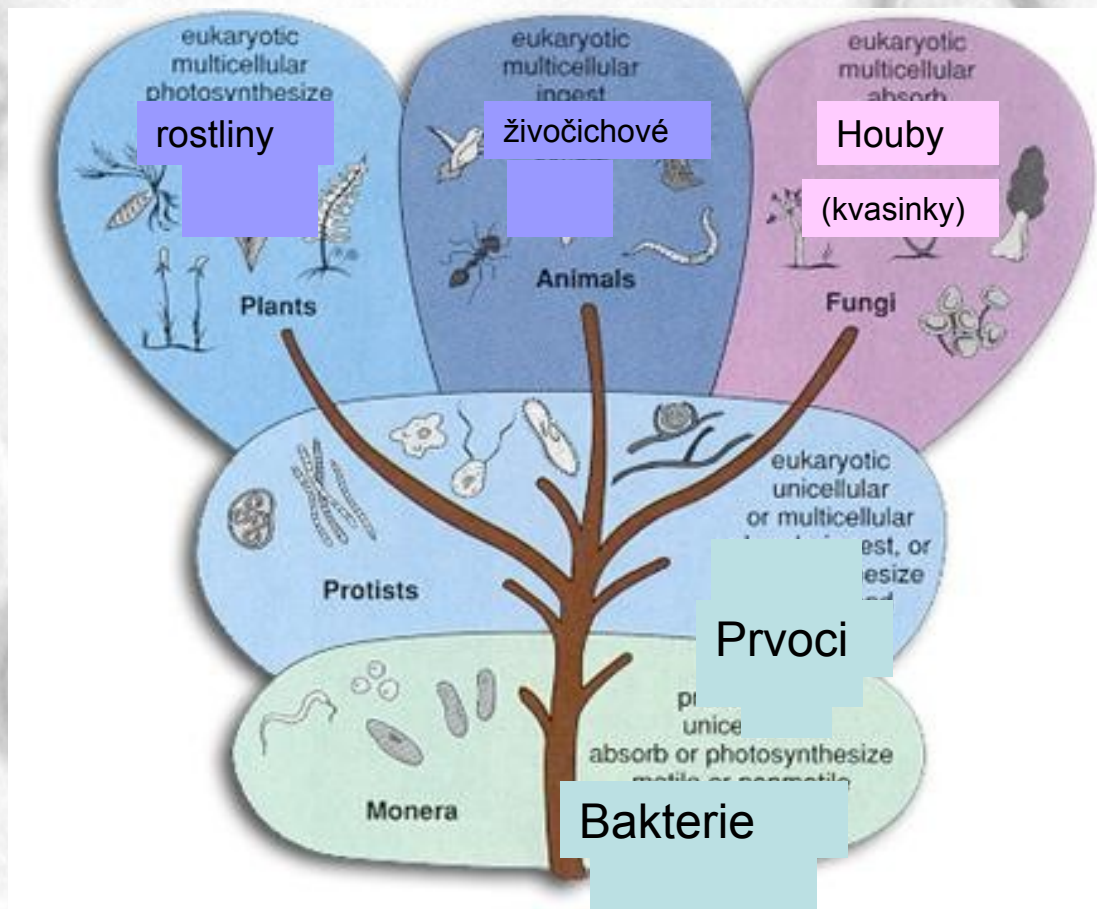


# Kvasinková buňka ve světelném a elektronovém mikroskopu

Prof. MUDr. Augustin Svoboda, CSc.  
Biologický ústav LF MU

## Kvasinky patří mezi houby – Mycota

Kvasinky jsou jednobuněčné houby s podobnou organizací jako buňky živočichů a rostlin. Obsahují jádro s chromosomy a dělí se mitózou, jsou to tedy **eukaryotické** buňky

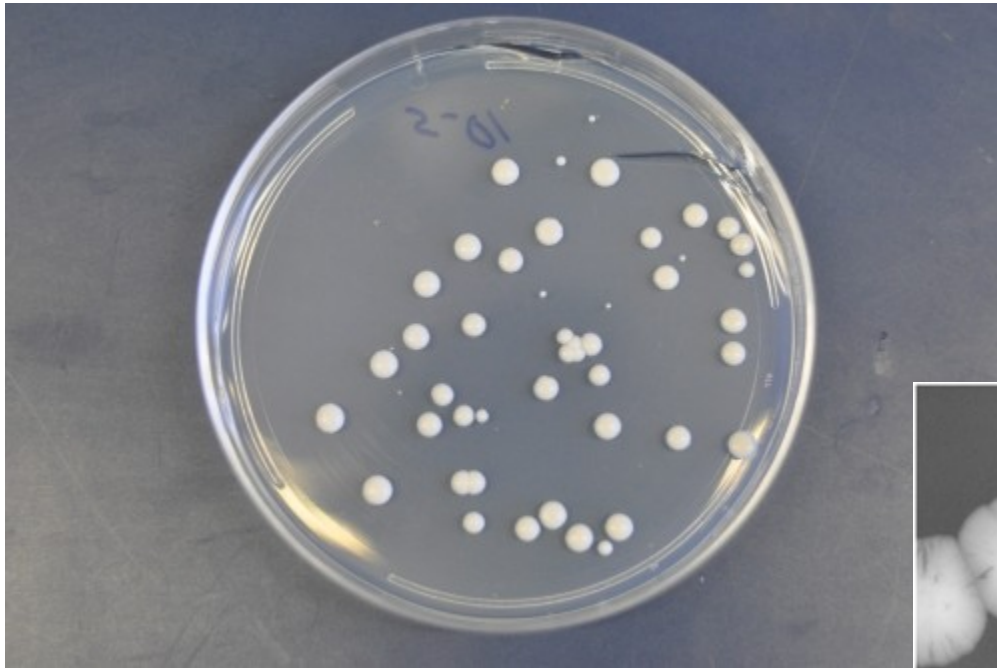


# Historie poznávání kvasinek 1

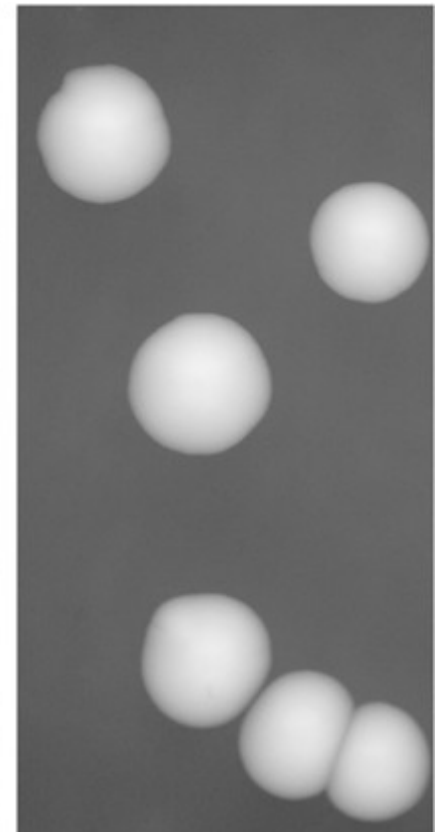
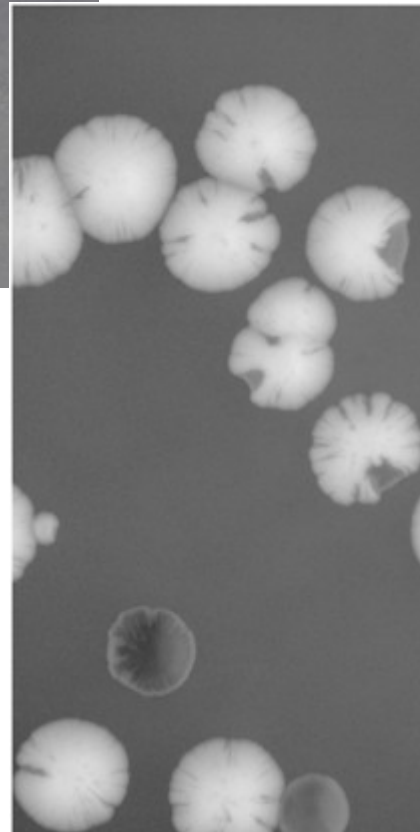
- 1680 Antonie van Leeuwenhoek pozoroval kvasinky pomocí primitivního mikroskopu
- 1818 Friedrich Erxleben postuloval, že kvasinky jsou živé organizmy
- 1825 Charles Cagniard de la Tour a Theodor Schwann nezávisle zjistili, že se vinné kvasinky množí pučením
- 1837 Julius Meyen použil označení *Saccharomyces* (cukerné houby) pro pučící kvasinky
- 1870 Louis Pasteur postuloval, že fermentace je proces poskytující bakteriím a kvasinkám energii za anaerobních podmínek
- 1888 Emil Hansen vypracoval metodu na izolaci čistých kvasinkových kultur
- 1890 Hermann Muller-Thurgau zavedl inokulovanou fermentaci moštu

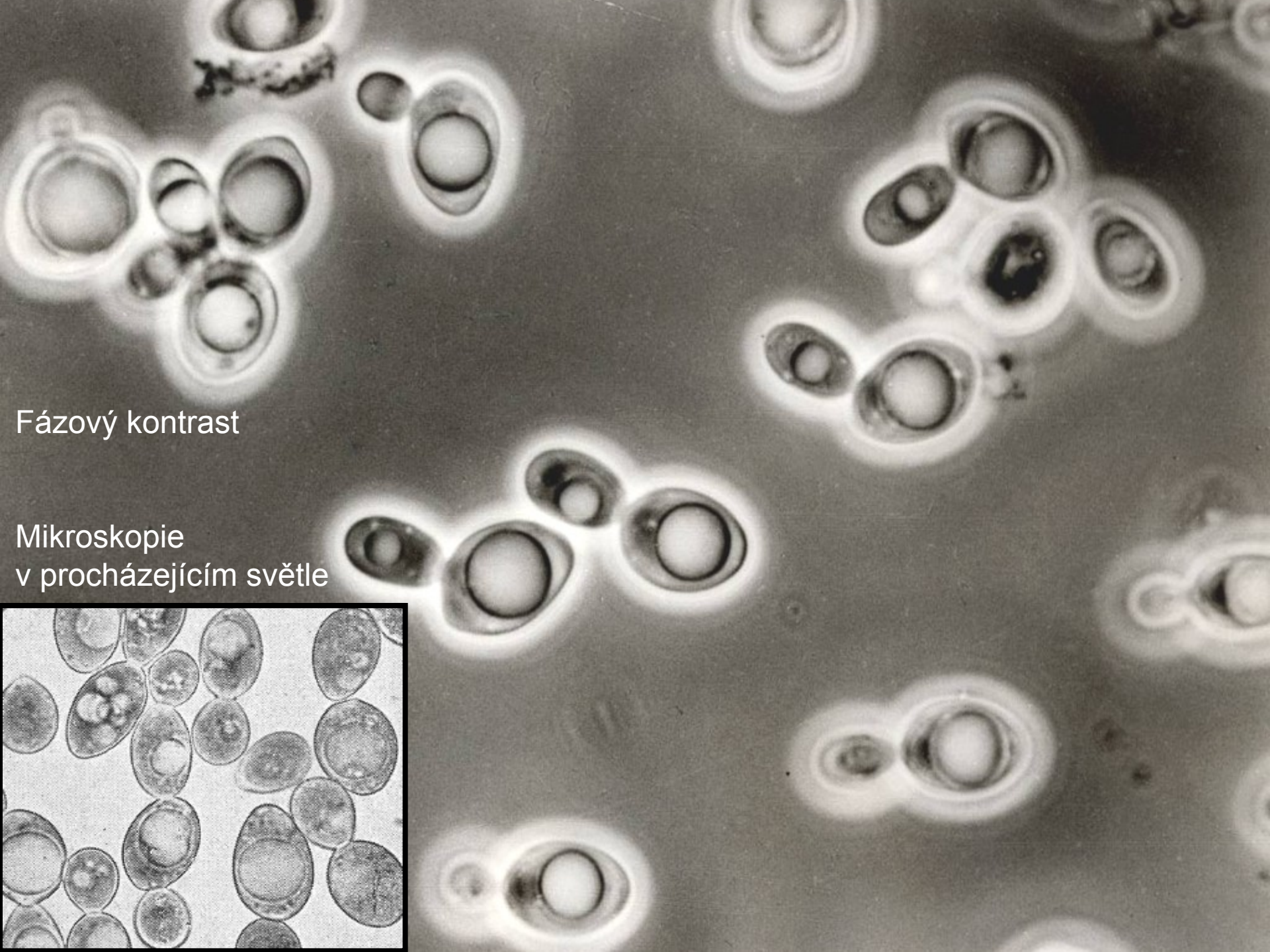
# Historie poznávání kvasinek 2

- 1918 Karel Kruis a Jan Šatava publikovali fotomikrografie kvasinek. Popsali sporulaci kvasinek a spájení spor, vznik velkých buněk (diploidních) a trpasličích (haploidních)
- 1935 Ojvind Winge objevil, že diploidní kvasinky pochází z haploidních askospor
- 1943 Carl Lindegren objevil dva párovací typy u *Saccharomyces cerevisiae*,  $\alpha$  a  $a$  a vysvětlil životní cyklus
- 1955 první ultratenké řezy kvasinkových buněk
- 1963 freeze-fracturing kvasinkových buněk
- 1978 Gerald Fink a spol. transformovali *Saccharomyces cerevisiae* - první eukaryotickou buňku - plasmidovou DNA
- 1996 André Goffeau a spol. publikovali sekvenci genomu *Saccharomyces cerevisiae*



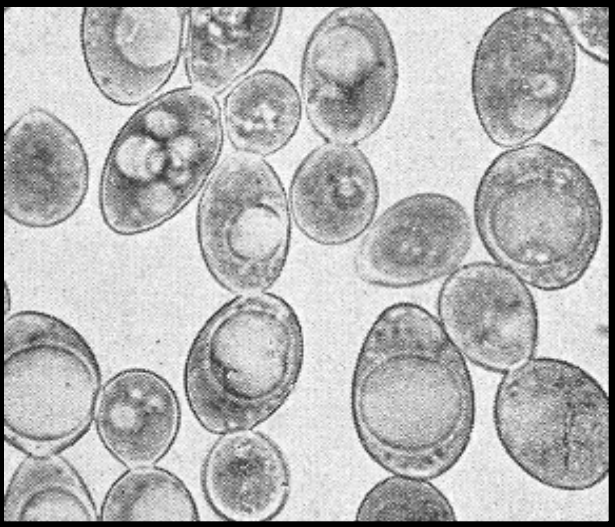
Kmeny kvasinek se uchovávají na agarových živných půdách, kde rostou ve formě kolonií



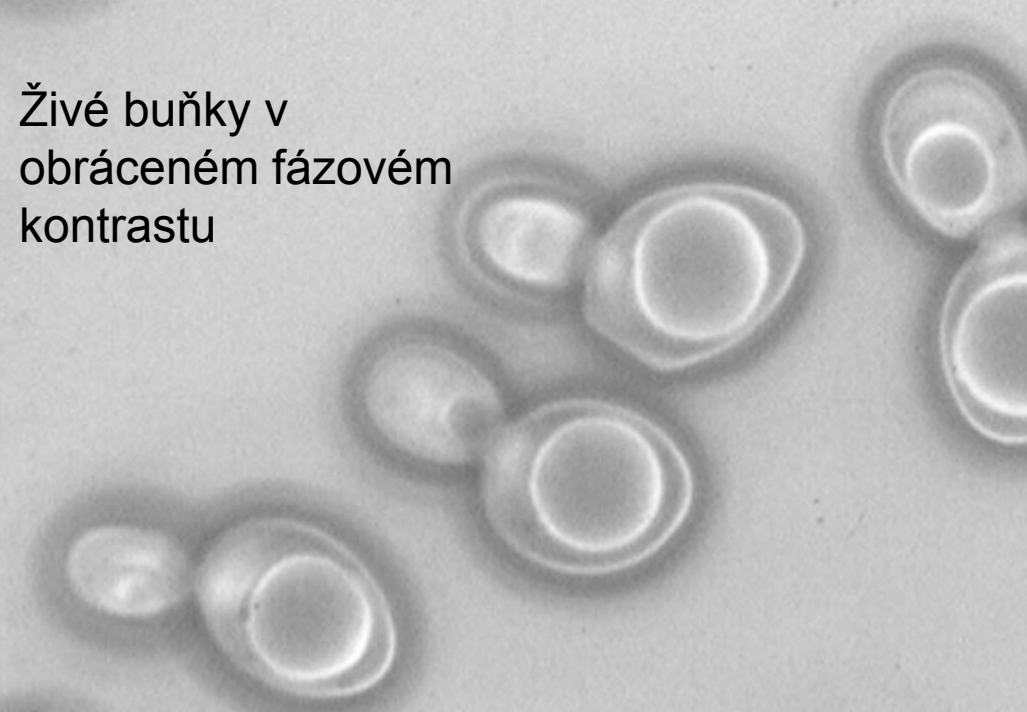


Fázový kontrast

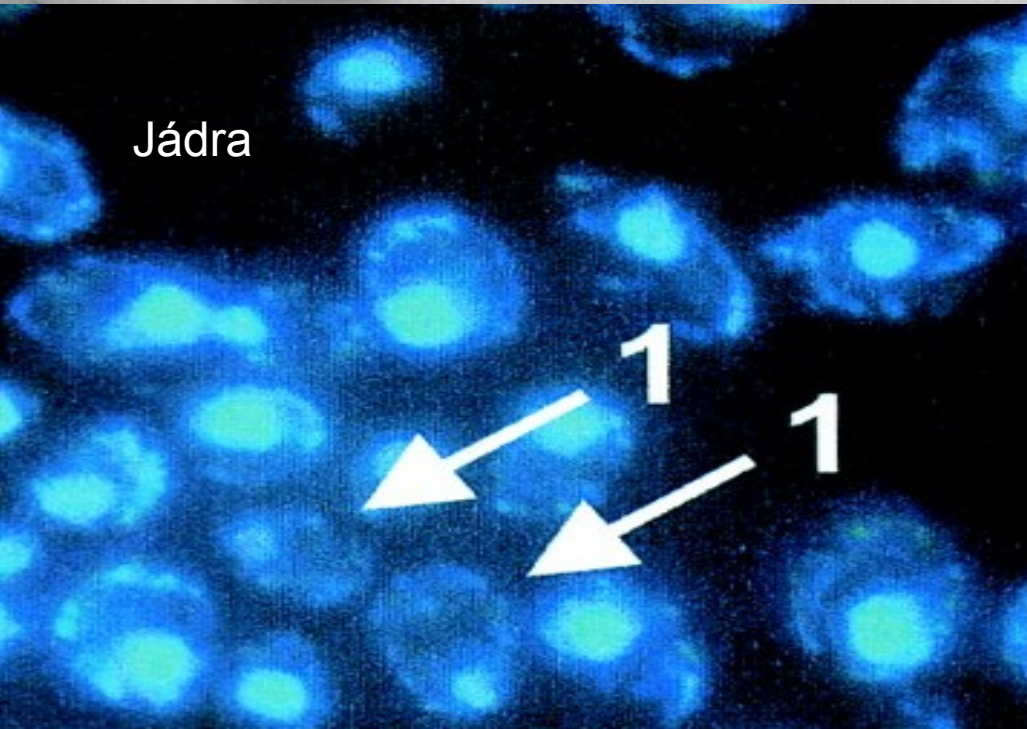
Mikroskopie  
v procházejícím světle



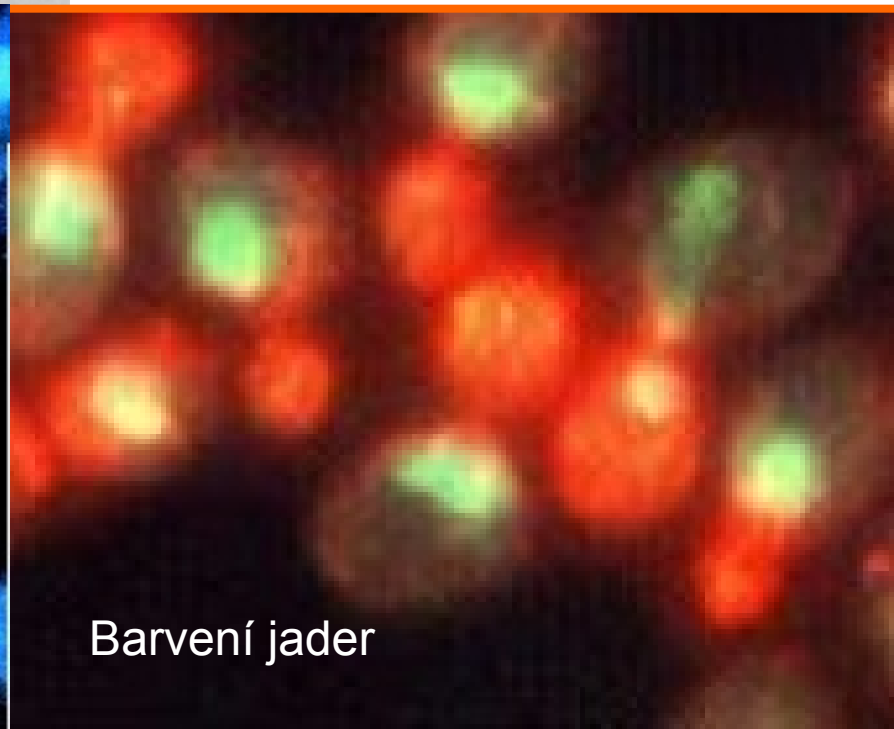
Živé buňky v  
obráceném fázovém  
kontrastu



Buněčná stěna ve fluorescenčním mikr.



Jádra

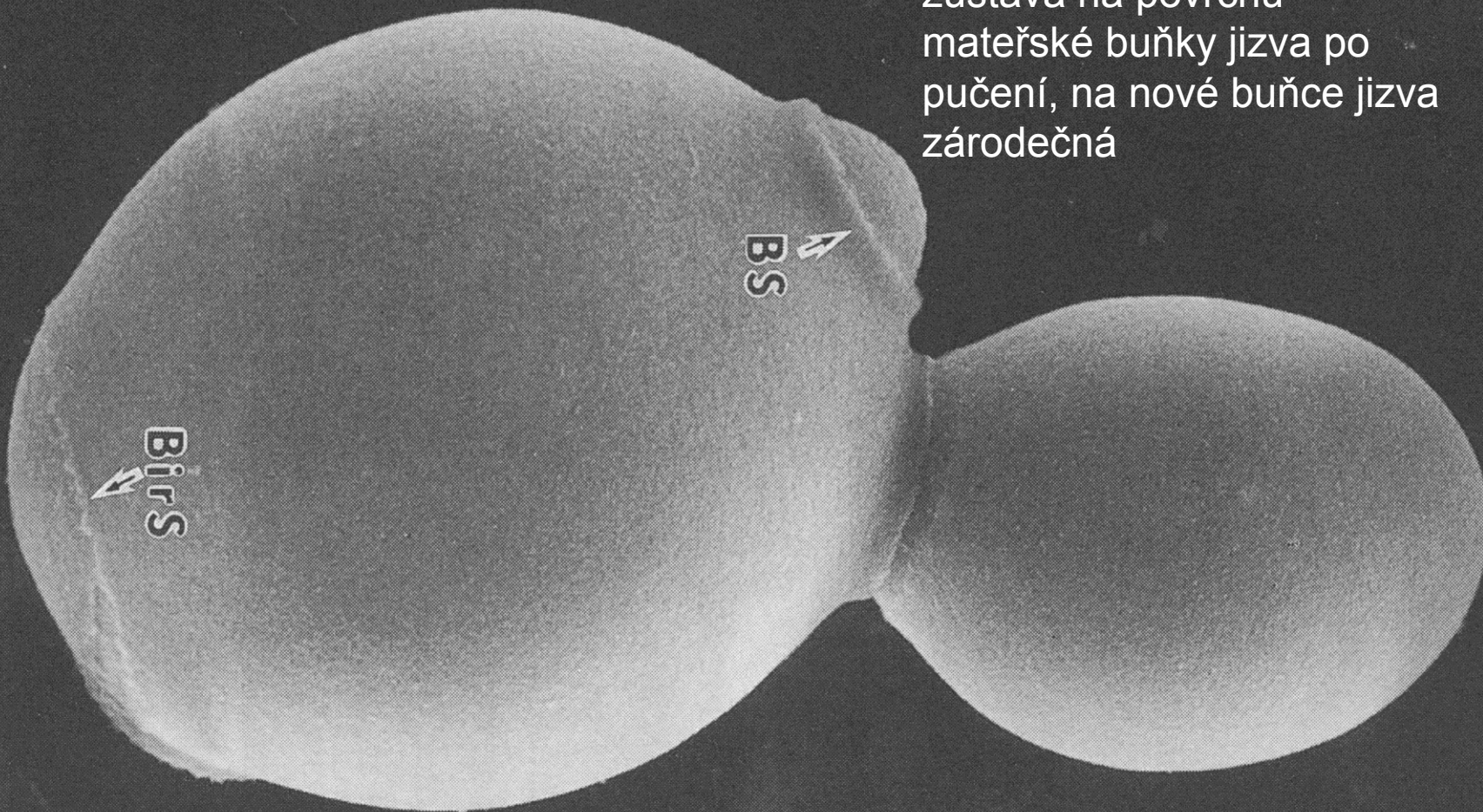


Barvení jader

# Skenovací elektronová mikroskopie

1a

Po oddělení dceřinné buňky  
zůstává na povrchu  
mateřské buňky jizva po  
pučení, na nové buňce jizva  
zárodečná

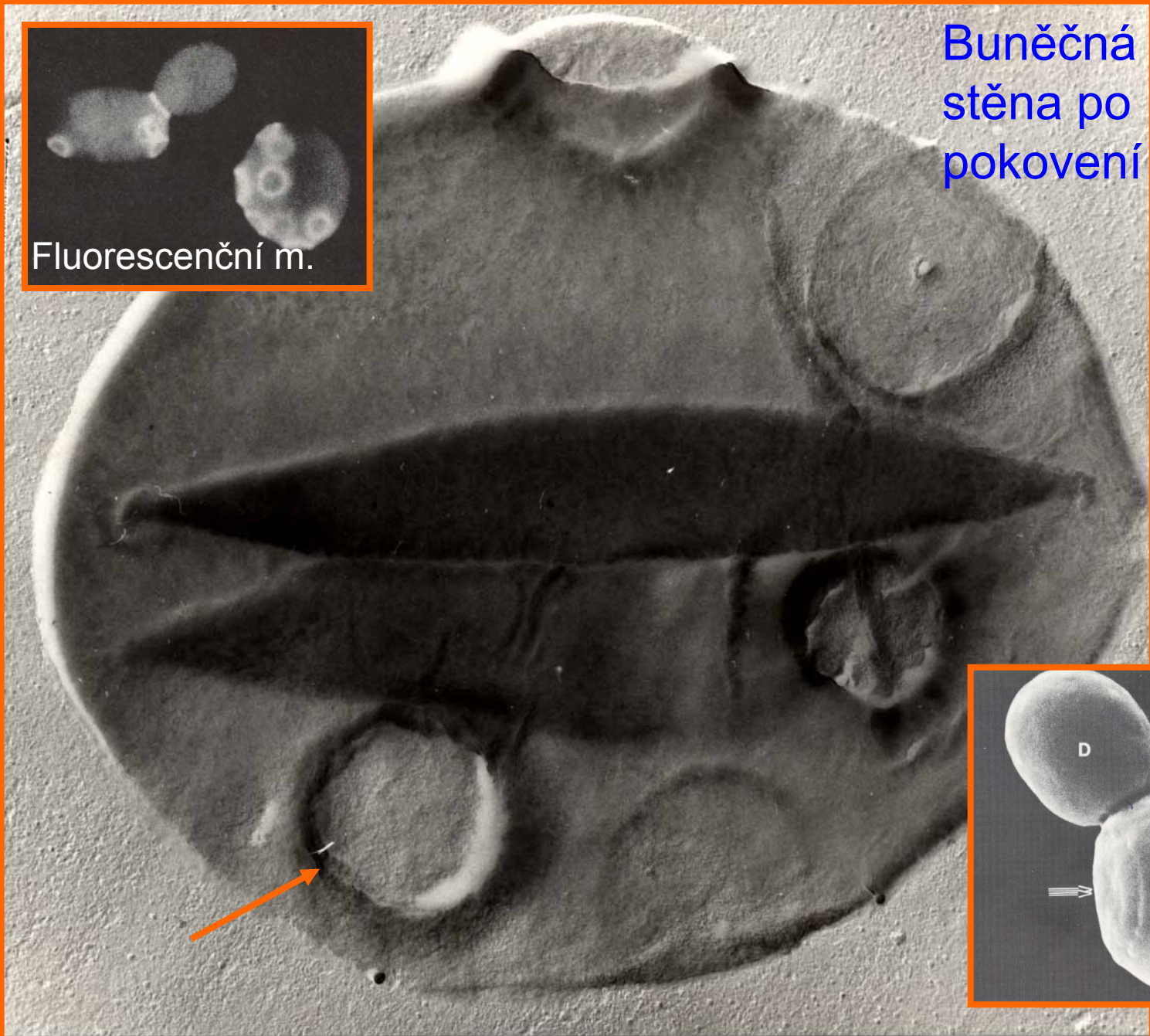
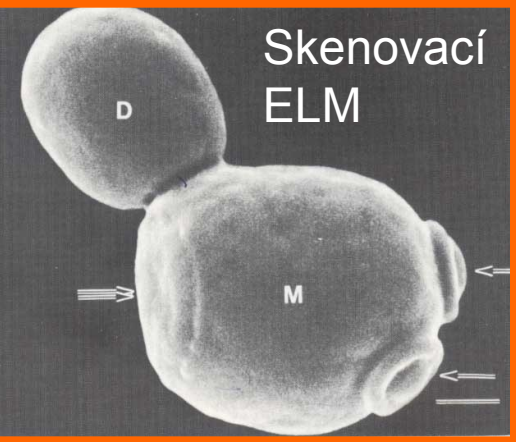


Mateřská buňka s vyrůstajícím pupenem

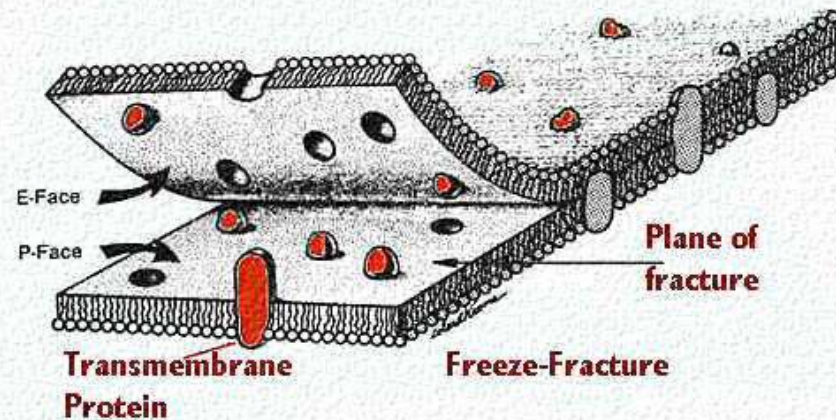
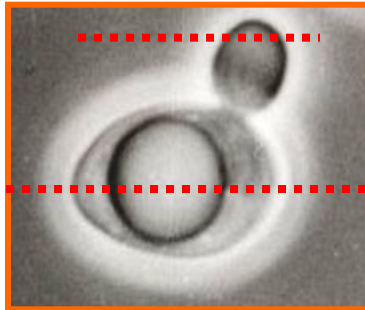


Buněčná  
stěna po  
pokovení

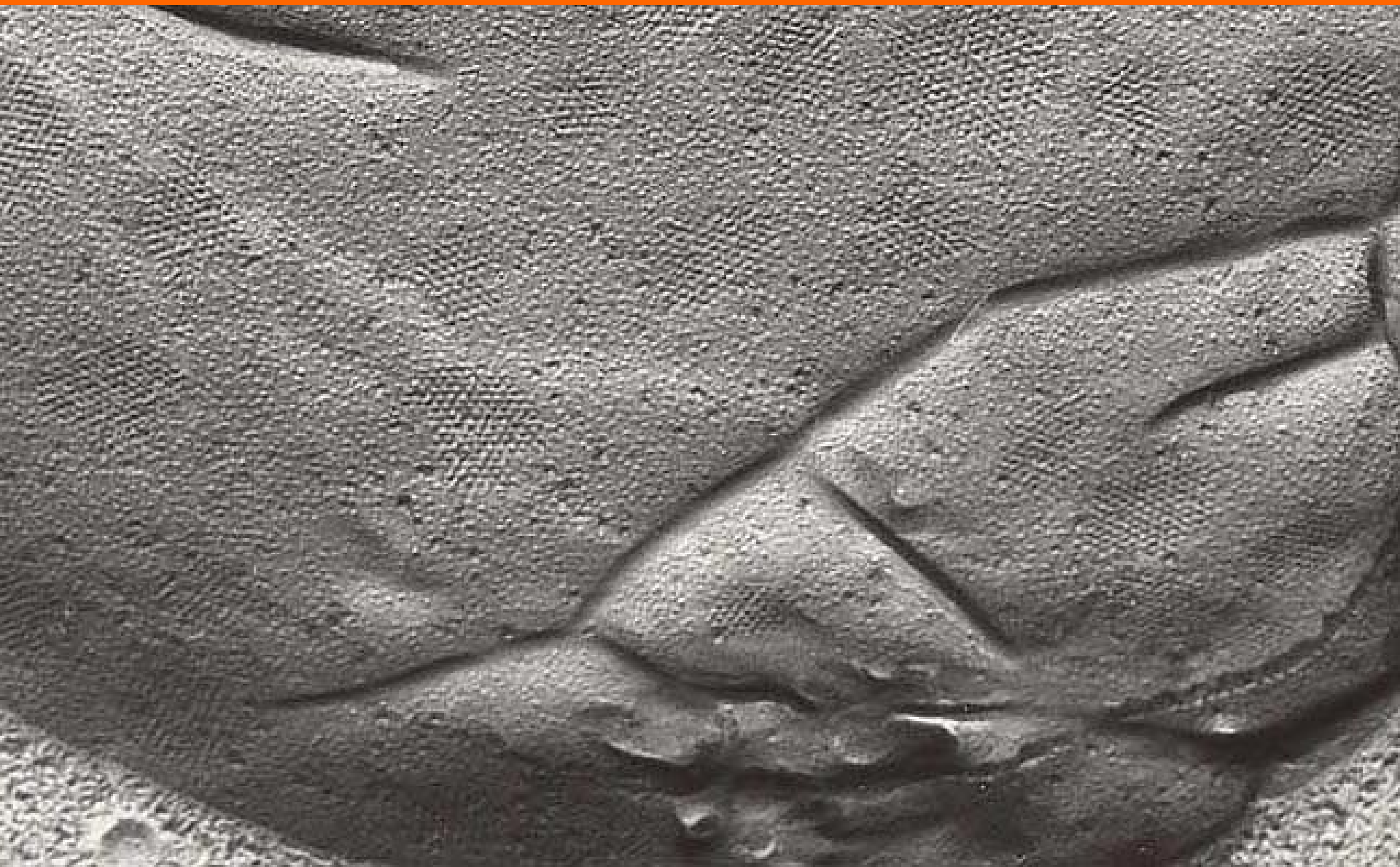
Fluorescenční m.

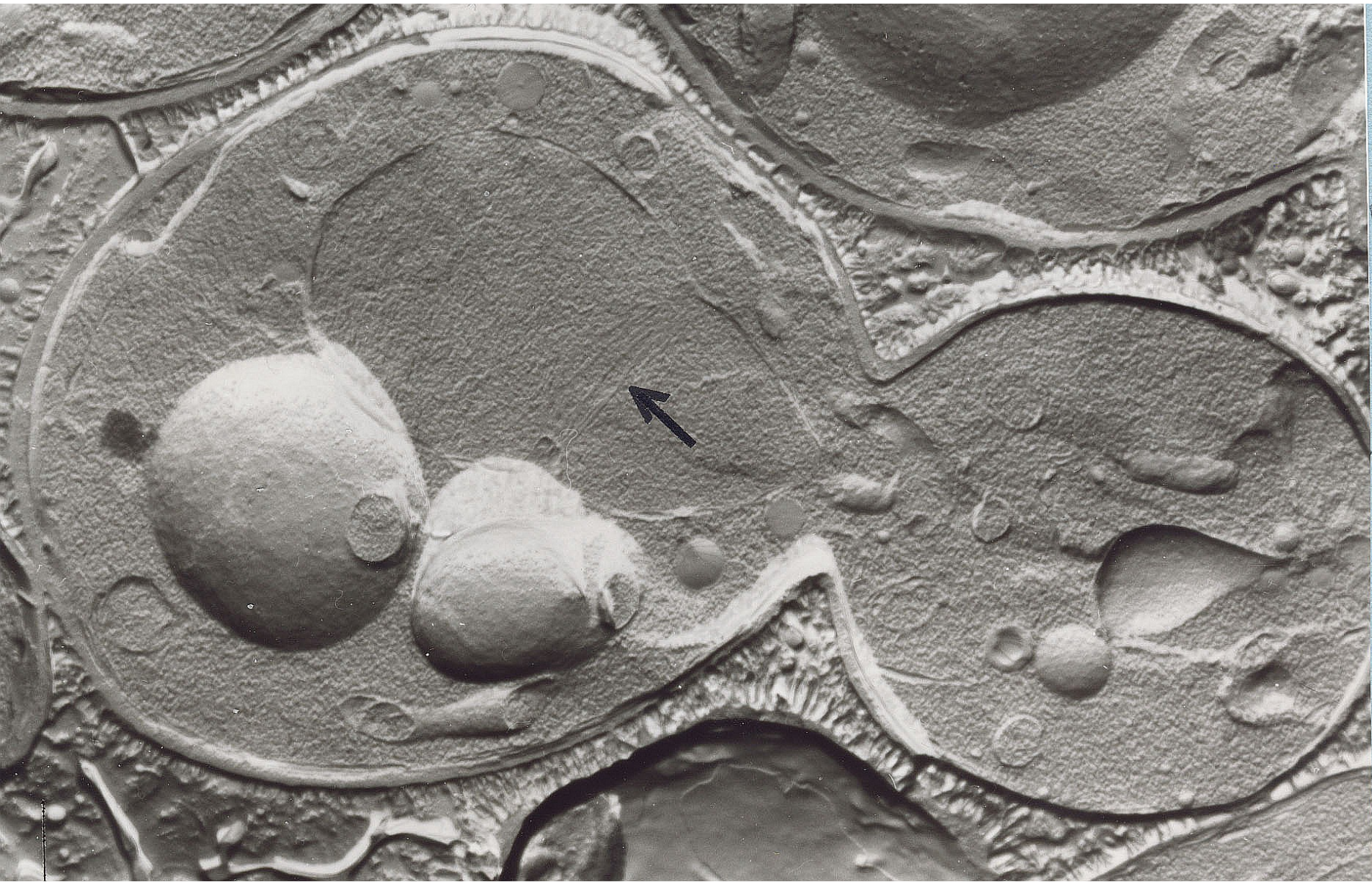


# Technika mrazového lámání – freeze fracturing



# Povrch plasmatické membrány *S. cerevisiae* odhalený technikou mrazového lámání



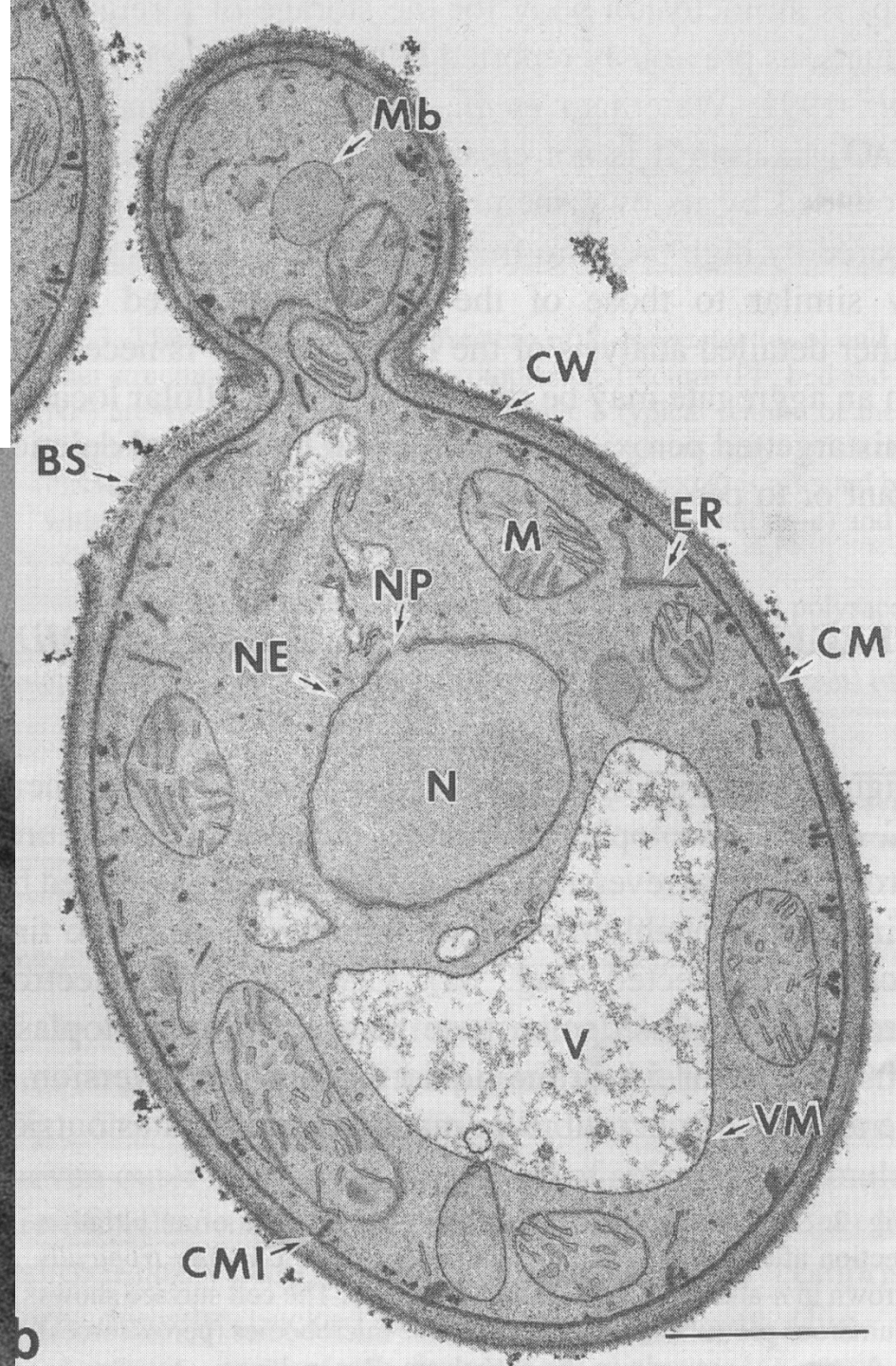
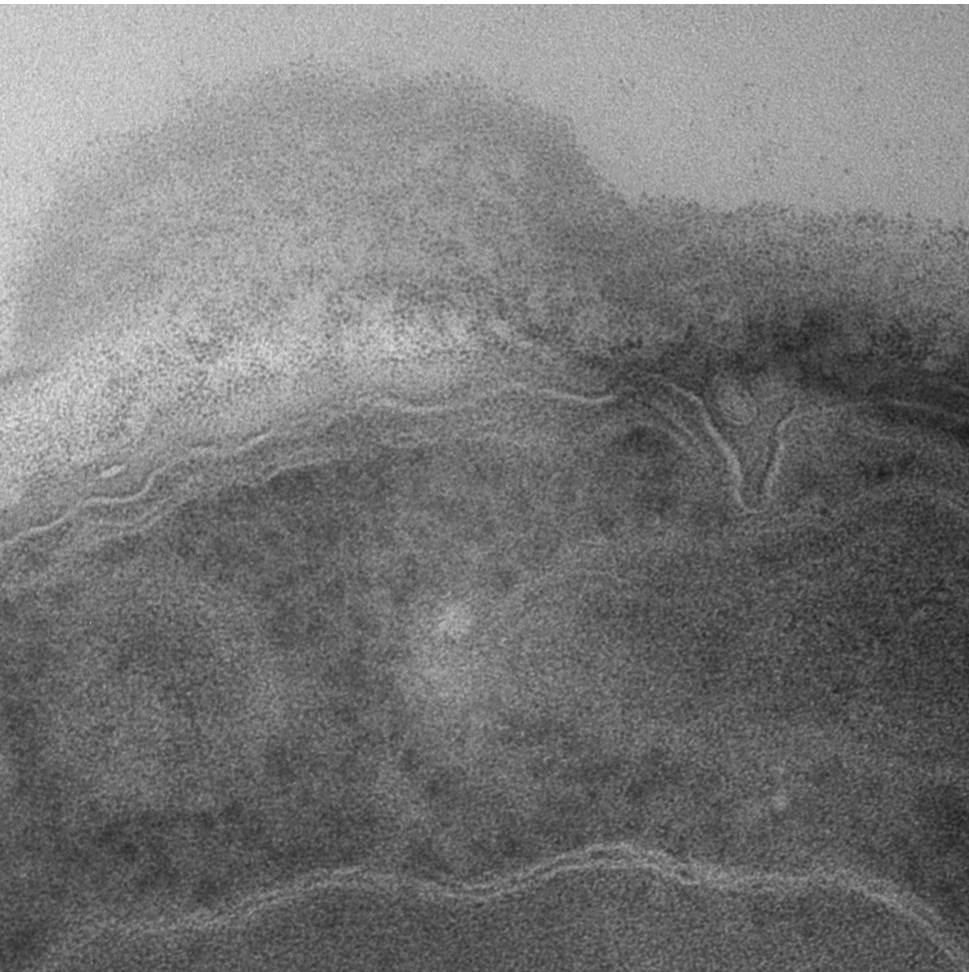


Zygosacch. rouxii

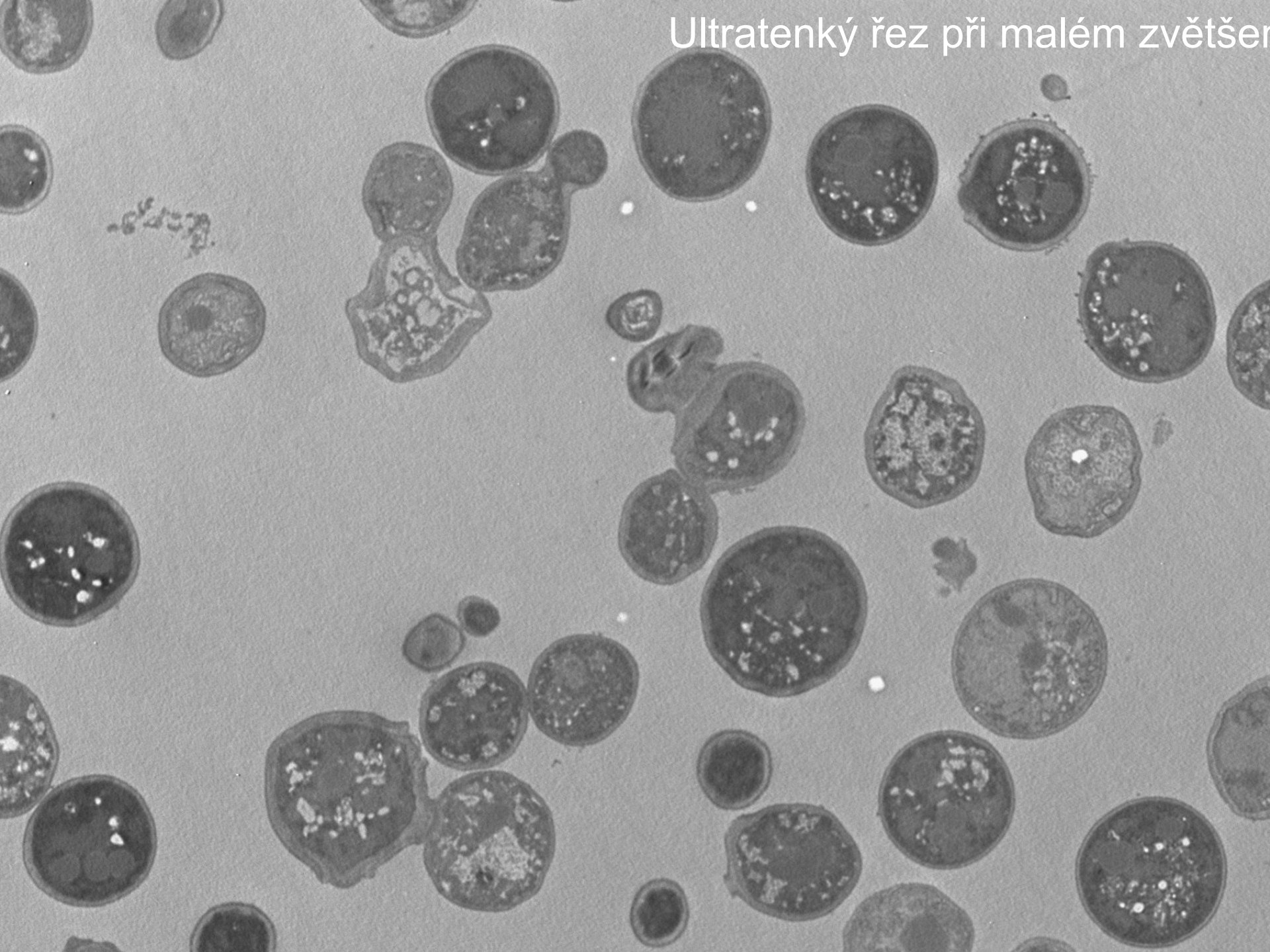


Zkvašuje  
koncentrované  
mošty

Elektronová mikroskopie  
ultratenkých řezů – po šetrné  
fixaci, kontrastování a zalití do  
pryskyřic se ultramikrotomem  
krájí tenké řezy – tloušťky 40 nm



Ultratenký řez při malém zvětšení



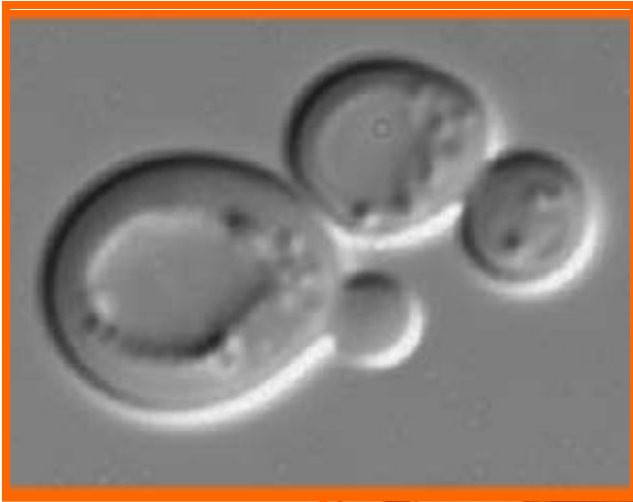
Mitochondrie, jaderný obal

Fluorescenční  
barvení mitochondrií





# Pučení *S. cerevisiae*

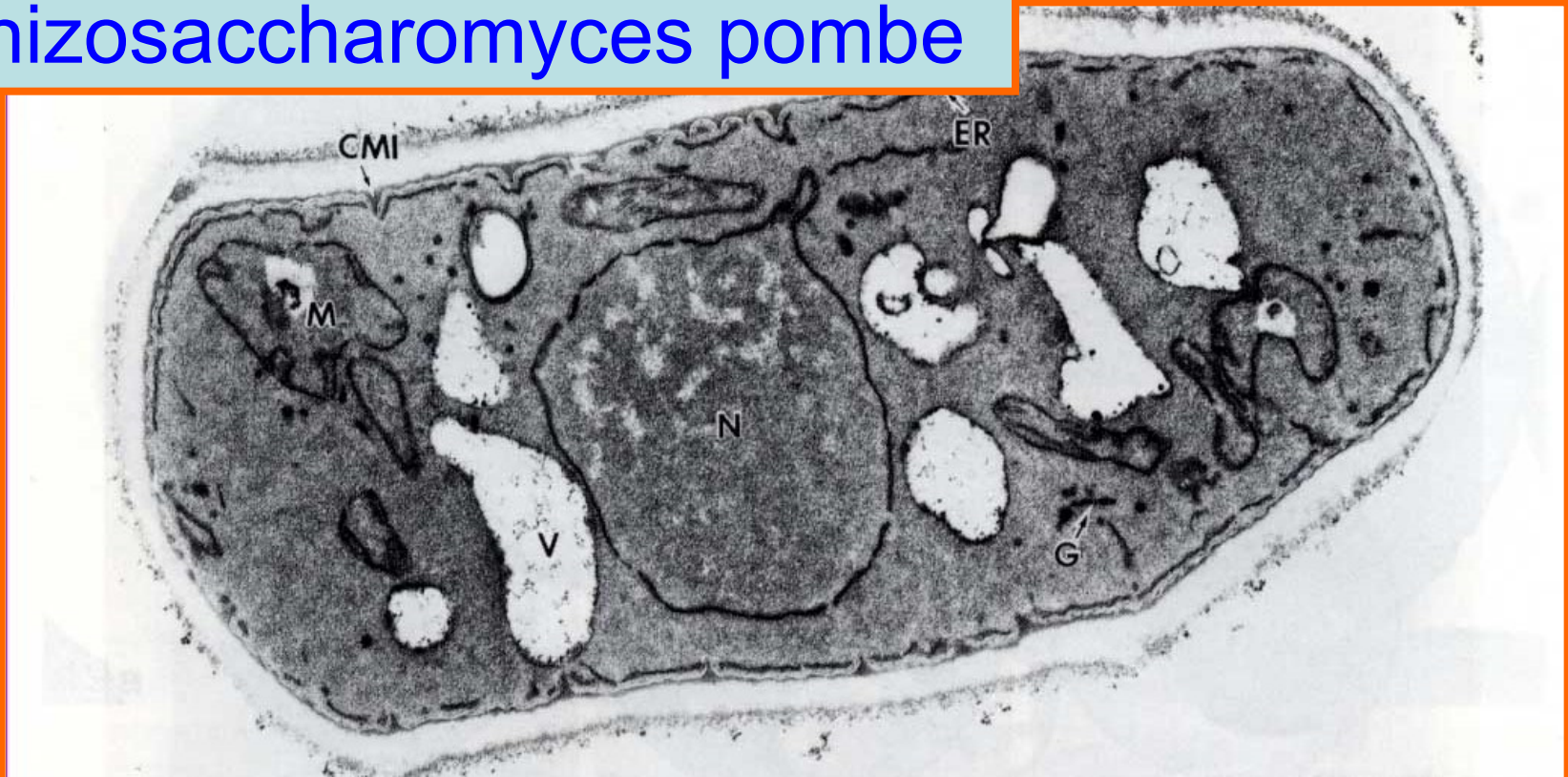


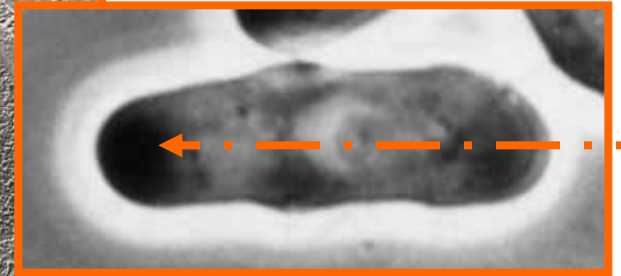


Pohled do rostoucího pupene  
kvasinky *S. cerevisiae*

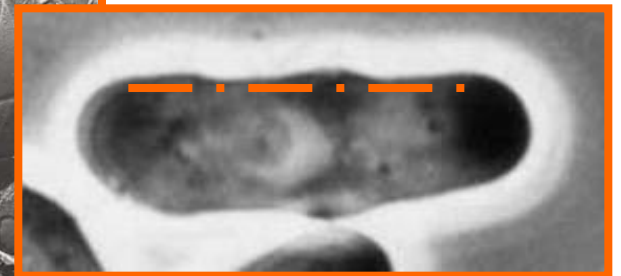


Schizosaccharomyces pombe





Preparace buněk  
technikou  
mrazového  
lámání



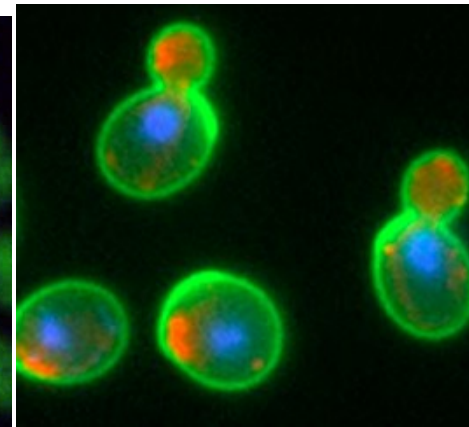
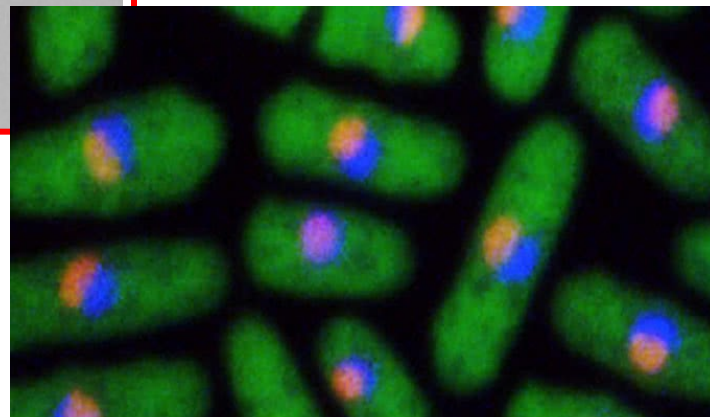
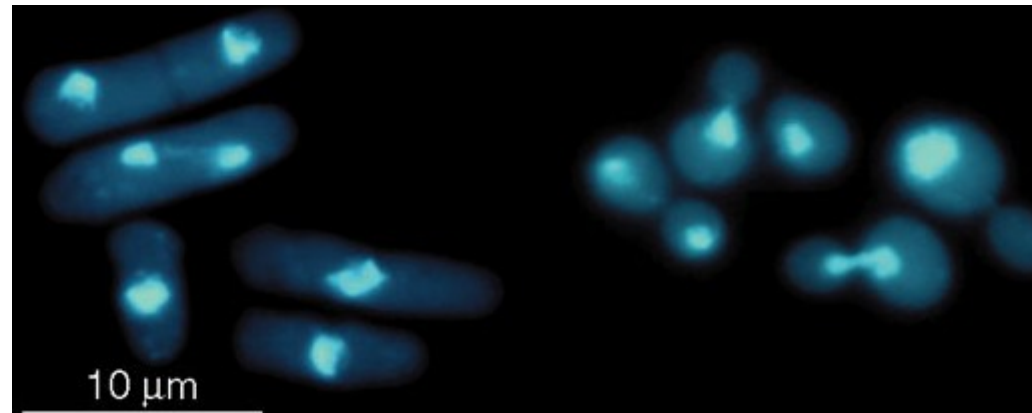
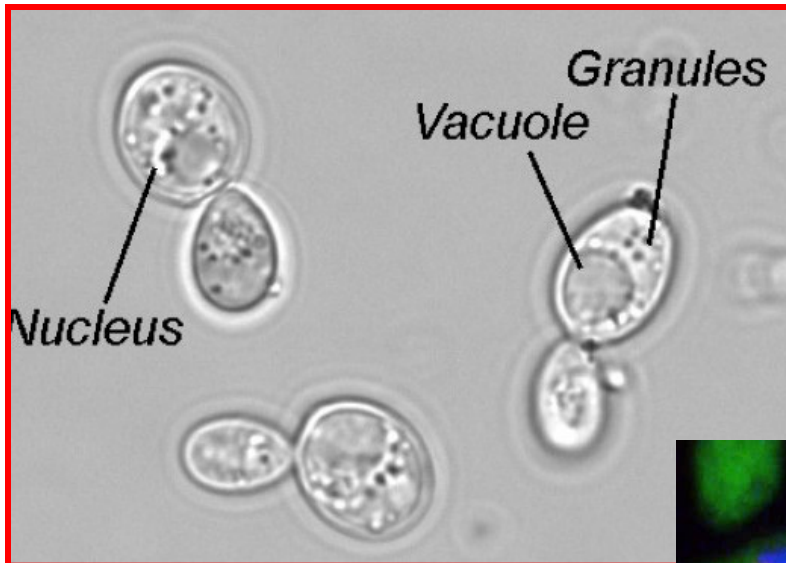


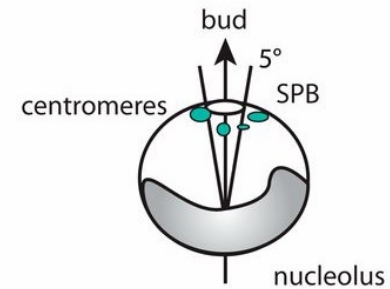
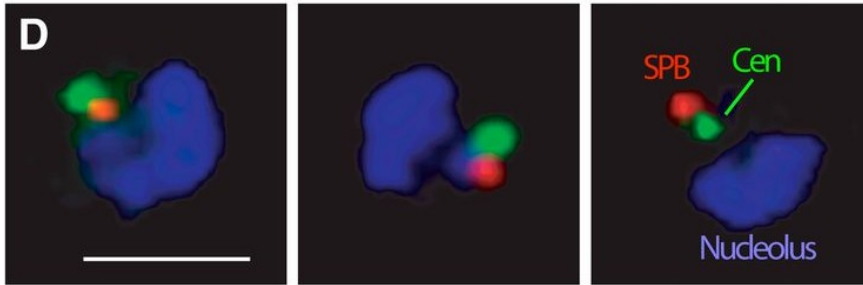
Povrch spory s částečně odhalenou plasmatickou membránou

# Struktura jádra kvasinkové buňky

Genom kvasinky **Saccharomyces cerevisiae** je tvořen přibližně **12,1 miliony** párů bází a **6 275** geny, které jsou organizovány do **16** chromosomů. Je pravděpodobné, že z uvedeného počtu genů je **5 800** aktivních. Asi **31%** kvasinkových genů mají homology v lidském genomu.

**Schizosaccharomyces pombe** genom obsahuje přibližně **14.1 milionů** párů bází a **4970** genů, které jsou uloženy ve **3** chromosomech





**E**

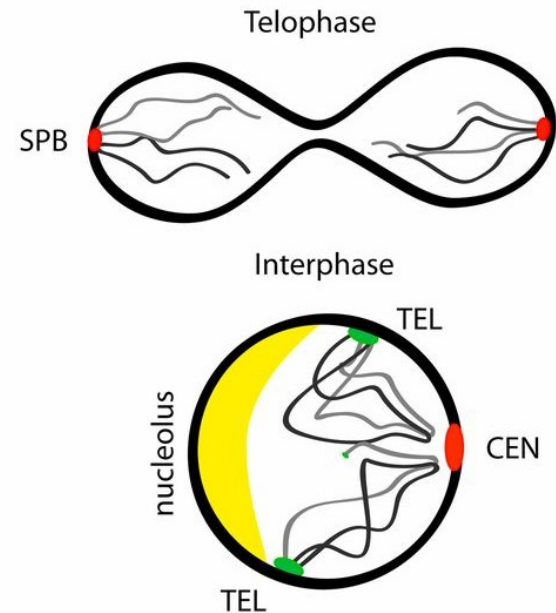
## Struktura jádra kvasinkové buňky

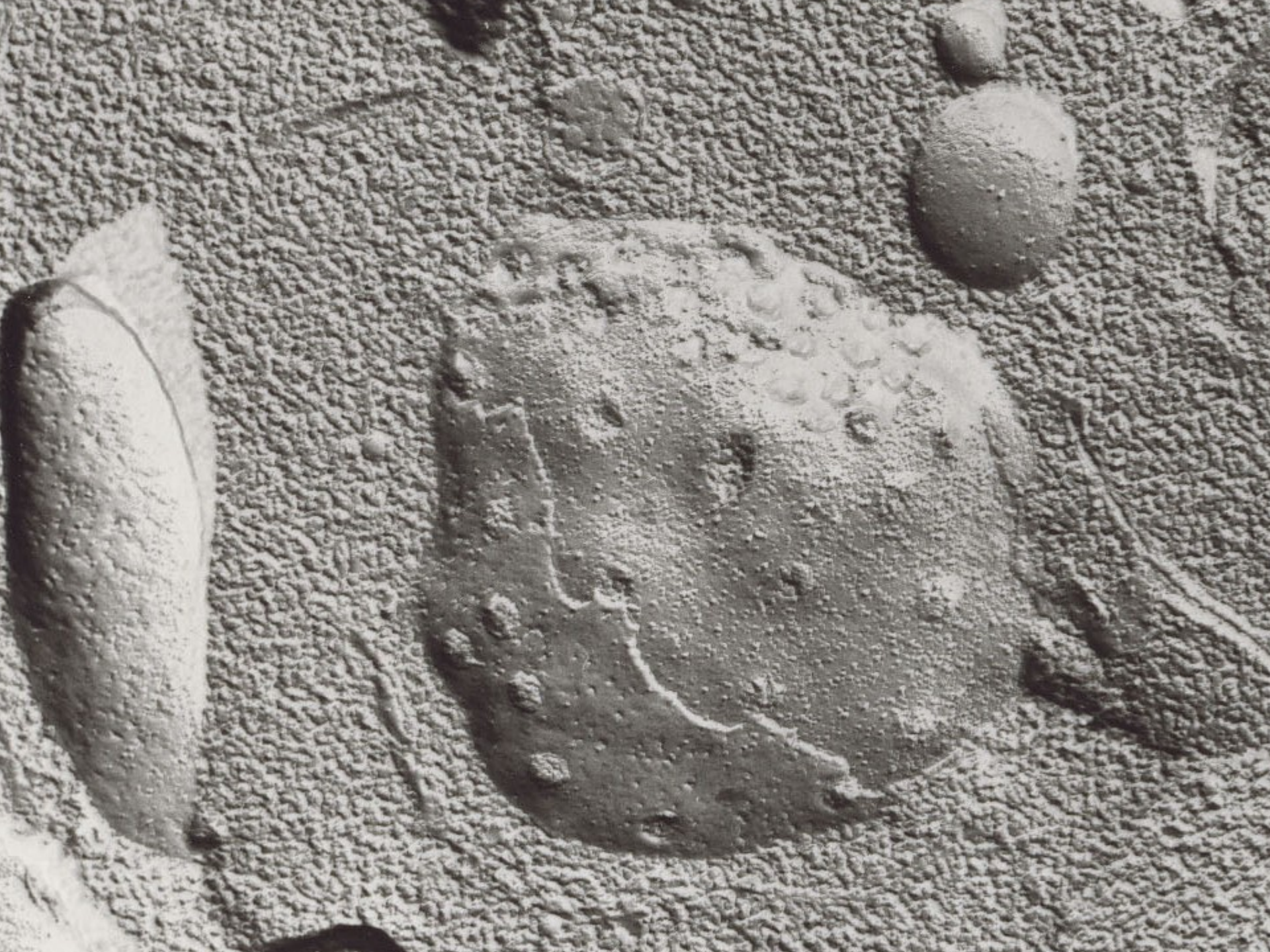
SPB spindle pole body –  
 proteinový komplex v jaderném obalu, který organizuje tvorbu dělicího vřeténka a v telofázi se na něj upínají centromery chromosomů

CEN centromera chromosomu

TEL telomery chromosomů

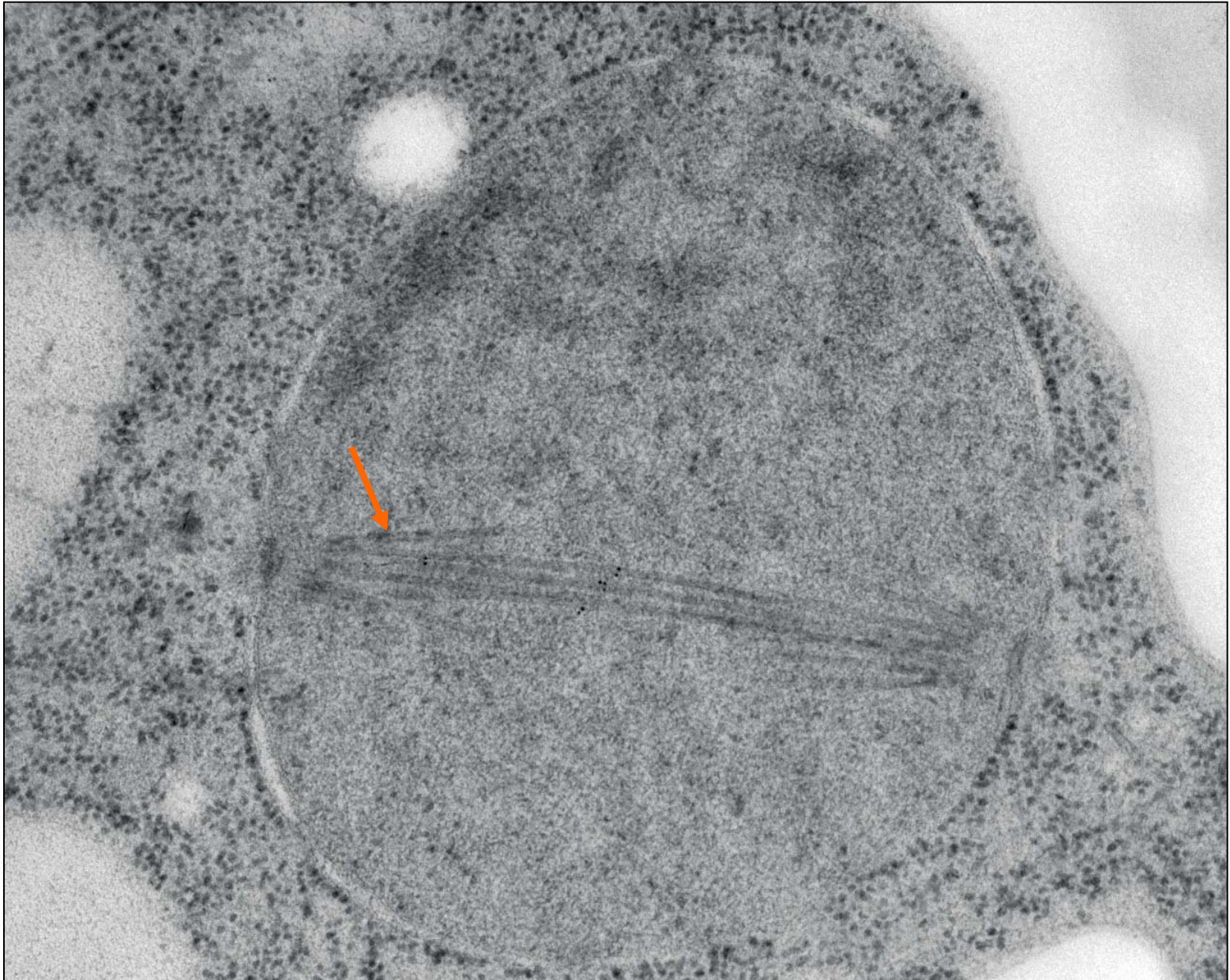
**F**

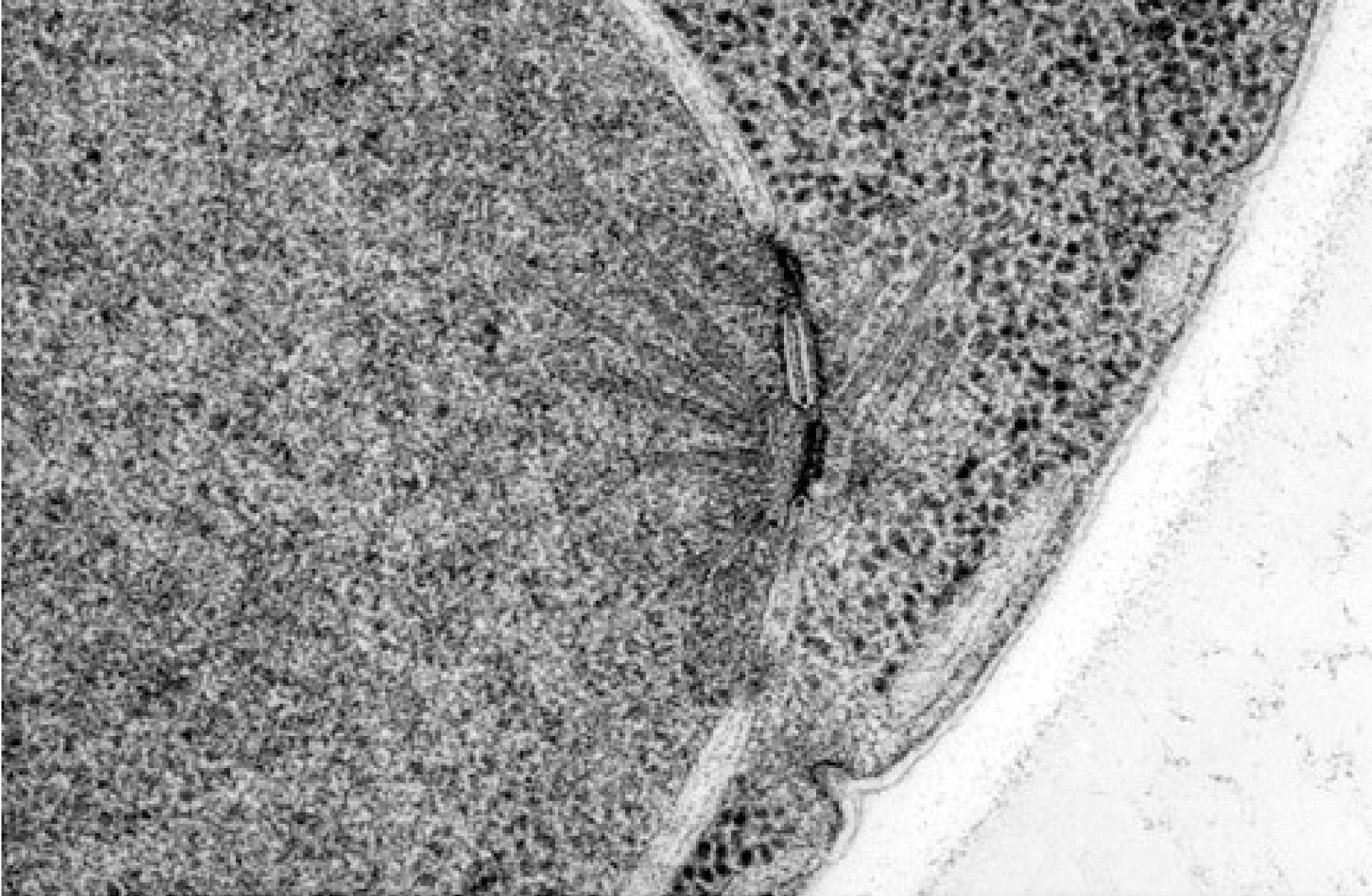






**Technika ultratenkých řezů dovoluje studovat i jemnou strukturu dělicího vřeténka, které je u kvasinek uvnitř jádra**





Ultrastruktura SPB (spindle pole body) s jadernými a cytoplasmatickými mikrotubuly

## Cytoskelet kvasinkové buňky:

síť vláknitých proteinů **aktinu a tubulinů**, která

- **generuje tvar buňky – morfogenezi**  
(kulatý, oválný, vřetenovitý, triangulární, cylindrický, vláknitý atd.
- **odpovídá za polaritu** klidové i rostoucí buňky
- **zajišťuje topologii** organel v cytoplasmě
- **umožňuje pohyb organel** v cytoplasmě
-

Aktin je organizován do vláken a do granul (patches)

**vlákna** se podílí na polaritě buňky, regulují pohyb sekrečních váčků a podílí se na cytokinezi

**granula** aktinu jsou angažovány do mechanismu sekrece a endocytózy

**Tubuliny (alfa a beta)** vytváří **mikrotubuly**, které vychází ze SPB (spindle pole body), tělíška v jaderném obalu.

V nedělicí se buňce jsou MT radiálně uspořádány v cytoplasmě a zajišťují polohu jádra

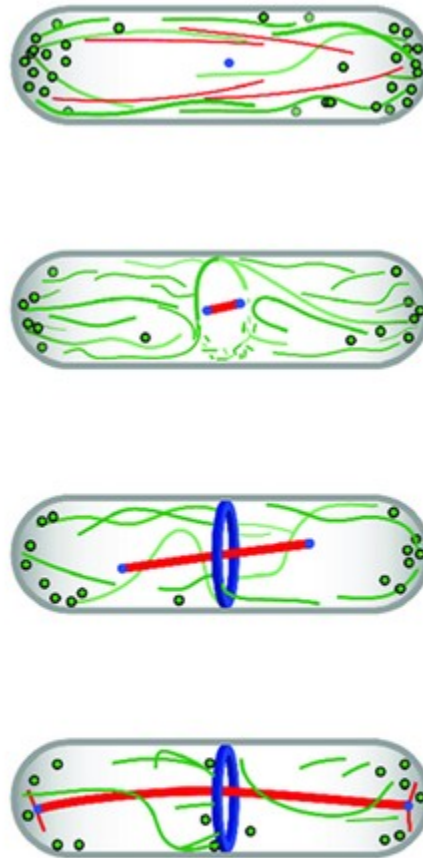
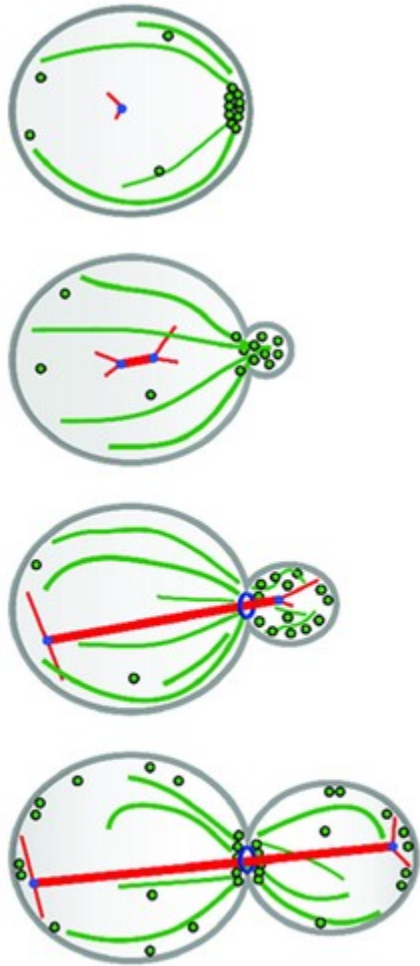
V průběhu mitózy MT vytváří vnitrojaderné dělicí vřetenko – spindle, které realizuje karyokinezi – oddělení dceřiných jader

# Cytoskeletální struktury kvasinkové buňky

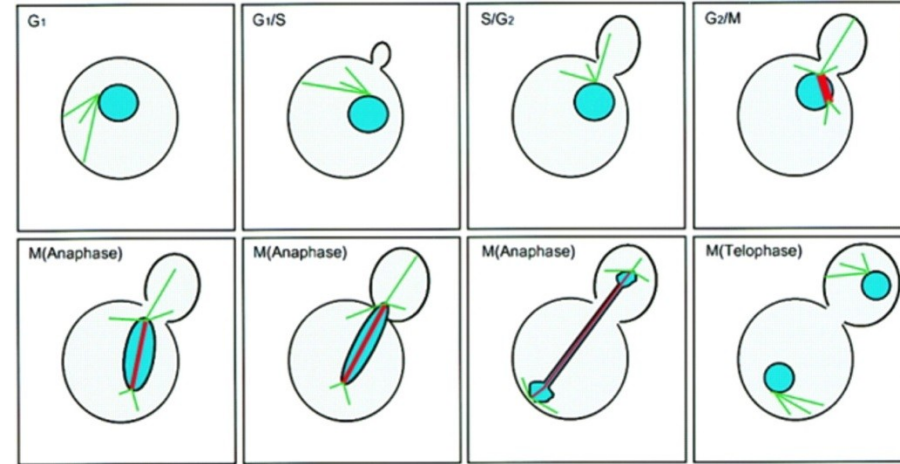
*S. cerevisiae*

*Sch. pombe*

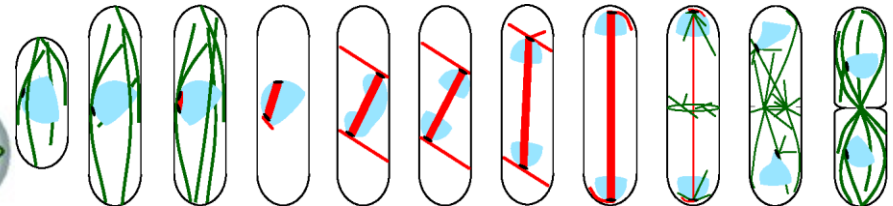
aktin



*S. cerevisiae* mikrotubuly

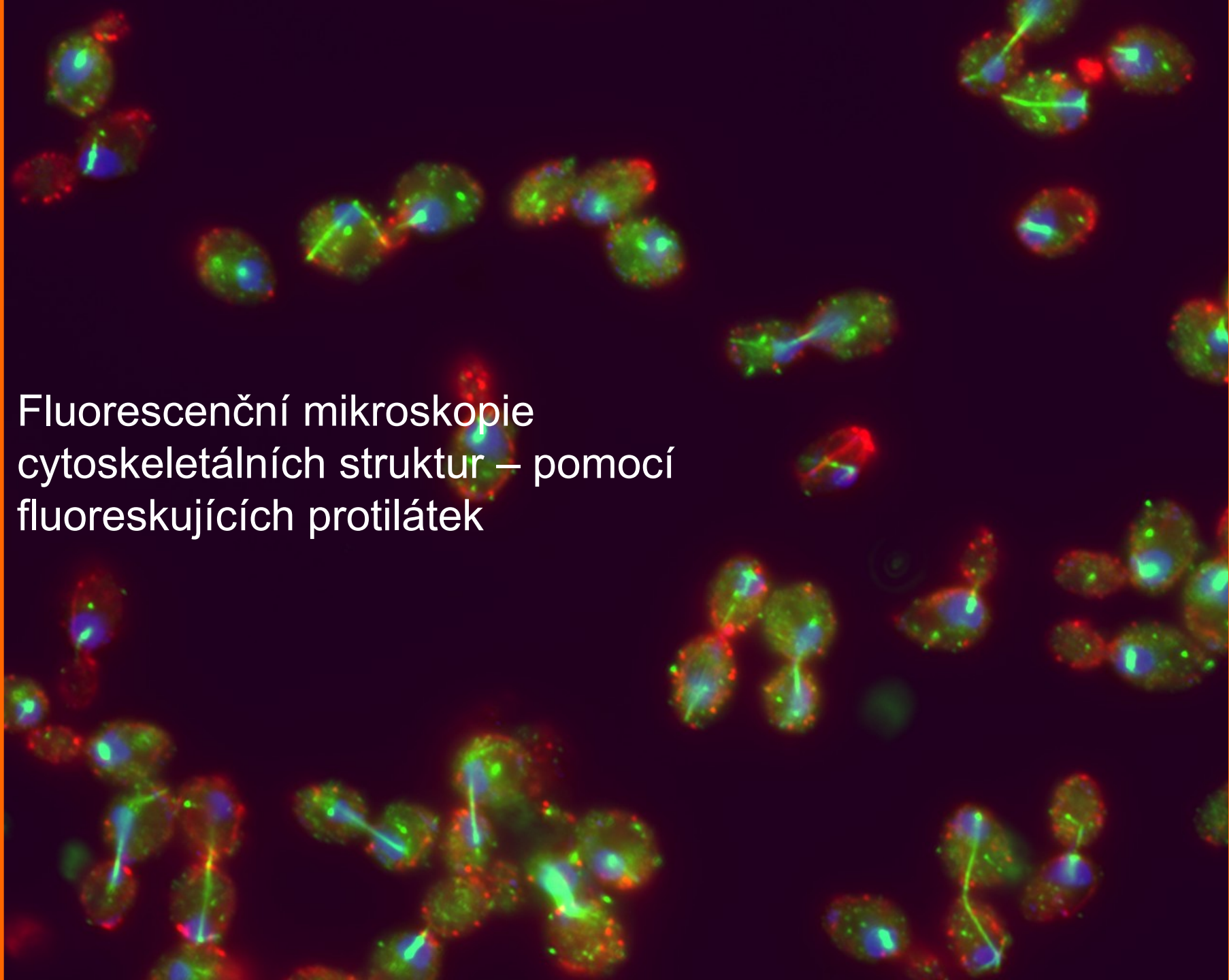


*Sch. pombe* mikrotubuly

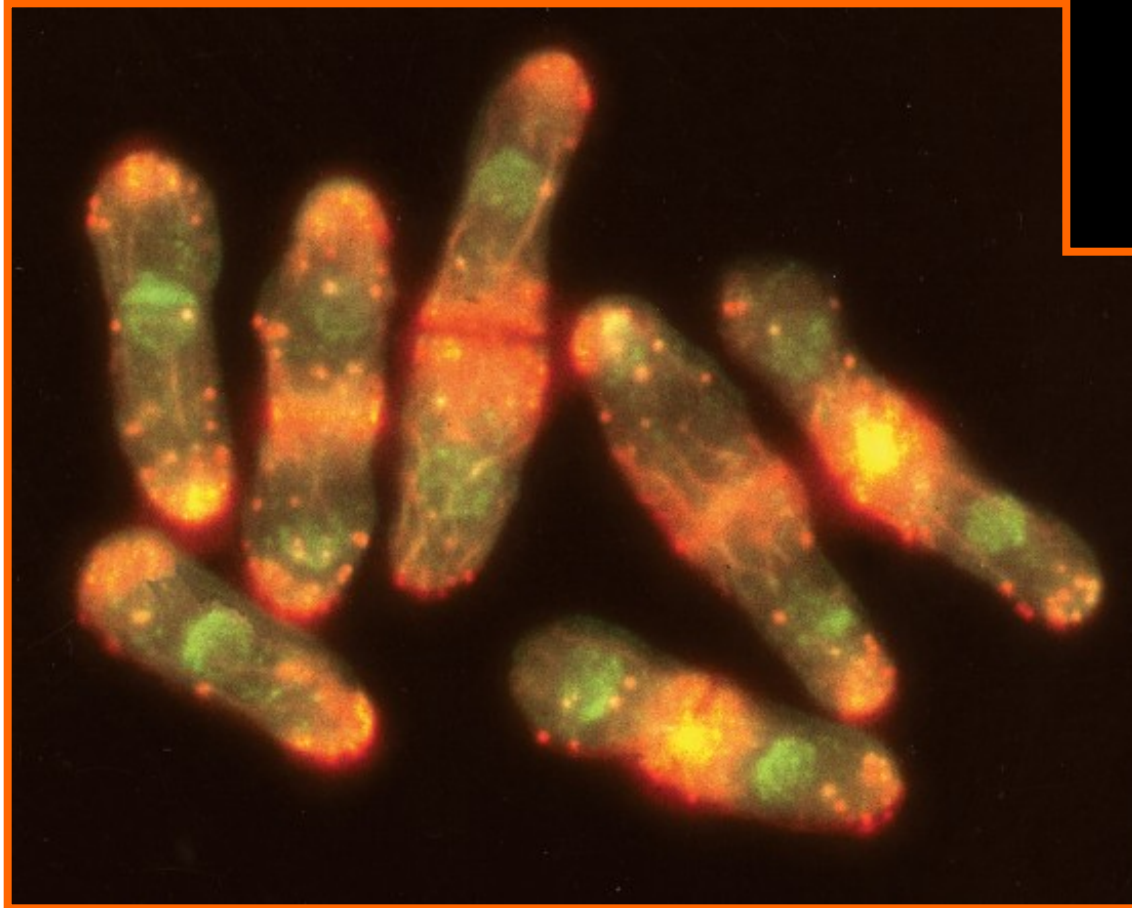
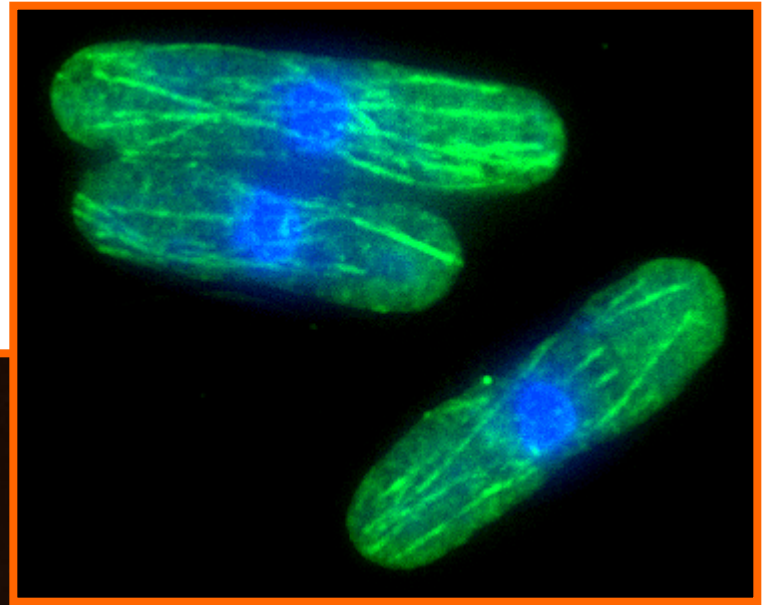


-  F-aktin cable or filament
-  Actin patch
-  Actomyosin ring
-  Spindle pole body
-  Spindle

Fluorescenční mikroskopie  
cytoskeletálních struktur – pomocí  
fluoreskujících protilátek

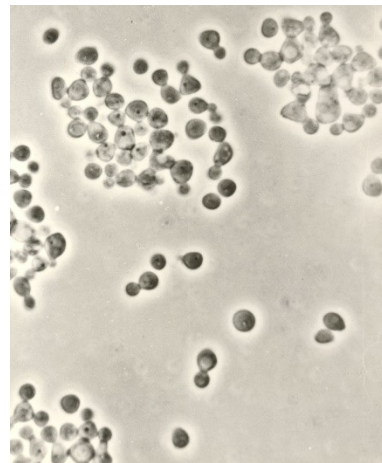


Mikrotubuly, aktin a  
jádra v buňkách  
Sch. pombe

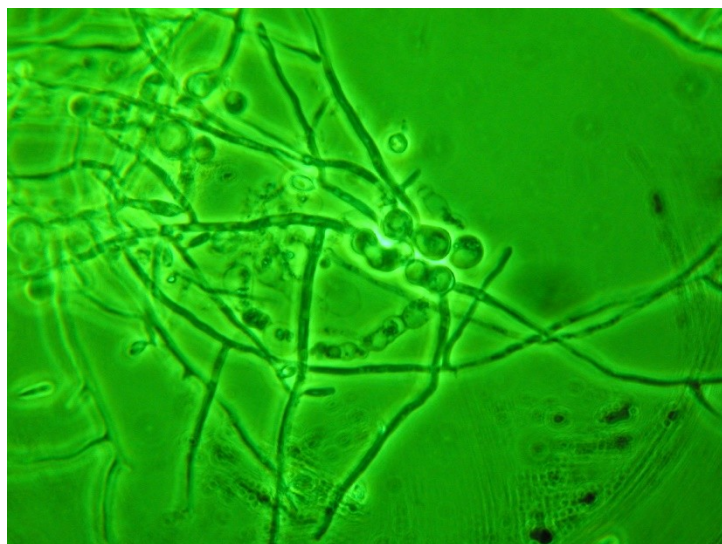




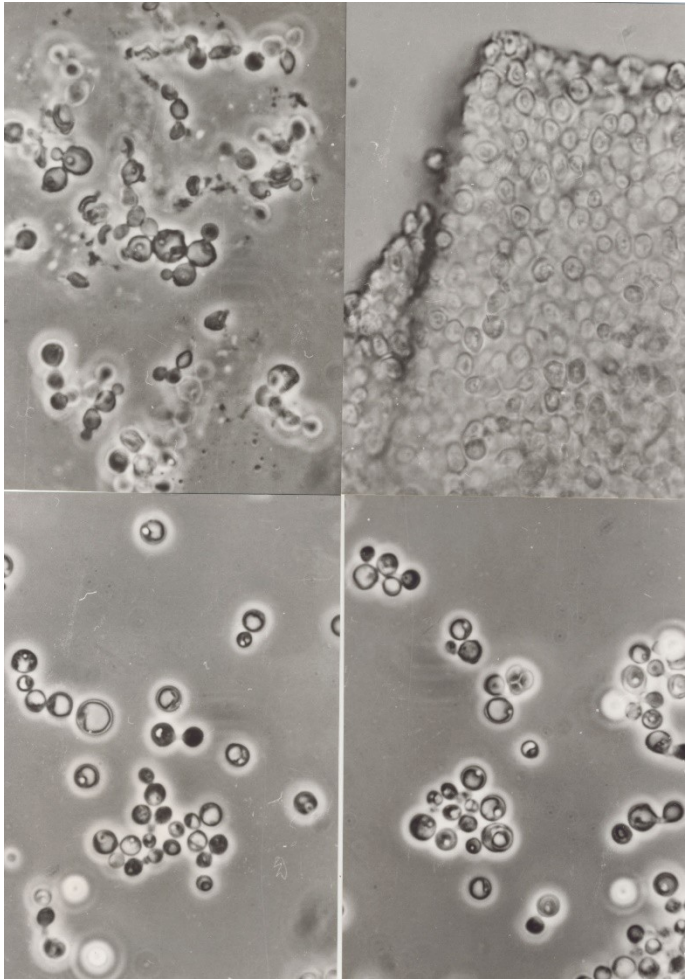
# Kvasinky jiných morfologických typů



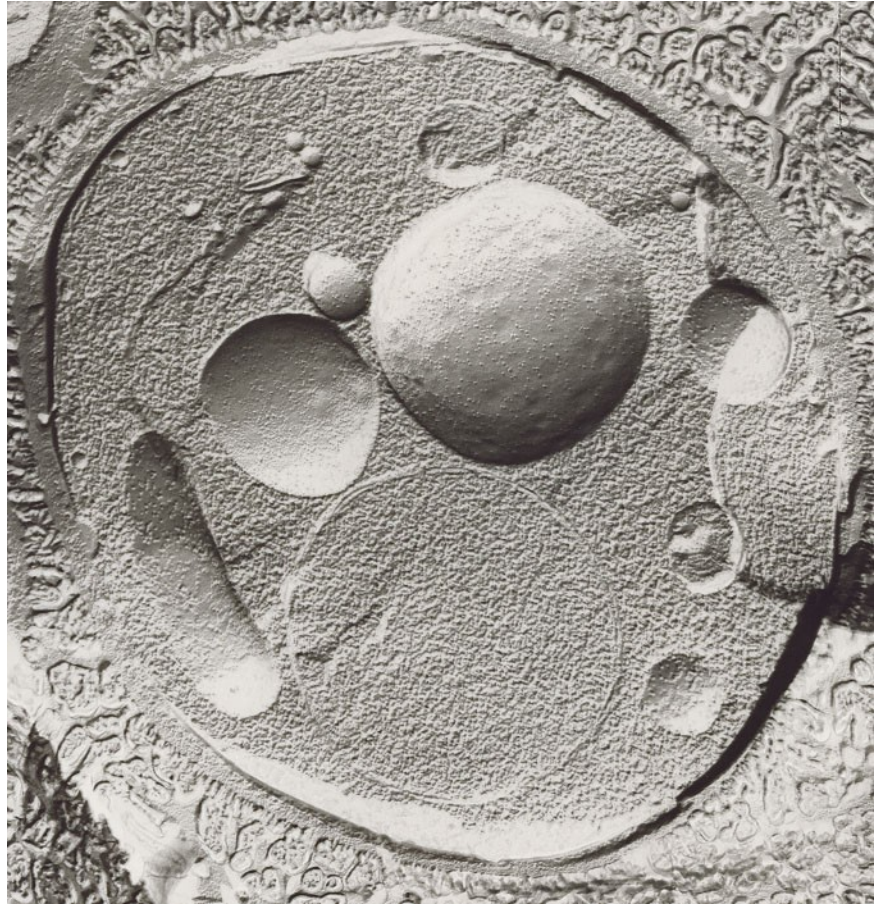
**Trigonopsis variabilis**  
nepatogenní dimorf –  
triangulární a elipsovitá  
forma

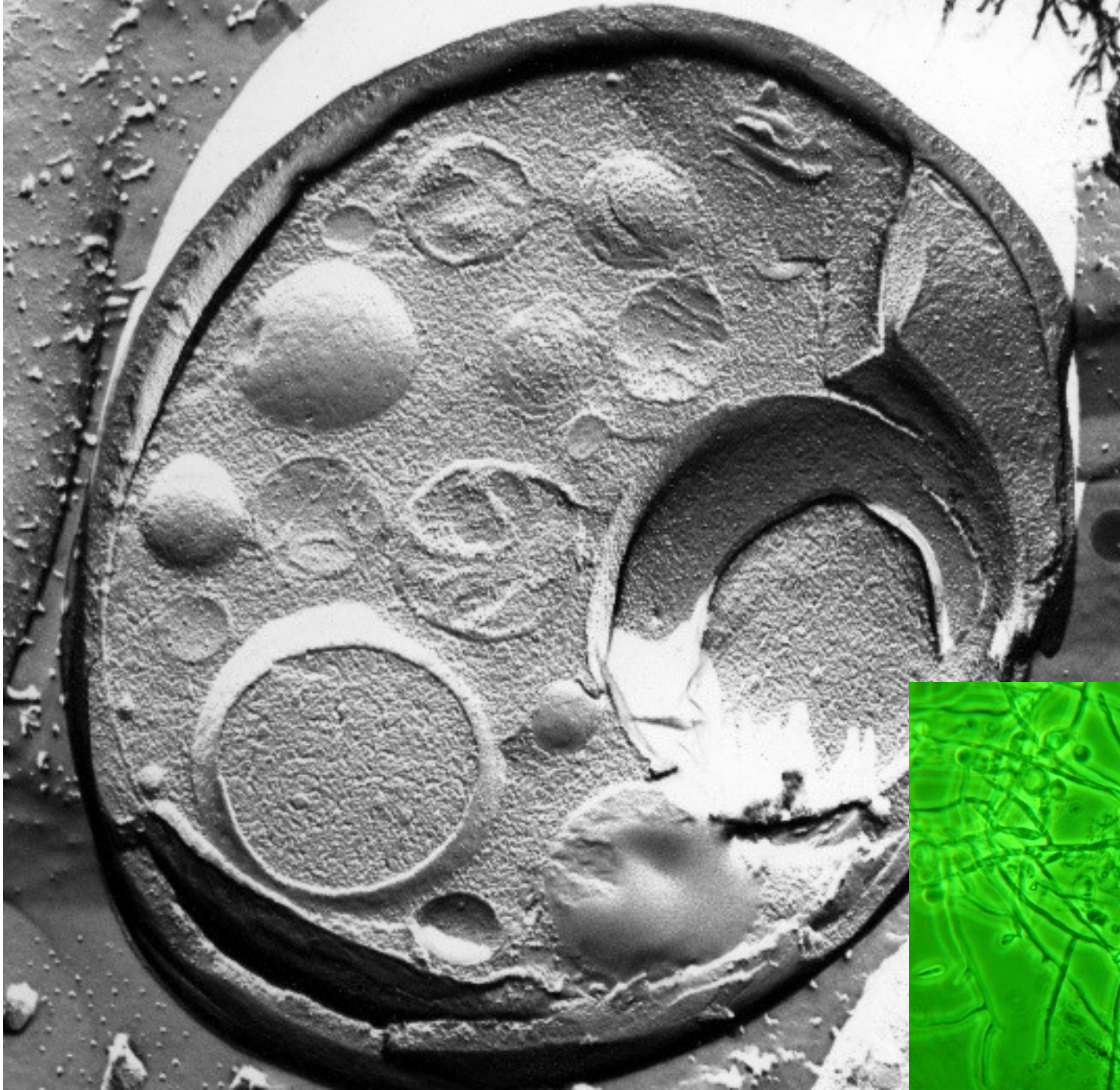


**Sporothrix schenckii**  
dimorfní patogen,  
vláknitá a elipsoidní  
forma



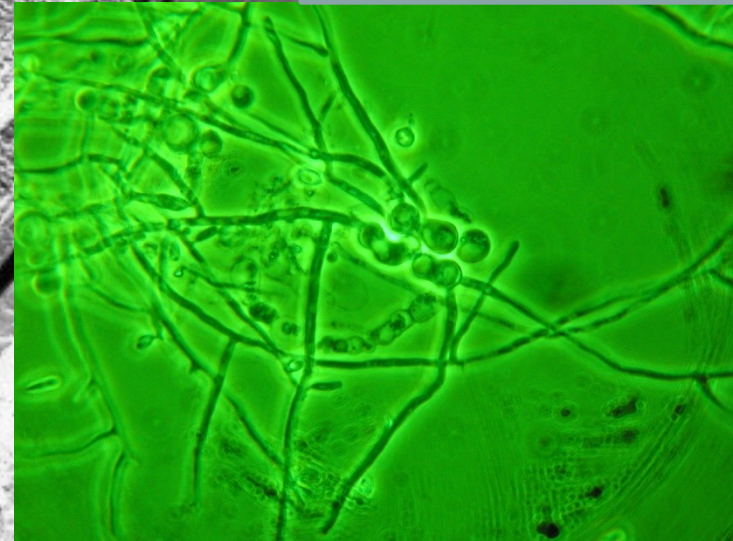
*Wingea robertsii*

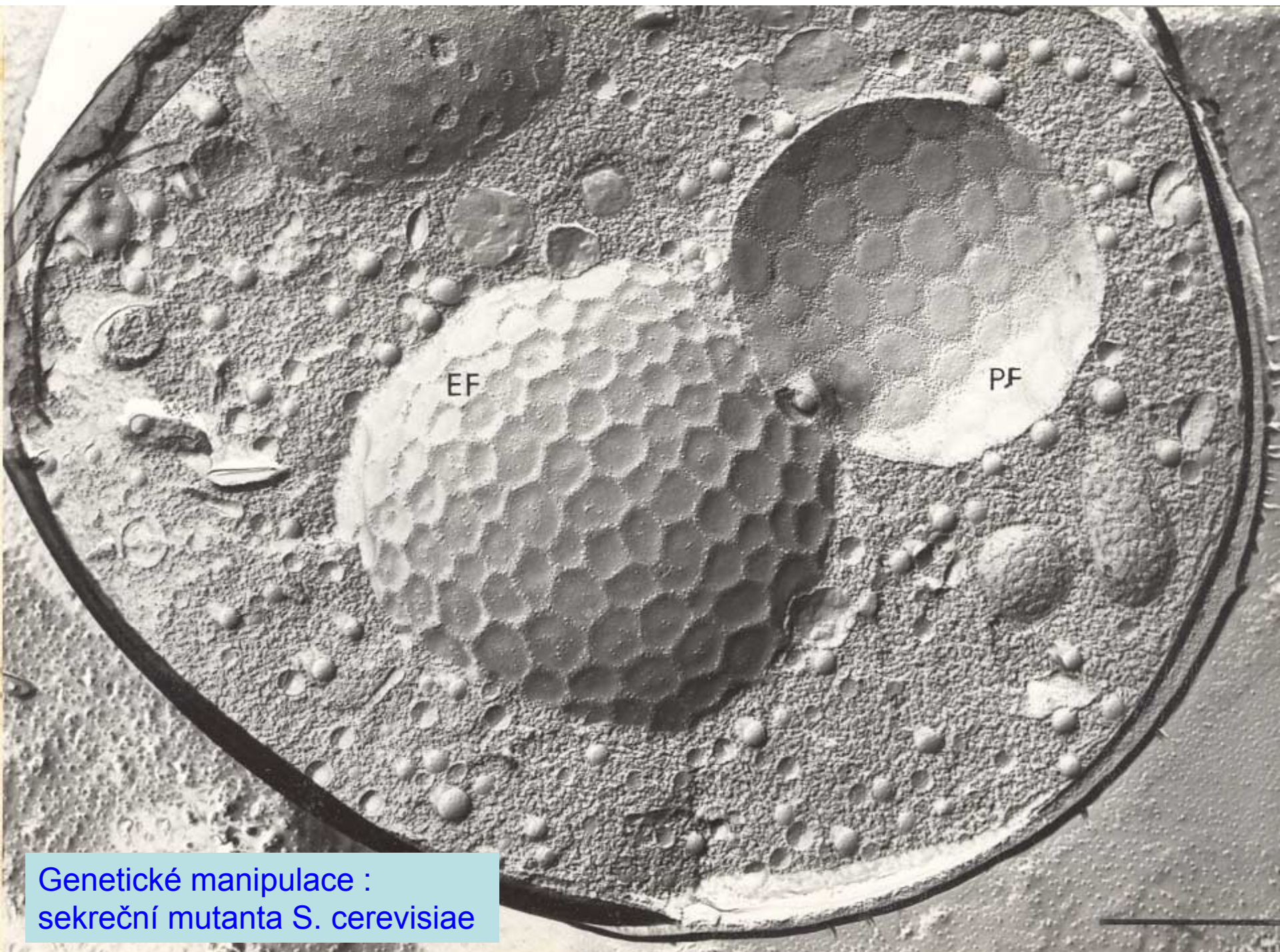




*Sporothrix  
schenckii*

dimorfní kvasinka





Genetické manipulace :  
sekreční mutanta *S. cerevisiae*

Somatic hybridizace kvasinek  
cestou buněčné fúze

