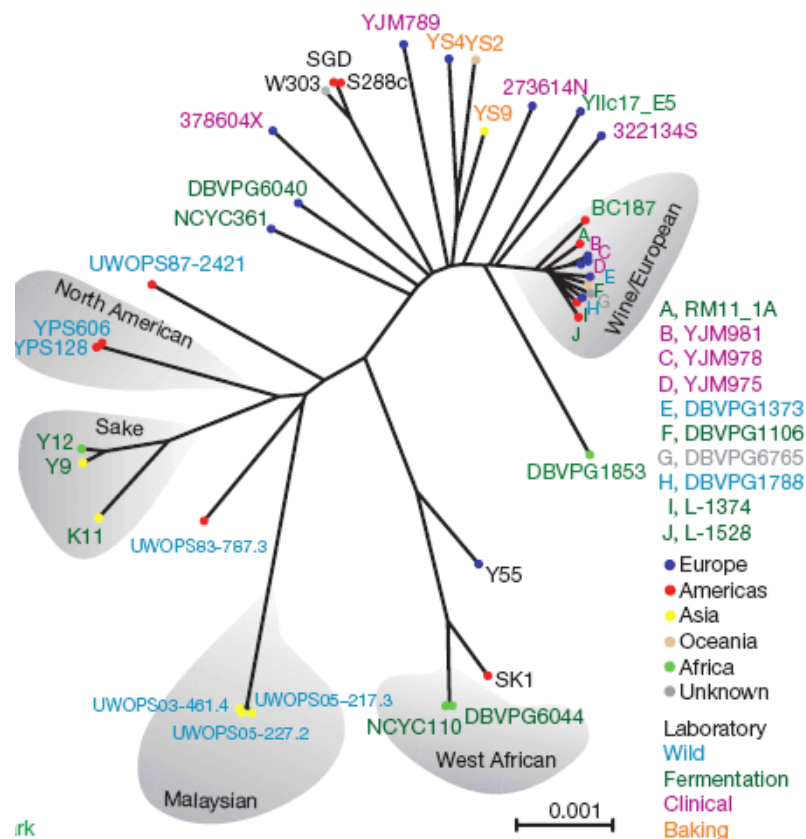
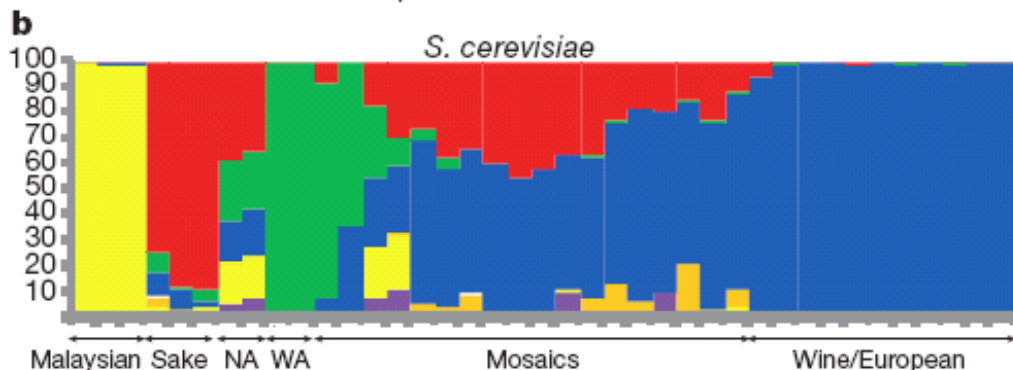


# Studie populací *S. cerevisiae* a *S. paradoxus*

- 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 ...

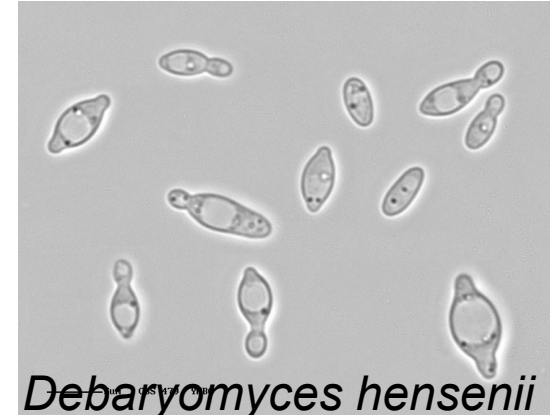


# Potřebují vodné prostředí, kyslík a živiny

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
- **obligátně 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 (*Pichia pastoris*), 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)

c. Ansy  
Synetické SD médium = 6.7g/l yeast nitrogen base w/o amino acids (aminokyseliny se přidávají dle potřeby), 20g/l dextrose (2% glukosa)

Minimální agarová půda = 5g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1g/l  $\text{KH}_2\text{SO}_4$ , 0,5g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 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)

# Základní charakteristika kvasinek

-Eukaryota – rostlinný systém – vyšší houby (1500 druhů) – rozdělení dle způsobu pohlavního rozmnožování (asko-, basidio- a deuteromycetes + kvasinkové mikroorganismy)

-Lineage › cellular organisms

› Eukaryota

› Fungi/Metazoa group

říše › Fungi

› Dikarya

oddělení › Ascomycota

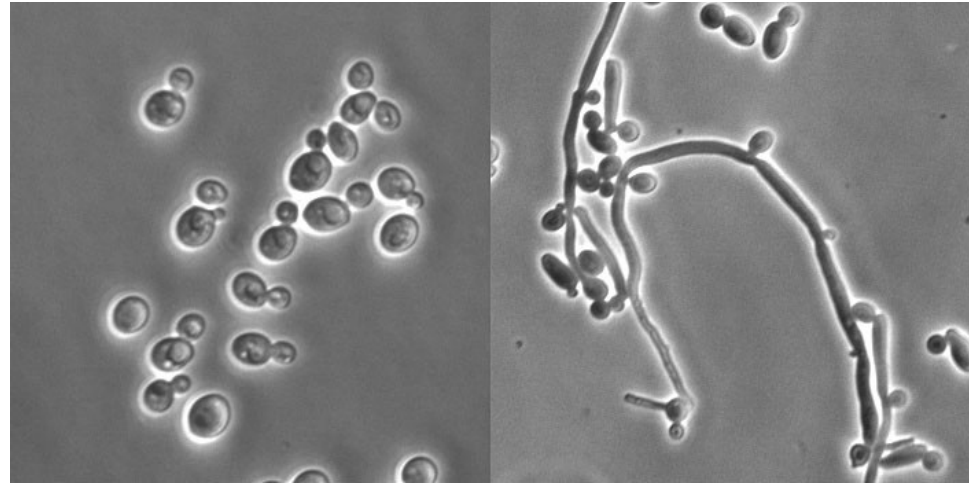
› Saccharomycotina

› Saccharomycetes

řád › Saccharomycetales

čeleď › Saccharomycetaceae

rod › Saccharomyces

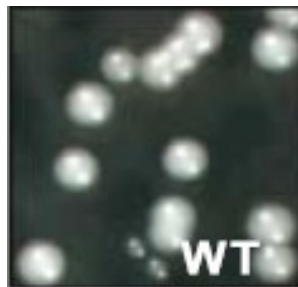


-Většinou jednobuněčné organismy (+ hyfy, + kolonie)

-Nejčastěji kulaté a oválné (3-15 mikrometrů)

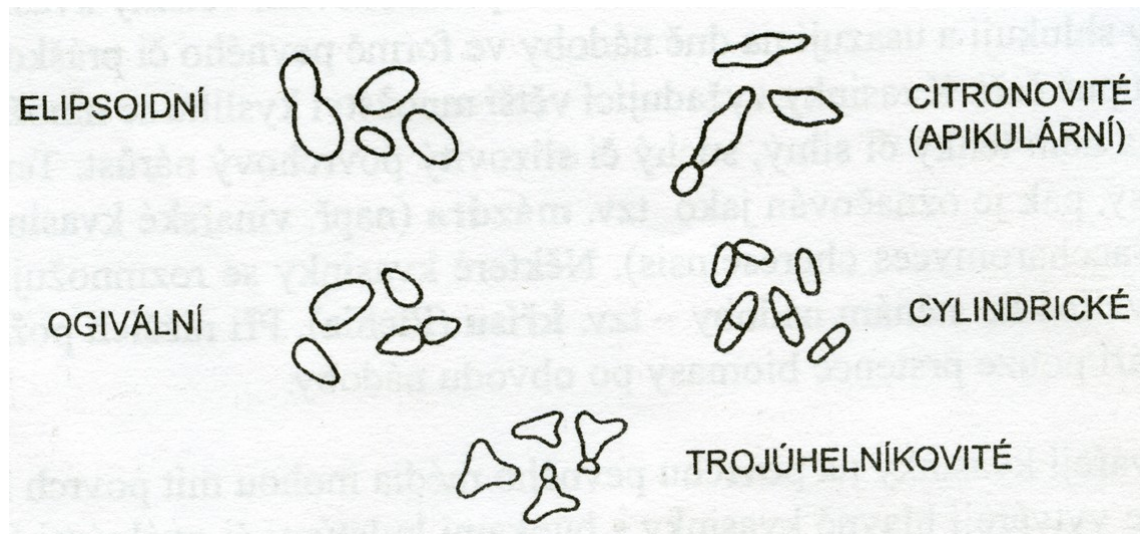
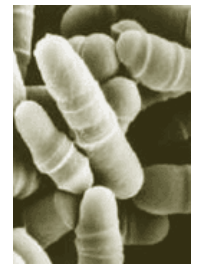
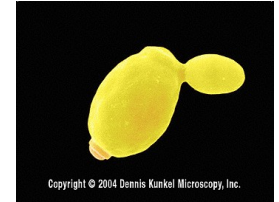
-Množí se většinou pučením (+ jedině rod *Schizosaccharomycetes*: dělením - podlouhlé)

-Zpracovávají zdroje uhlíku kvašením (vyjímky *Lipomyces* ...)



# Morfologie kvasinek

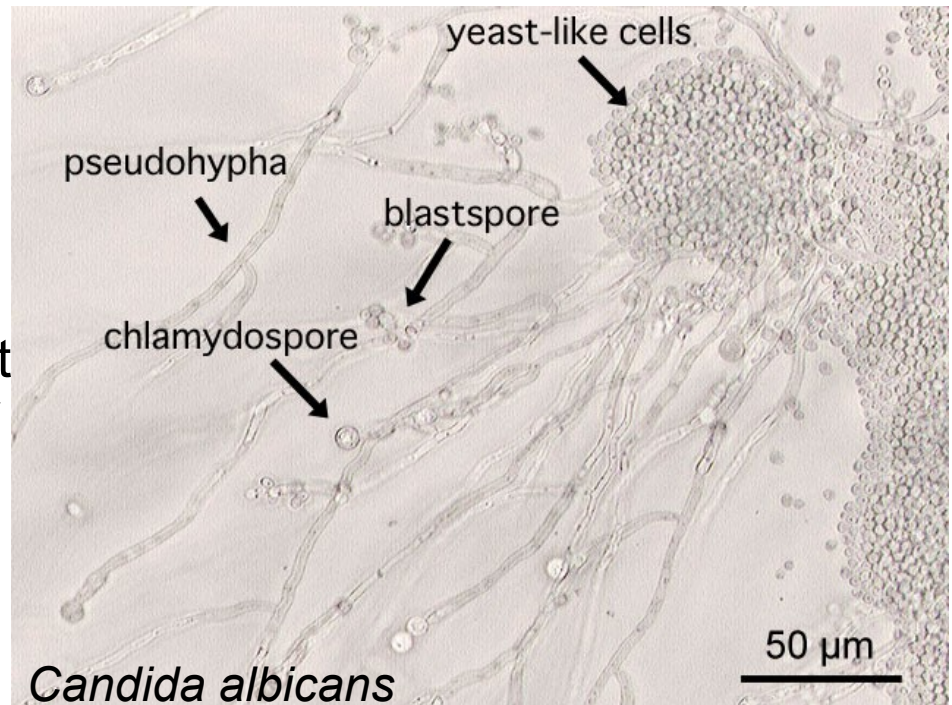
- rotační elipsoid, kulaté, protáhlé – rod *Dipodascus* až 130 mikrometrů
- 3-15 mikrometrů (bakterie < kvasinky < savčí buňky)
- u jednoho druhu (haploidní < diploidní < polyploidní)
- Tvar souvisí se způsobem vegetativního rozmnožování:
  - Většinou pučení – monopolární (rod *Malassezia*), bipolární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

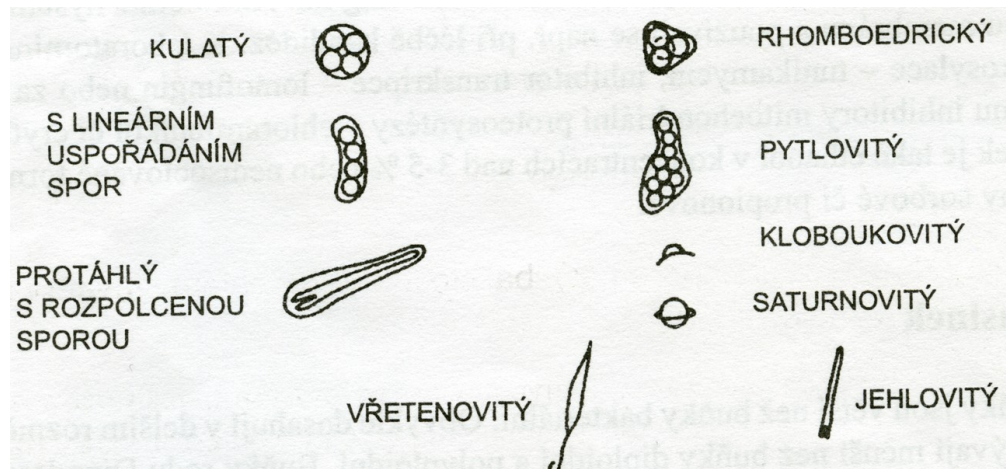
- Haploidní spory vřeckovýtrusných kvasinek vzniklé při sporulaci diploidních buněk (pohlavní rozmnožování)

*Saccharomyces*

*Schizosaccharomyces*

*Metschnikowia*

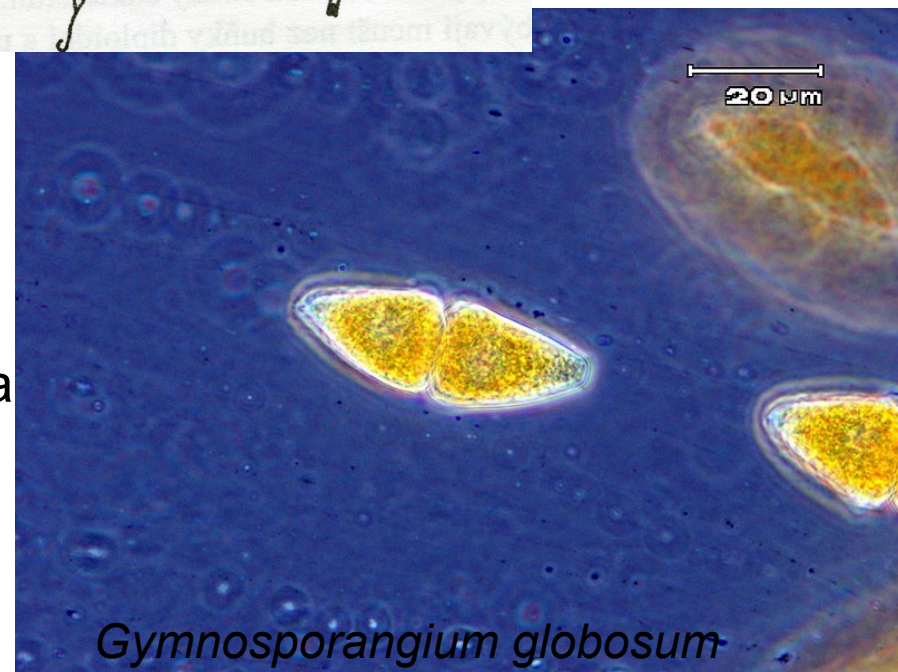
*Nematospora*



*Lipomyces*

*Hanensula*

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



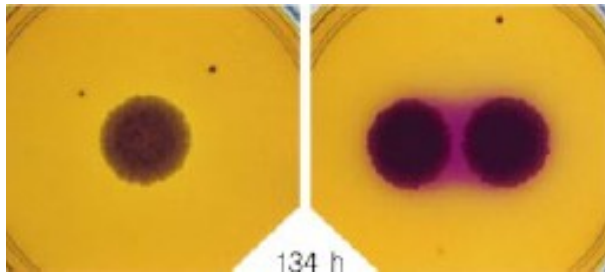
# Kolonie – na povrchu pevného média

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

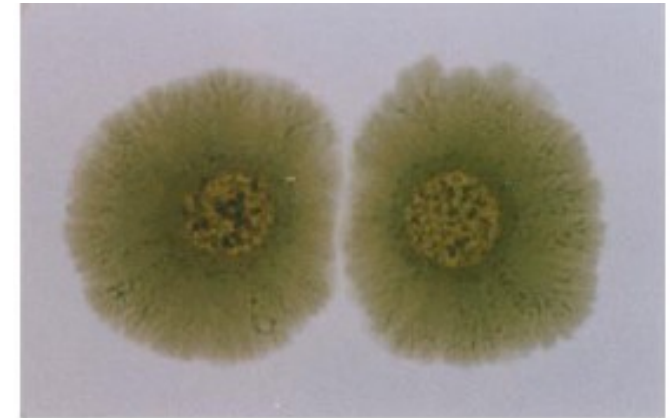
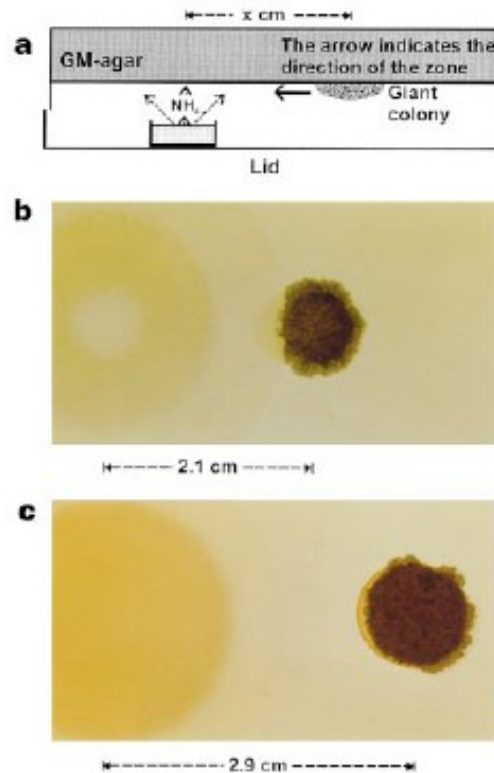
červený pigment (*Rhodotorula*, *Sporidiobolus*) – černý pigment (melanin – *Aureobasidium*)



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

- Kombinace morfologických, fyziologických a biochemických parametrů.
- Morfologie – rozlišení jednotlivých druhů. Charakteristika tvaru, velikosti, povrchu..., asexuální a sexuální struktury,...
- Biochemické parametry – určení jednotlivých rodů – asimilace a fermentace cukrů, utilizace dusíkatých látek, hydrolýza urei, teplotní studie....
  
- rozdělení dle způsobu pohlavního rozmnožování (asko-vřecko, basidio-stopkovýtrusé a deuteromycetes; basidiosporogenní produkují ureasu – na močovině s fenolčervení se barví červeně ...)

