



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Bi9040 - Biologie kvasinek





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



22.9.2011	10-11.30hod	Dr. Paleček	Úvod – historie, význam ...
29.9.2011	10-11.30hod	Dr. Paleček	Metody studia kvasinek
6.10.2011	10-11.30hod	Dr. Paleček	Genetika a molekulární biologie kvasinek
13.10.2011	10-11.30hod	Dr. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces, HO endonukleasa, lokalizovaná exprese
20.10.2011	10-11.30hod	Dr. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
27.10.2011	10-11.30hod	Dr. Paleček	Organizace chromatinu a oprava DNA
3.11.2011	10-11.30hod	prof. Svoboda	Sekreční dráhy a endocytóza
10.11.2011	10-11.30hod	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
17.11.2011	statní svatek		
24.11.2011	8-12hod	prof. Svoboda+Dr.Paleček - Cvičení k přednášce	
1.12.2011	8-12hod	prof. Svoboda+Dr.Paleček - Cvičení k přednášce	
8.12.2011	10-11.30hod	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
15.12.2011	8-12hod	Dr. Paleček	Zkouška x pozvaný host

Po přednášce umístím na IS

Informační zdroje

Janderová & Bendová: Úvod do biologie kvasinek, nakladatelství Karolinum (1999)
... nejnovější články z časopisů Cell, Nature, Science, PNAS ...

F. Sherman, Getting started with yeast, *Methods Enzymol.* **350**, 3-41 (2002):
http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/StartedYeast.html

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

WIKIpedie ...

The screenshot displays a Windows Internet Explorer browser window. The title bar reads "Saccharomyces cerevisiae S288C Genome: 37 kbp from chr01:123,000..160,000 - Windows Internet Explorer". The address bar contains "http://browse.yeastgenome.org/fgb2/gbrowse/scgenome/". The browser's menu bar includes "Soubor", "Úpravy", "Zobrazit", "Obilíbené položky", "Nástroje", and "Nápověda". The main content area shows the SGD website's "Community Info" page. On the left, there is a sidebar with "Search Options" (Advanced Search, YeastMine, Full-text Search, etc.), "Help Resources" (Getting Started, Sitemap, FAQ, etc.), "Analysis & Tools" (BLAST, GBrowse, etc.), "Homology & Comparisons" (PDB Homologs, etc.), "Function & Expression" (Protein Info, Pathways, etc.), and "GO Resources" (GO Tutorial, etc.). The main content area features a "Search SGD Colleagues" section, "Yeast Laboratories", "Colleague Submission/Update", "Biosci Yeast Archives", "Community wiki", and "Career Resources". On the right side of the browser window, a separate window displays a genomic map for a 37 kbp region, with genes CEN1, ADE1, and PHO11 labeled. The taskbar at the bottom shows the Start button, several open applications (Microsoft Office, Thunderbird, etc.), and the system clock at 9:12.

Laboratoř S. Forsburg

Pombe Technology - Windows Internet Explorer

http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/plasmids.html#972

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené položky Nástroje Nápověda

pdfforge explore with YAHOO! SEARCH Search PDFCreator eBay Amazon Options

Pombe Technology - Windows Internet Explorer

http://www-bcf.usc.edu/~forsburg/plasmids.html#972

Soubor Úpravy Zobrazit Oblíbené položky Nástroje Nápověda

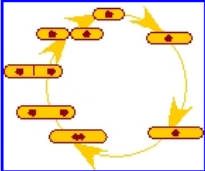
pdfforge explore with YAHOO! SEARCH Search PDFCreator eBay Amazon Options

Oblíbené položky Navrhované weby Acer Home desktop.ini Free Hotmail Galerie oblasti Web Slice Lenovo _eská republika Novorozenecká _loutenka ... Navrhované weby

Pombe Technology Macrogen Online Sequencing... I-TASSER results

Stránka Zabezpečení Nástroje

The Forsburg Lab *pombe* Pages: Working with fission yeast



This part of the Forsburg Lab website contains technical information of use to people who study *S. pombe*. Visit our [home page](#) for a directory to this pombe site, or the [list of frequently asked questions](#) for fast answers to common questions. If you want to browse practical information about working with fission yeast, you're in the right place.

Page contents

On this page:

- Commonly used selectable [markers](#).
- A note about [nomenclature](#).
- A [summary](#) of promoter activity and expression systems
- Info on [primer design](#) for amplification of open reading frames.
- How to construct plasmids for [cross-complementation](#) experiments
- [The almanac](#) of useful constants and numerical values for pombe
- [ade6 mutant alleles](#) that may be hanging out in your strains
- The "wildtype" 972: where did it come from?
- [Restriction site usage in *S. pombe* genome](#). **NEW!**
- [Protocols](#) for pombe, including flow cytometry, colony PCR, working with diploids, disruptions and integrations, DAPI staining, and plasmid shuffle. Also includes links to other protocol pages.

Other pages on our site: follow these links to find

- [Frequently asked questions](#) about working with pombe
- [PombeWeb](#), including fission yeast lab home pages, faculty listings, meetings, genomics, and all the pombe-related links we can find.
- [Community news](#), including newsbites, committee info, and postdoc ads
- An index of fission yeast [plasmids](#), including general plasmid information, sequences, and maps (the vector database).
- A list of useful [technical references](#) for fission yeast molecular genetics.
- [Genome project information](#) for fission yeast
- [Sequence analysis sites](#) including Sanger, the Blast servers and analysis tools
- [Recipes](#) for fission yeast media
- [Drugs](#) for fission yeast, including selection/counterselection and DNA damaging agents
- Want to know the equivalent *S. cerevisiae* genes for *S. pombe* cell cycle genes? Visit our new [gene conversion table](#).
- [Where to get strains and plasmids](#)

Internet 100% 9:35

- savci pili alkoholický nektar miliony let (PNAS, 2008)



- *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

- přirozeně v prostředí mohou fermentovat sladké šťávy (např. nektar ...)
- lidé vyráběli nápoje podobné dnešnímu pivu a vínu již před ~9000 roky (chleba před ~4000 lety)

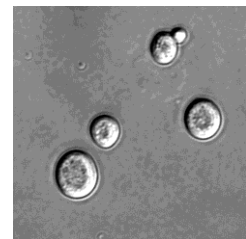


- poprvé kvasinky pozoroval A. van Leeuwenhoek v roce 1680
- název Zuckerpilz („cukerná houba“) tj. *Saccharomyces* od roku 1837 (T. Schwann)
- L. Pasteur prokázal aktivní účast při kvašení (publikoval 1866, 1876)
- první čisté kultury *S. cerevisiae* izolovány z piva (E.Ch.Hansen) a z vína (Muller-Thorgau) 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 (buněčný cyklus ...)
- *S. cerevisiae* první kompletně osekvenovaný eukaryotní genom (1996) (*S. pombe*, 2002; v současnosti osekvenovaných >25 druhů kvasinek)
- Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu (2001 – Nurse, Hartwell, Hunt)



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 (méně bakterií)
- výzkum v letech 2003-4: Izolovány 2x asco- a 16x basidiomyceta (7x nové druhy)

Conell et al., Microb Ecol 56 (2008)

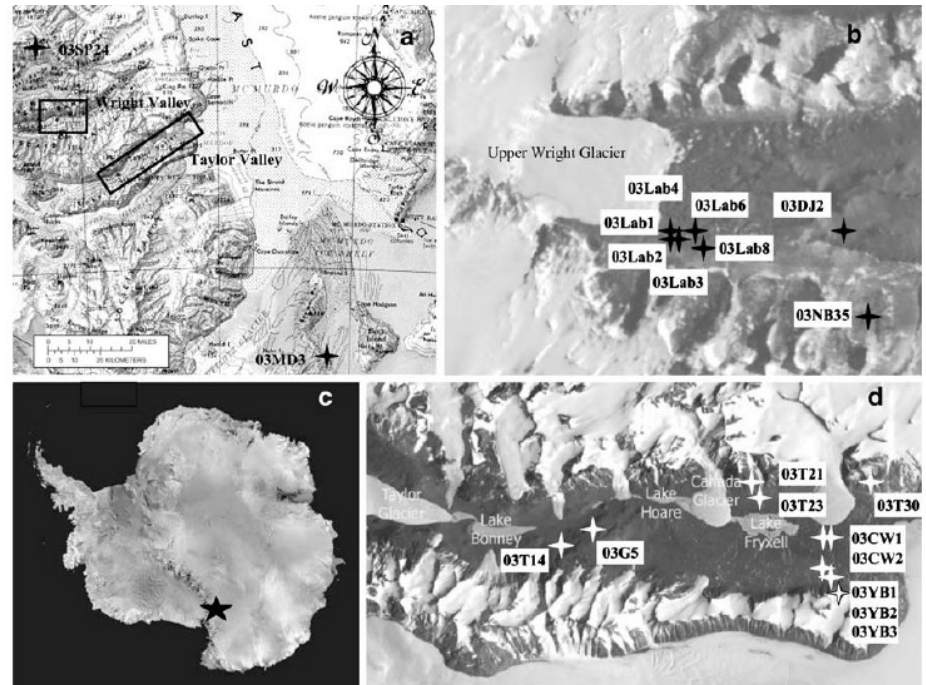


Figure 1 Sample site locations in South Victoria Land, Antarctica (2003–2004). Sites are identified by stars and labels. The entire study area with specific sites 03SP24 and 03MD3 is shown in (a). Sites in Wright

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

Table 2 Species isolated from Southern Victoria Land soil

Species	Site isolated	Isolate number	GenBank accession	Closest match	Percent match
<i>Clavispora lusitaniae</i> ^a	03YB2	CBS 10625	EU149777	AY321475	99
<i>Cryptococcus nyarrowii</i>	03T21	CBS 10614	EU149778	AF400697	100
	03T23	CBS 10632	EU149780		
	03YB2	CBS 10740	DQ402536		
	03YB2	ANT 03-028	EU149779		
<i>Cryptococcus saitoi</i>	03DJ1	CBS 10631	EU149783	AF444372	99
	03Lab1	CBS 10628	EU149782		
	03Lab2	CBS 10630	DQ402537		
	03Lab6	CBS 10618	EU149781		
* <i>Cryptococcus</i> sp 1	03YB1	ANT 03-149	EU149784	AB035045	94
<i>Cryptococcus carnescens</i>	03 G5	CBS 10755	EU149786	AB035050	99
	03CW1	CBS 10634	EU149785		
<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	03Lab8	CBS 10619	EU149787	AF145325	100
<i>Cryptococcus vishniacii</i>	03Lab3	CBS 10616	EU149788	AF145320	100
<i>Debaryomyces hansenii</i> ^a	03Lab1	CBS 10629	EU149790	EF222227	100
	03Lab4	CBS 10751	EU149791		
	03T23	CBS 10686	EU149789		
* <i>Dioszegia</i> sp 1	03CW2	CBS 10623	EU149792	AB049613	95
	03YB1	ANT 03-101	EU149793		
* <i>Dioszegia</i> sp	2 03CW2	CBS 10637	EU149798	AF444379	91
* <i>Leucosporidium</i> sp 1	03MD3	CBS 10633	EU149802	AF444529	87
	03T14	CBS 10684	EU149803		
	03T30	CBS 10641	EU149804		
* <i>Leucosporidium</i> sp 2	03MD3	CBS 10638	EU149805	AF444529	96
	03CW1	CBs 10639	EU149806		
* <i>Leucosporidium</i> sp 3	03MD3	CBS 10620	EU149807	AF444529	85
* <i>Leucosporidium</i> sp 4	03MD3	CBS 10636	EU149808	AF444529	97
	03YB2	CBS 10640	EU149809		
<i>Mrakia stokesii</i>	03T30	CBS 10622	EU149810	AF144486	100
<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i>	03Lab6	CBS 10617	DQ402534	AF444520	100
<i>Rhodotorula laryngis</i>	03T23	CBS 10621	EU149811	AF444617	98
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	03NB35	CBS 10685	DQ402533	AF444635	99
	03SP24	CBS 10752	EU149812		

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

^aMembers of Ascomycota

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* (*C. dubliensis*)
- kůže, ústní dutina, sputum, vaginální sekrety, výtěry zvukodů, moč, stolice ...



Patogenní kvasinky

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

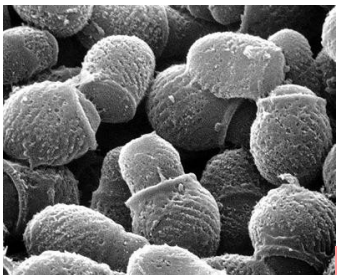
-**Kandidózy** (*C. albicans*, *dublinskiensis*, *krusei*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *glabrata*, *utilis*, *lipolytica*)

-*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



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.kudriavzevii*)

- 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*),

- 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).

- GMO např. příprava bioplastů (monomer; JACS, 2010)

Význam pro zdraví člověka

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



- *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 ...

Výzkum

- *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
 - buněčný cyklus (sir P. Nurse)
 - chromosomy a evoluce (např. telomery, duplikace a ztráty chromosomů)
 - mechanismy opravy poškozené DNA (nádorové syndromy – tabulka)
 - sekrece, endocytóza, buněčná stěna (prof. A. Svoboda)
- Metody využívající kvasinek (např. 2-H, reporterové systémy)
- Exprese proteinů (posttranslační modifikace, štěpení ...)

Human homologs		
Yeast	Human	Cancer syndrome
MEC1/TEL1	ATR/ATM	Ataxia telangiectasia
MRE11	MRE11	Ataxia telangiectasia-like disorder
XRS2	NBS1	Nijmegen breakage syndrome
RAD53/DUN1	hCHK2	Li-Fraumeni syndrome
SGS1	BLM/WRN/RTS	Bloom, Werner & Rothmund-Thomson syndromes

Srovnání 250 sekvencí lidských genů, jejichž mutace vedou ke vzniku onemocnění – cca 90 genů má *S.c.* homologů

- Více v dalších přednáškách

Základní charakteristika kvasinek

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

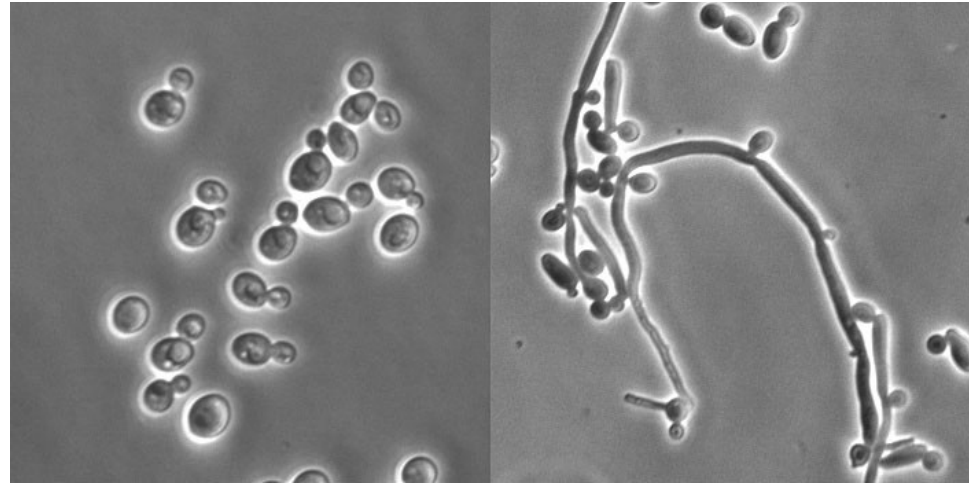
› Saccharomycotina

› Saccharomycetes

řád › Saccharomycetales

čeleď › Saccharomycetaceae

rod › Saccharomyces

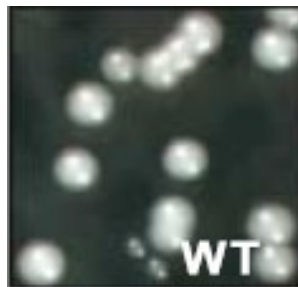


-Většinou jednobuněčné organismy (+ hyfy, + kolonie)

-Nejčastěji kulaté a oválné (3-15 mikrometrů)

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

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

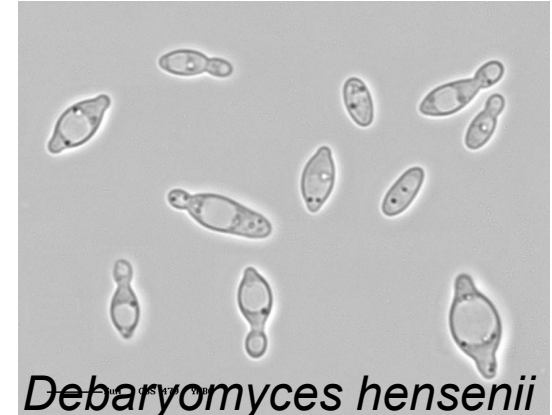


Potřebují vodné prostředí, kyslík a živiny

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



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 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)

Sabouraudův agar (1892) = 10g/l pepton, 40g/l dextrose (2%glukosa), 20g/l agar, pH 5.6

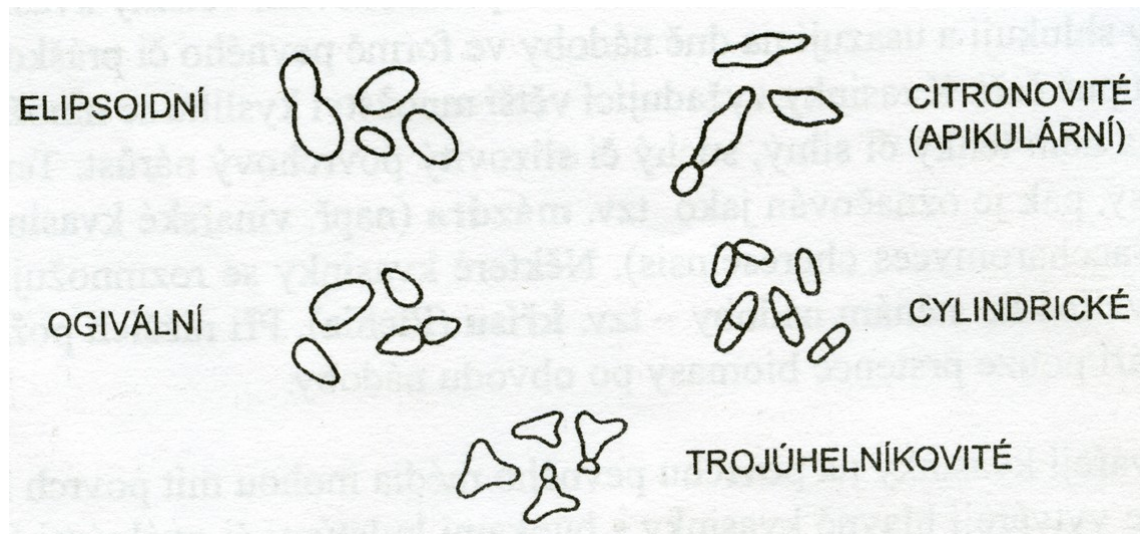
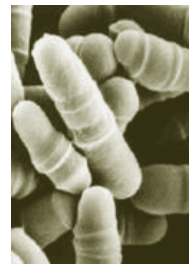
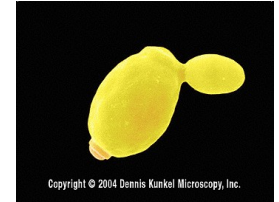
Syntetické SD médium = 6.7g/l yeast nitrogen base w/o amino acids (aminokyseliny se přidávají dle potřeby), 20g/l dextrose (2% glukosa)

Minimální agarová půda = 5g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g/l KH_2SO_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)

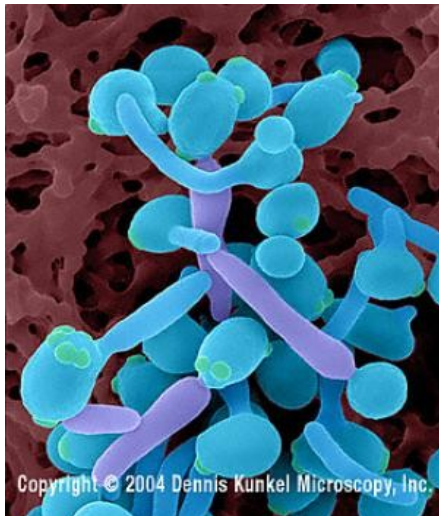
Morfologie kvasinek

- 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*

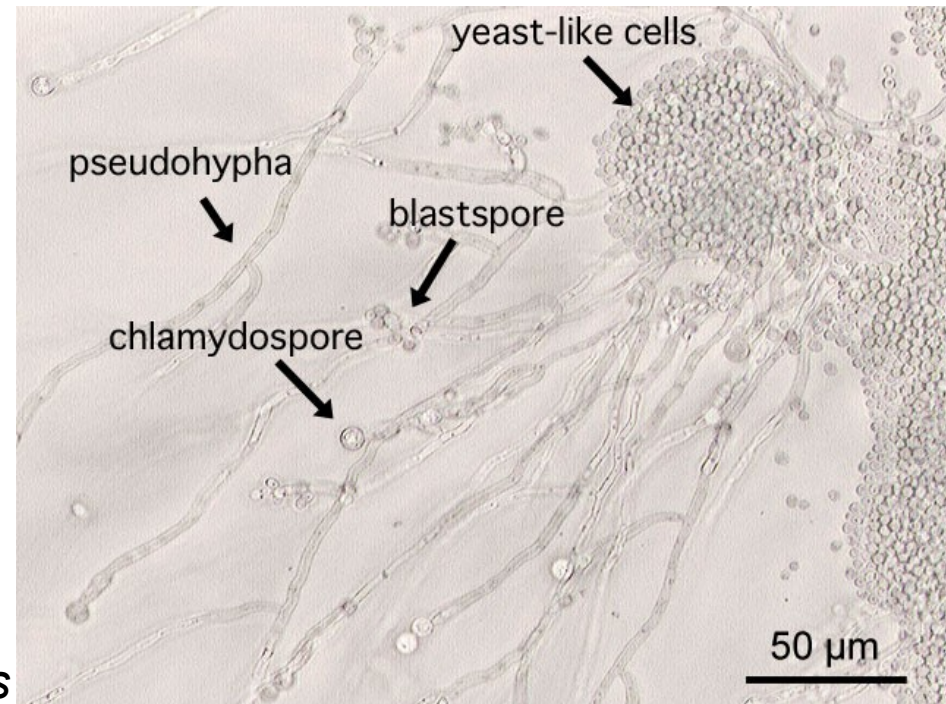


Hyfy

- Za určitých kultivačních podmínek jsou některé kvasinky schopné vegetativního rozmnožování (při nedostatku živin) – za normálních podmínek se množí pučením (jedenobuněčná forma)
- Pučící buňky se protahují a nedojde-li k úplnému oddělení dceřinné buňky, zůstávají buňky spojeny a vytváří tzv. **pseudohyfy**
- Právě **hyfy** vytváří při protahování septa/přepážky
- **chlamydokonidie** – kulaté, silnostěnné, na koncích nebo po stranách hyf
- Na koncích (i mezi buňkami) mohou vznikat **spory** (blastospory), které se dále množí pučením (odlišení *C. albicans* od *C. dubliniensis*)
- Nevykazují tak vysokou odolnost jako u bakterií



Candida albicans



Spory

C. dubliniensis:
nadbytek
chlamydospor na
koncích krátkých
pseudohyf



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

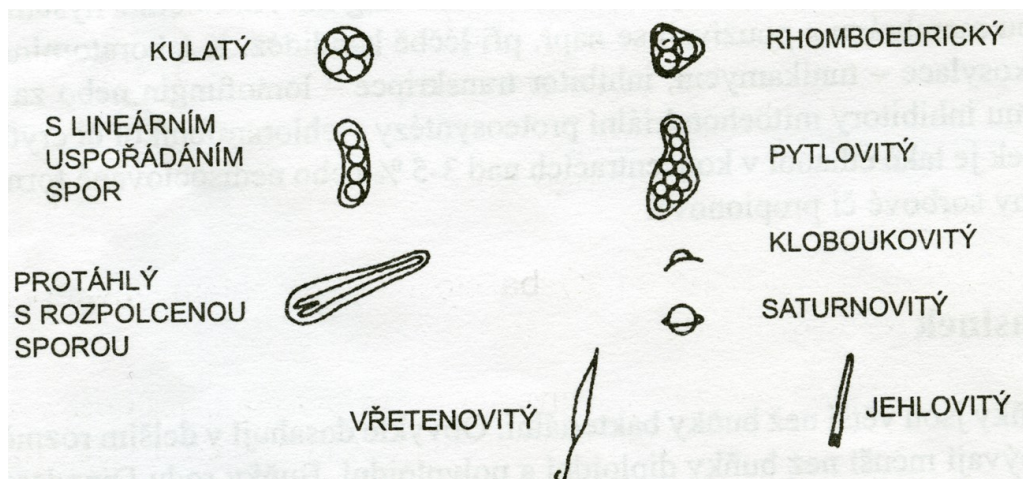
- Haploidní spory vřekovýtrusných kvasinek vzniklé při sporulaci diploidních buněk (pohlavní rozmnožování)

Saccharomyces

Schizosaccharomyces

Metschnikowia

Nematospora

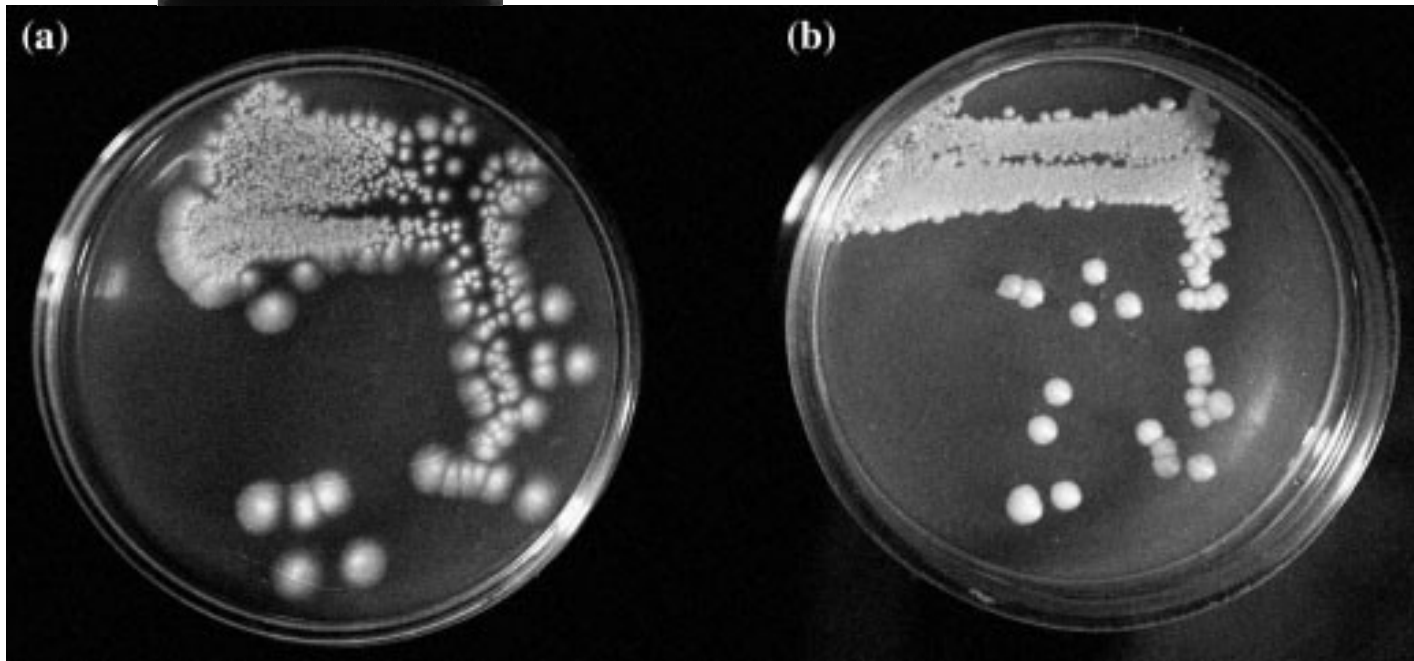
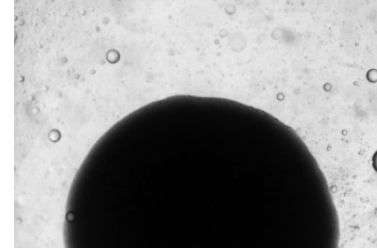
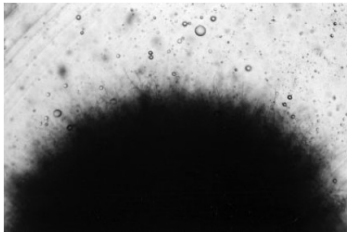


Lipomyces

Hanensula

Kolonie

- 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*)



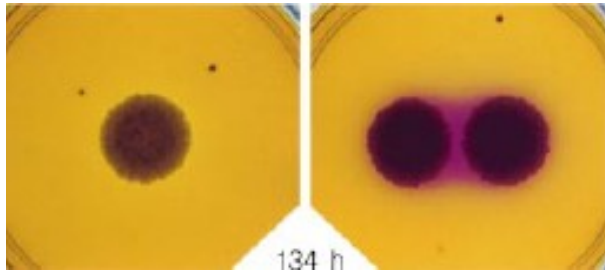
Např. odlišení *C.d.* od *C.a.*: 24h kultivace na Staibově agaru při teplotě 37 C

(a) *C. dubliniensis*

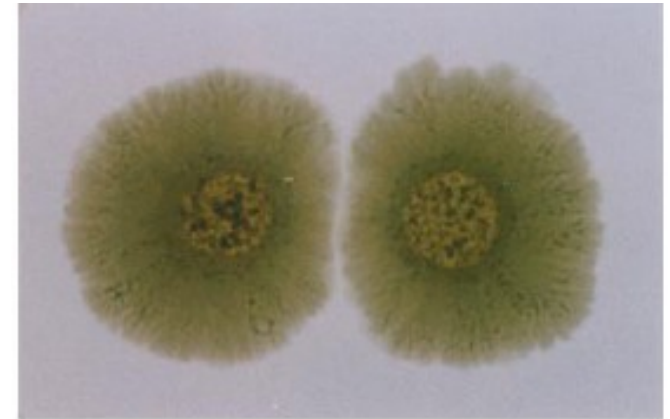
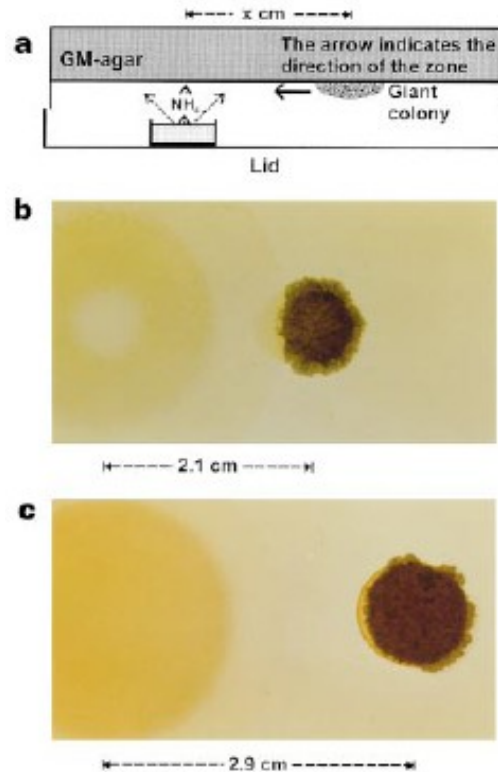
(b) *C. albicans*

Komunikace kolonií

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



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



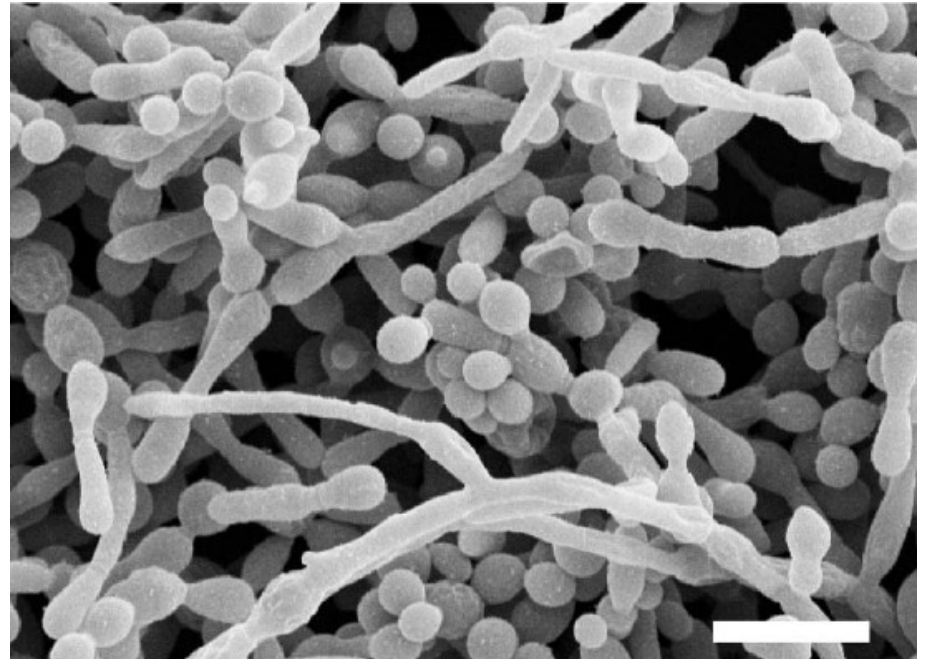
kolonie přesměrovává růst
sousední kolonie –
nekompetují o živiny -

Adhesiny

- lektinu-podobné adhesiny např. *FLO1* (*S.c.*), *EPA* (*C. glabrata*) váží cukry
- nezávislé na cukru 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)

Biofilm

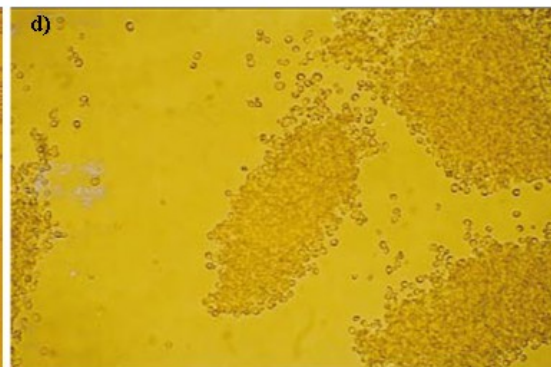
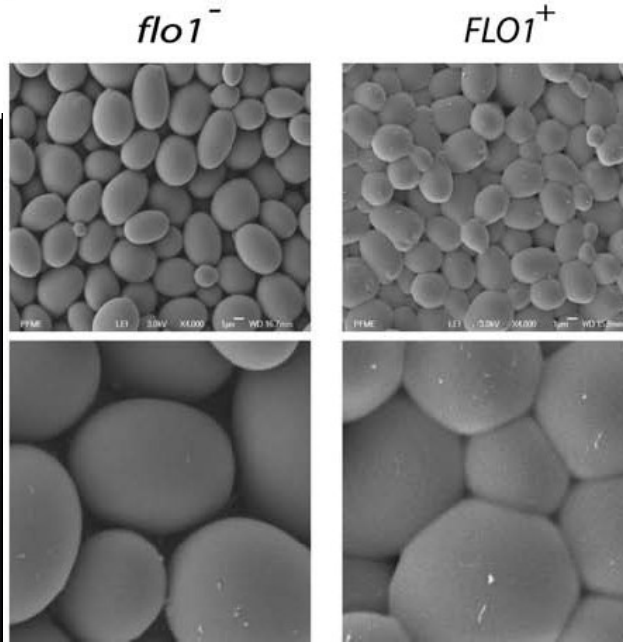
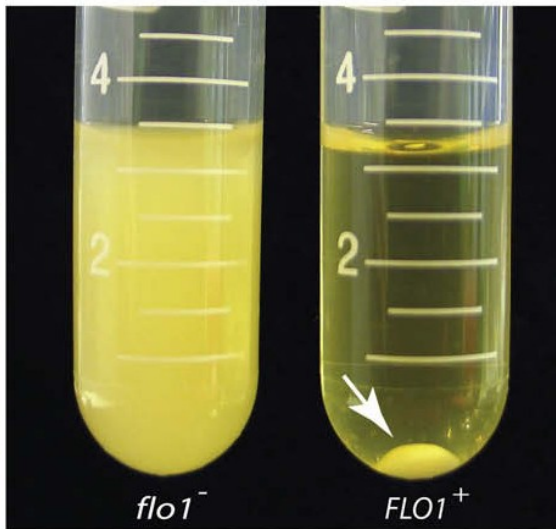
- tvořen matrix s mikrokoloniemi kvasinek, hyfami a pseudohyfami (komplexní struktura)
- významně přispívá k rozvoji a odolnosti kandidóz (rezistentní k antimykotickým látkám)



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)

Prof. A. Svoboda



- 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

Smukalla a kol., 2008, Cell

Verstrepen, 2006, Mol. Microbiol

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
- Poprvé pozorováno v roce 1963 (Makower a Bevan) kvasinky zabíjí podkladový kmen (K1=laboratorní, K2 a K3=vinařské kvasinky)
- Kvasinky ze stejné skupiny se navzájem nezabíjí (různé skupiny ano)
- Geny jsou kódovány na dsRNA obalené ve „virus-like particles“ (VLP, připomínají savčí dsRNA viry) – kódují obalové, replikační (ale potřebují buňku k replikaci ...), transkripční sekvence a toxin
- Samotné VLP nejsou infekční ani toxické (lze je přenést konjugací buněk nebo fúzí protoplastů)
- 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 *P.m.*
- 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.*)