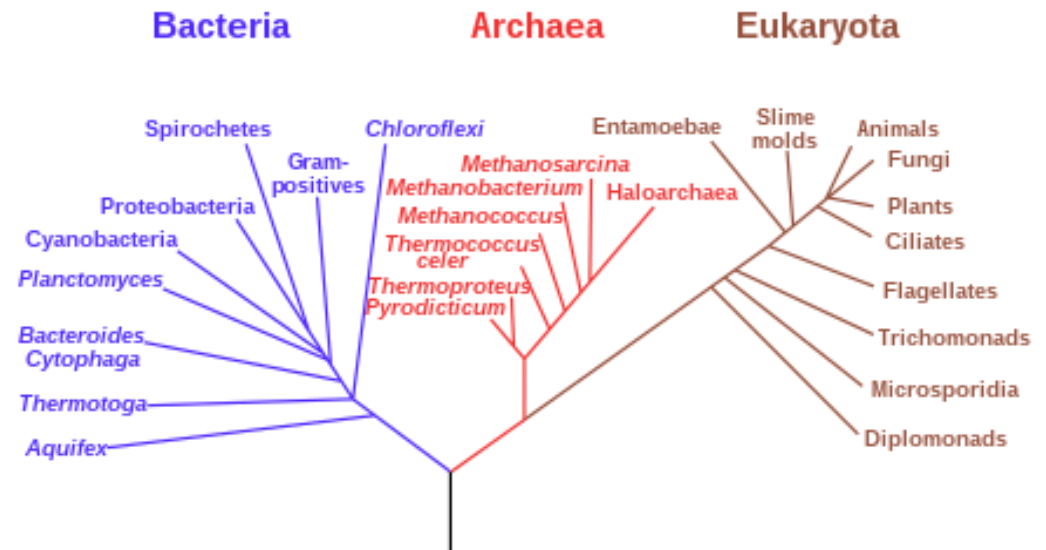
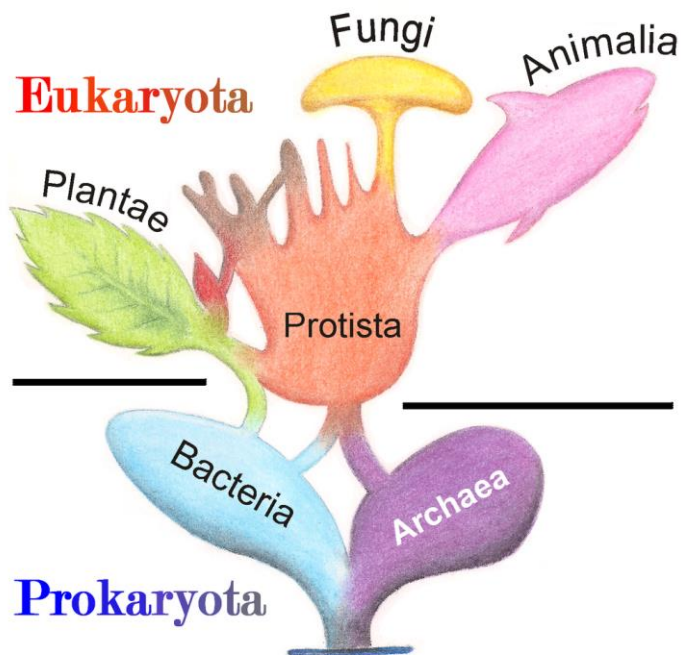


Kvasinková buňka

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



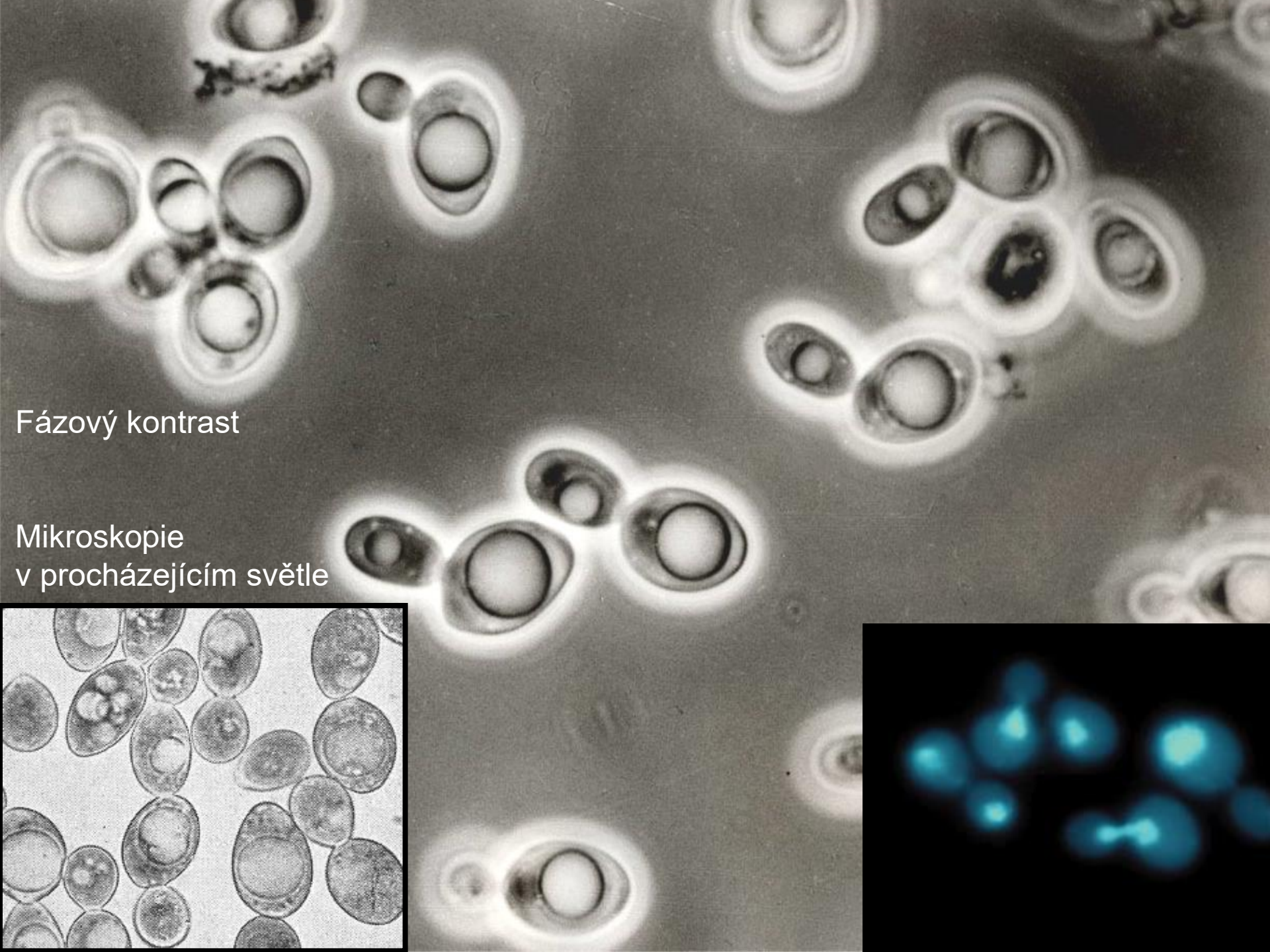
Fylogenetický strom - porovnání genu pro rRNA

Historie poznávání kvasinek

- 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

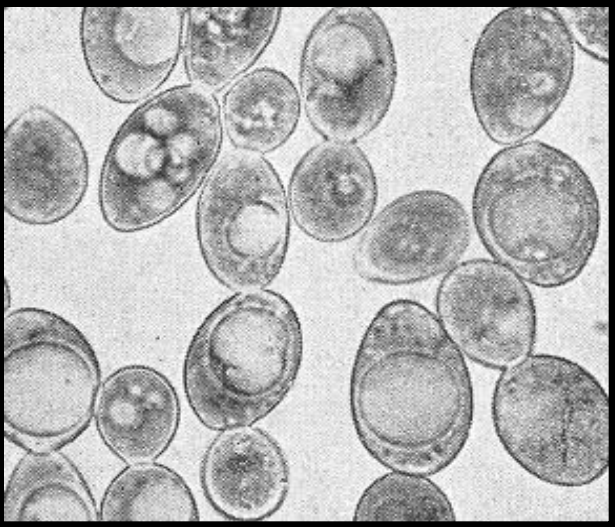
Historie poznávání kvasinek

- 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*, α 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*



Fázový kontrast

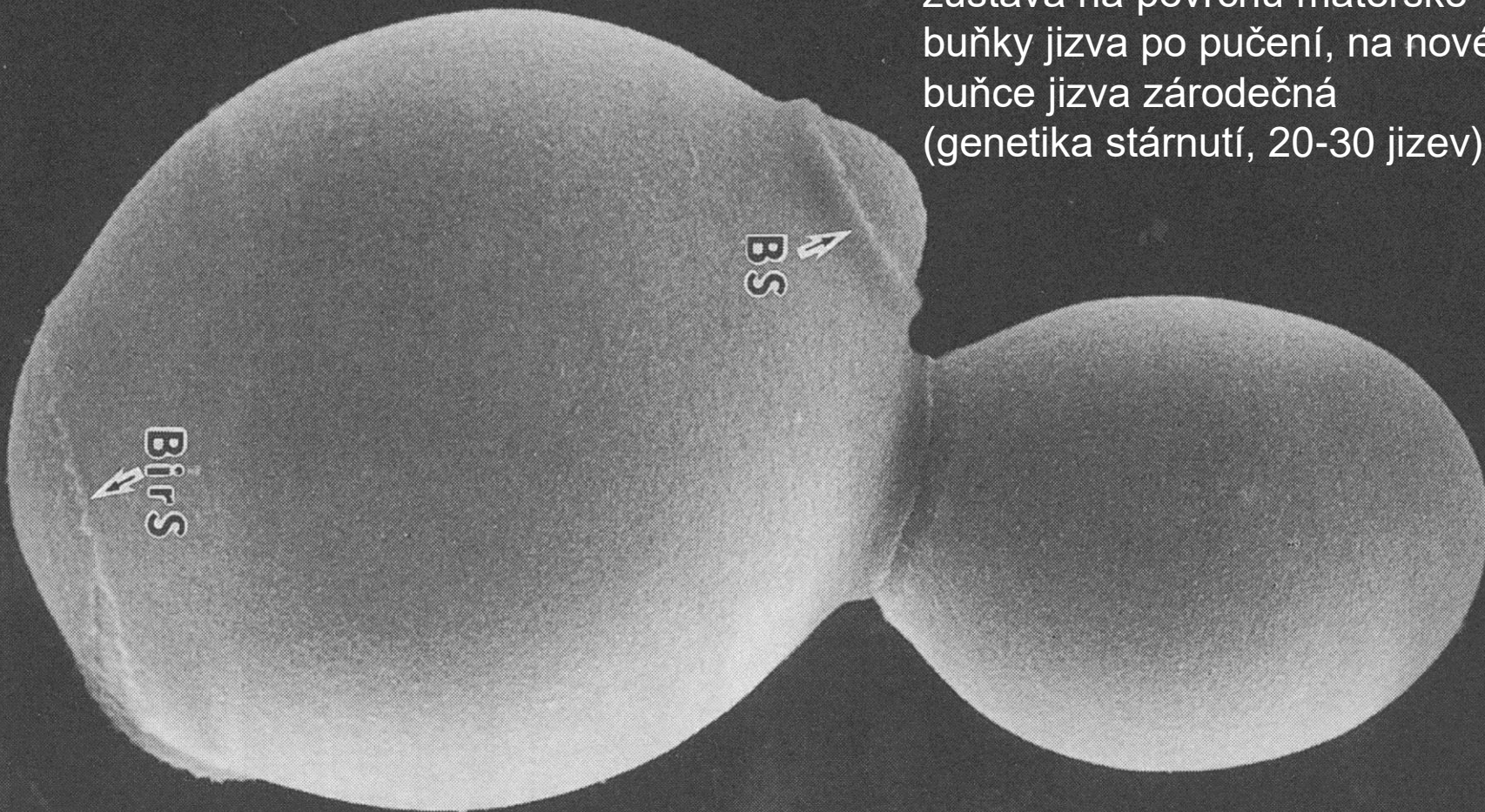
Mikroskopie
v procházejícím světle



Skenovací elektronová mikroskopie

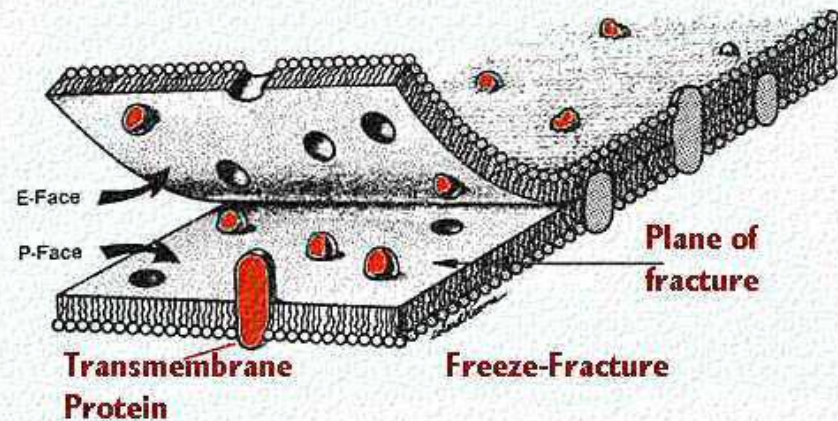
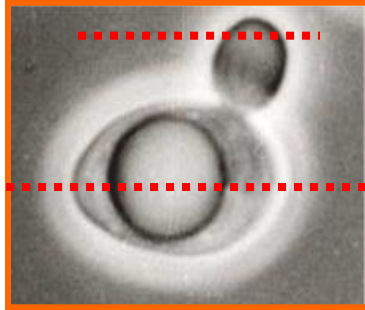
1a

Po oddělení dceřinné buňky zůstává na povrchu mateřské buňky jizva po pučení, na nové buňce jizva zárodečná (genetika stárnutí, 20-30 jizev)

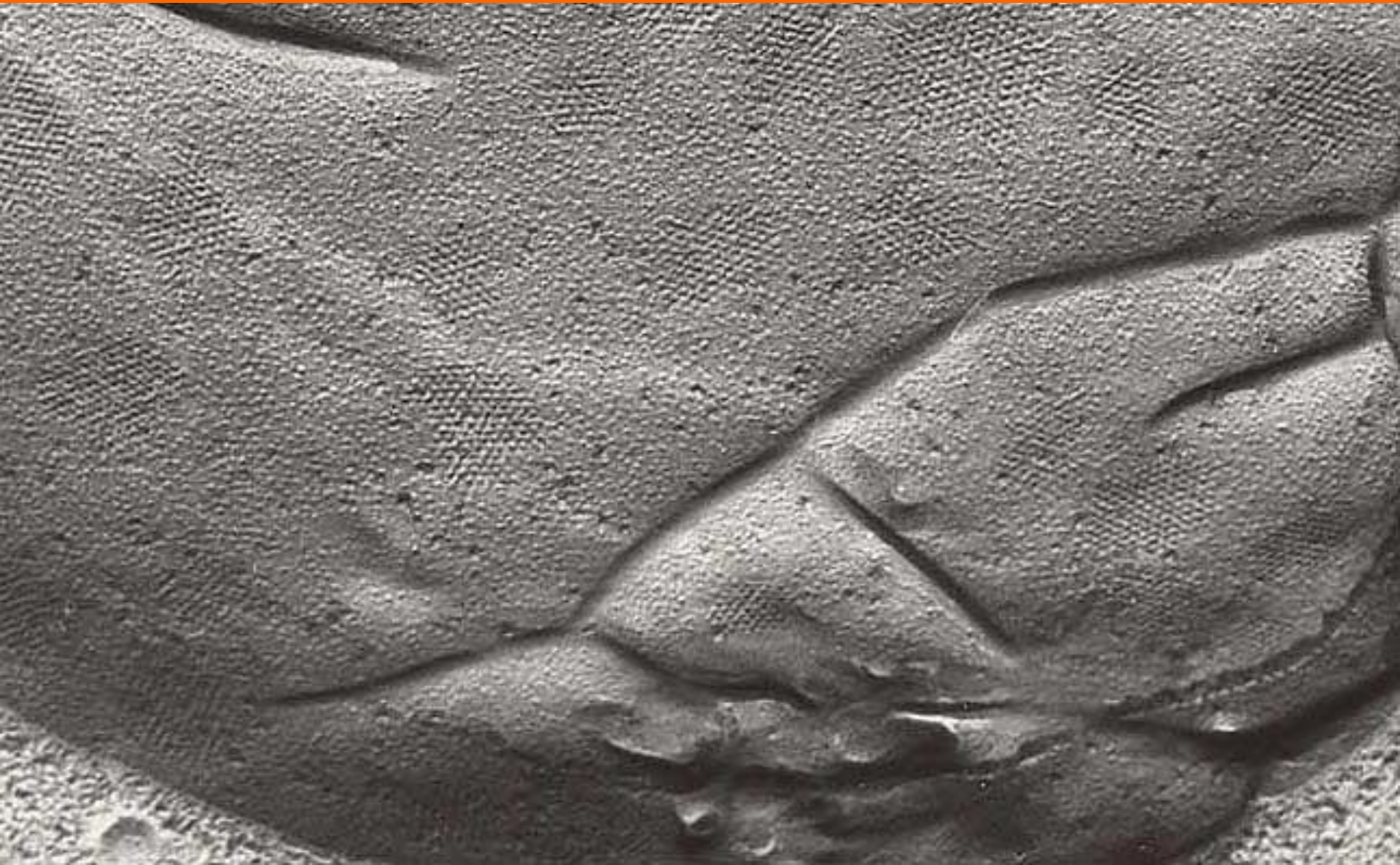


Mateřská buňka s vyrůstajícím pupenem

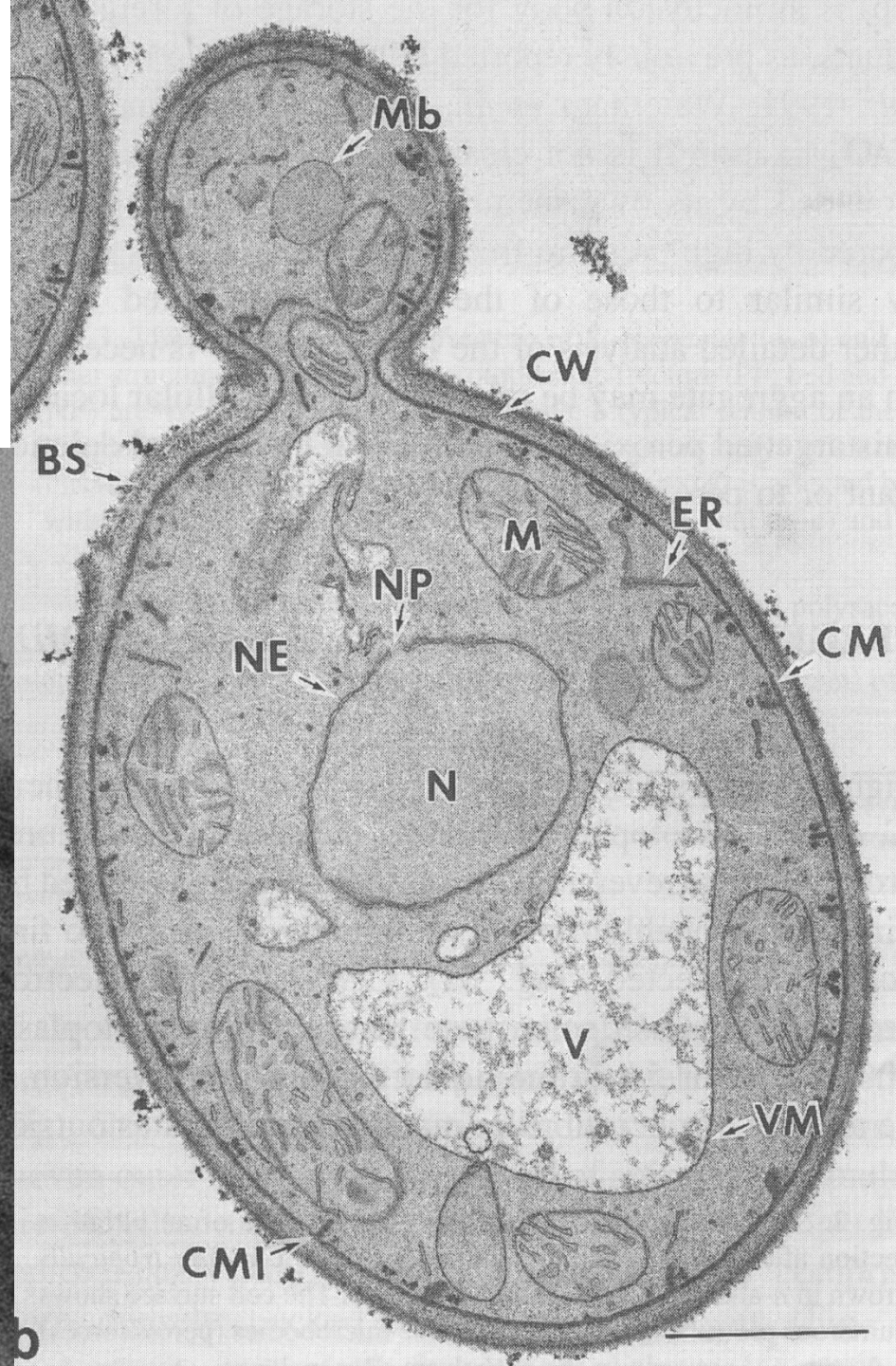
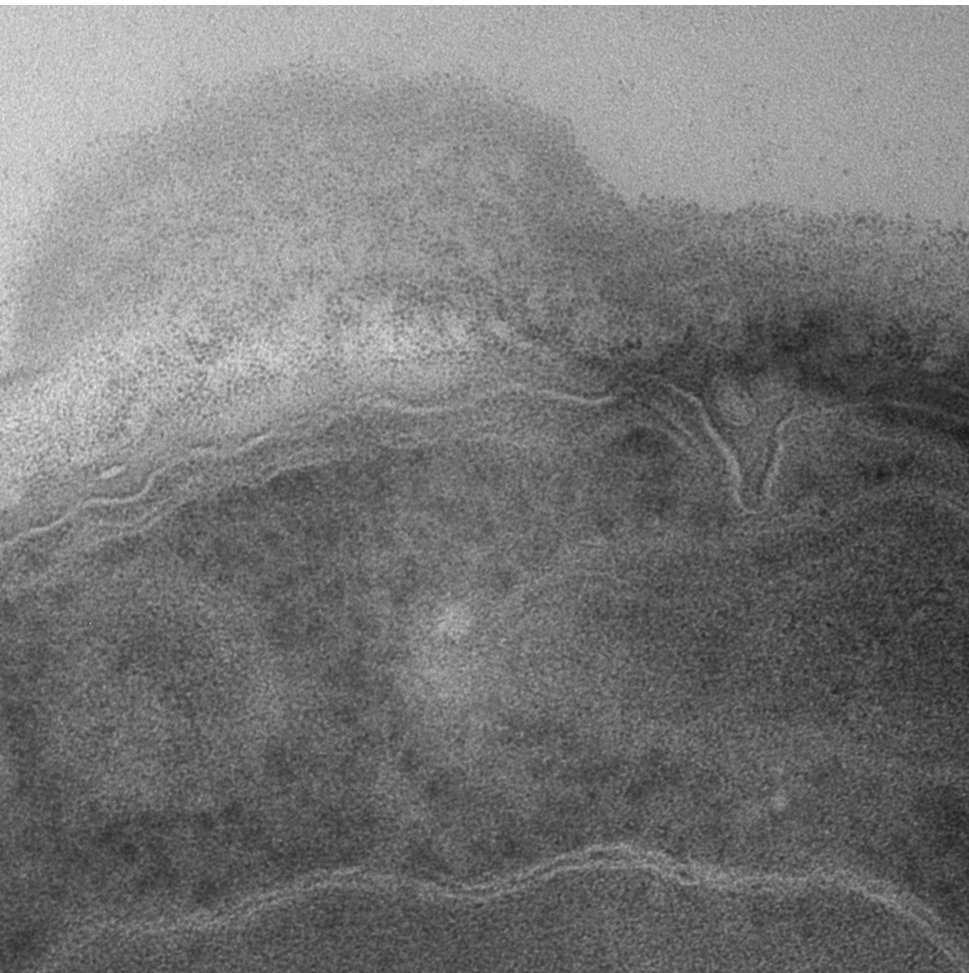
Technika mrazového lámání – freeze fracturing



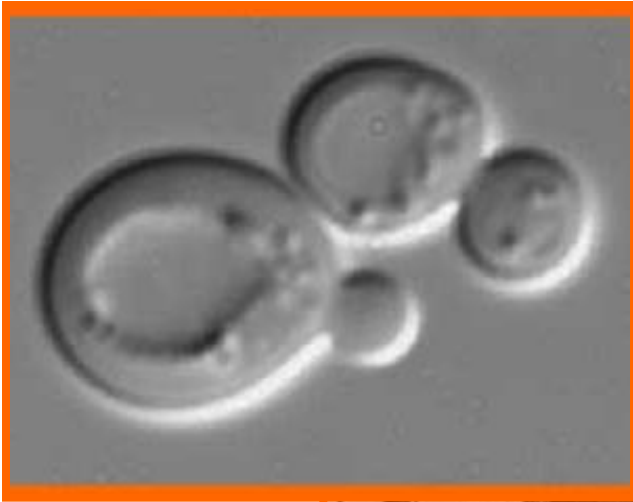
Povrch plasmatické membrány *S. cerevisiae*
odhalený technikou mrazového lámání (brázdy)



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

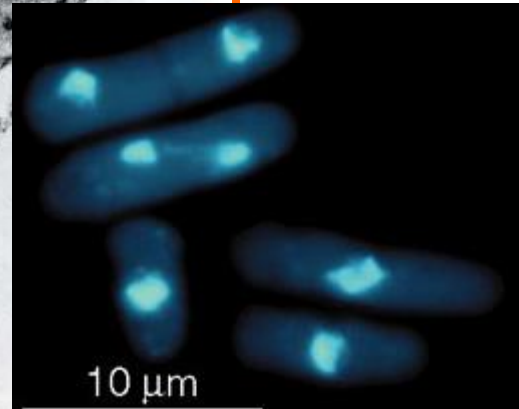
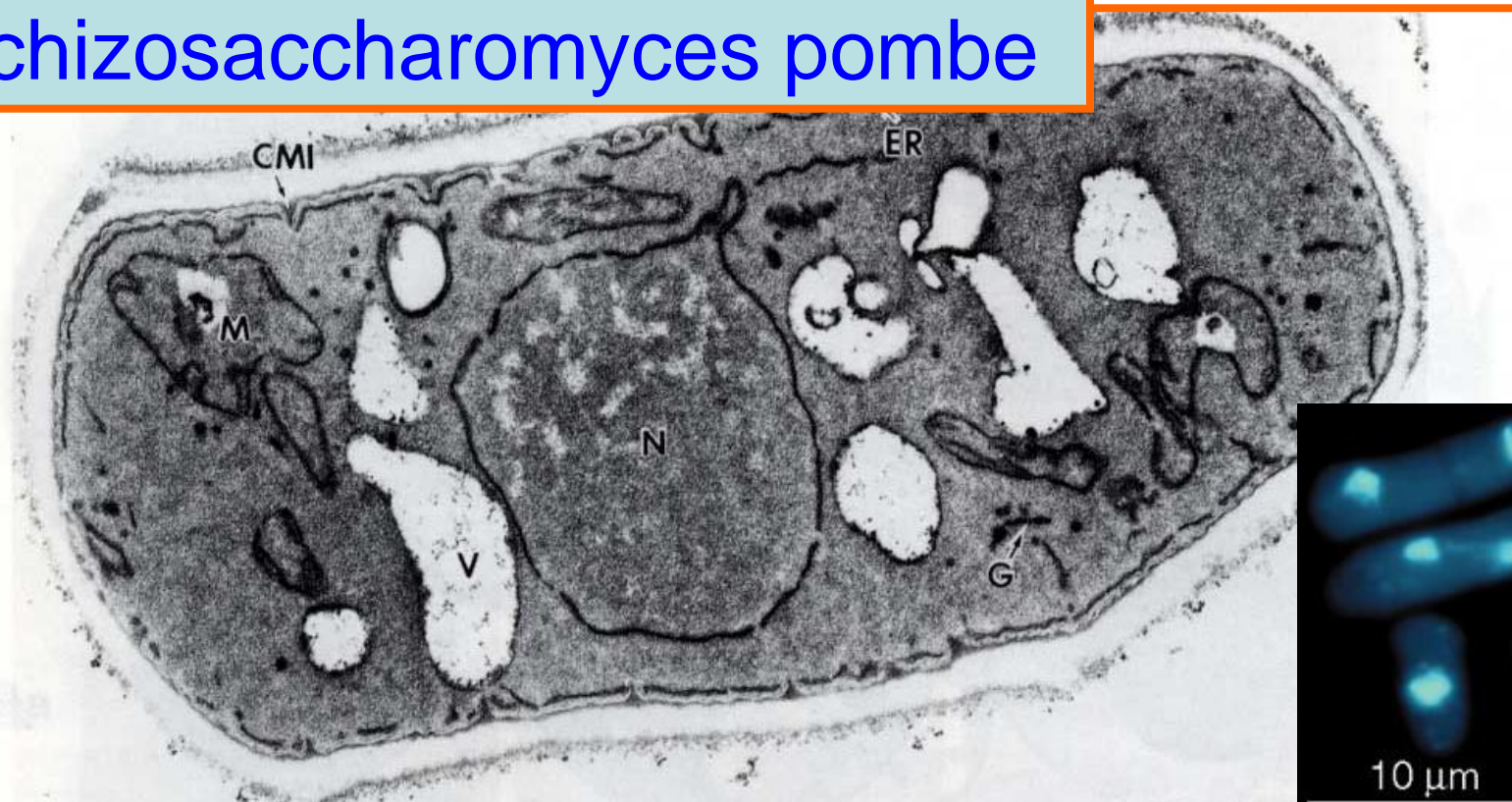


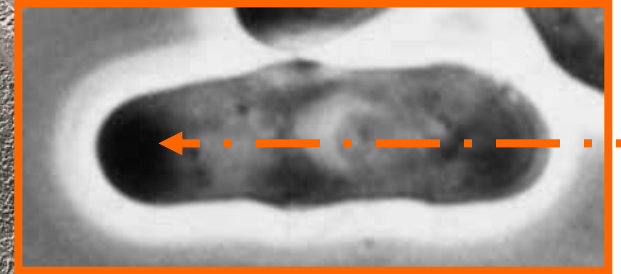
Pučení *S. cerevisiae*



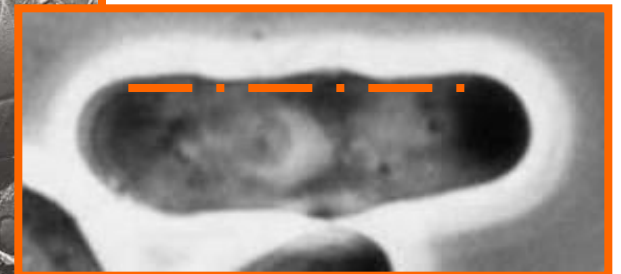
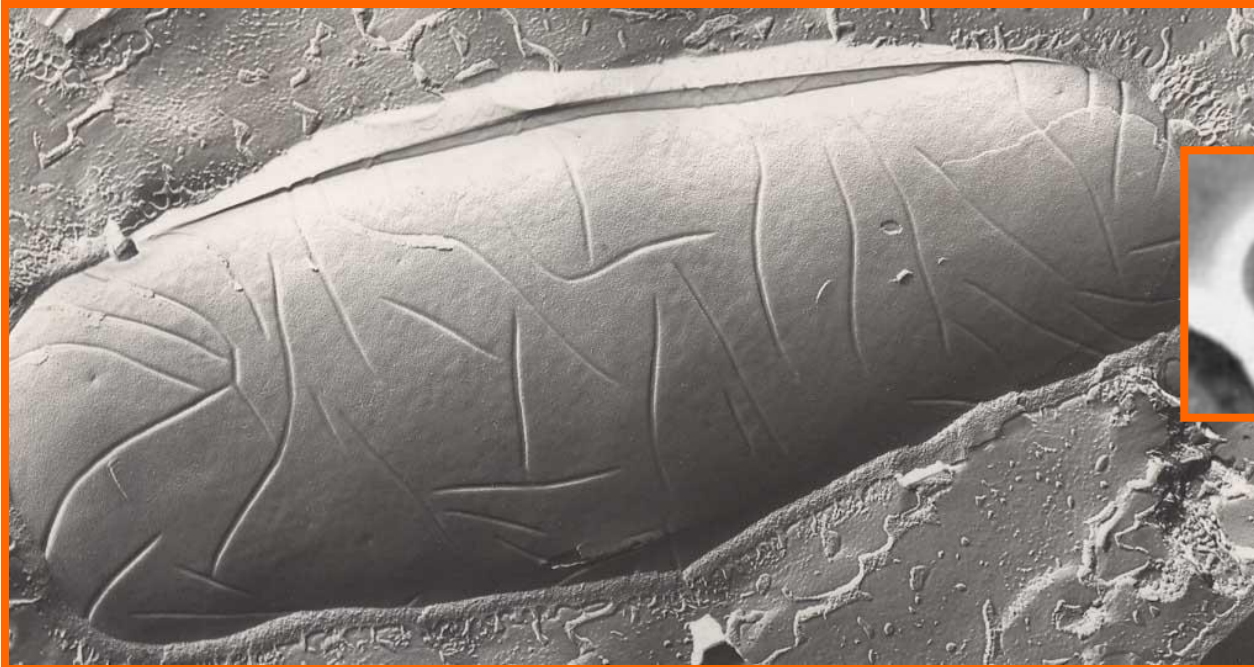


Schizosaccharomyces pombe





Preparace buněk
technikou
mrazového
lámání





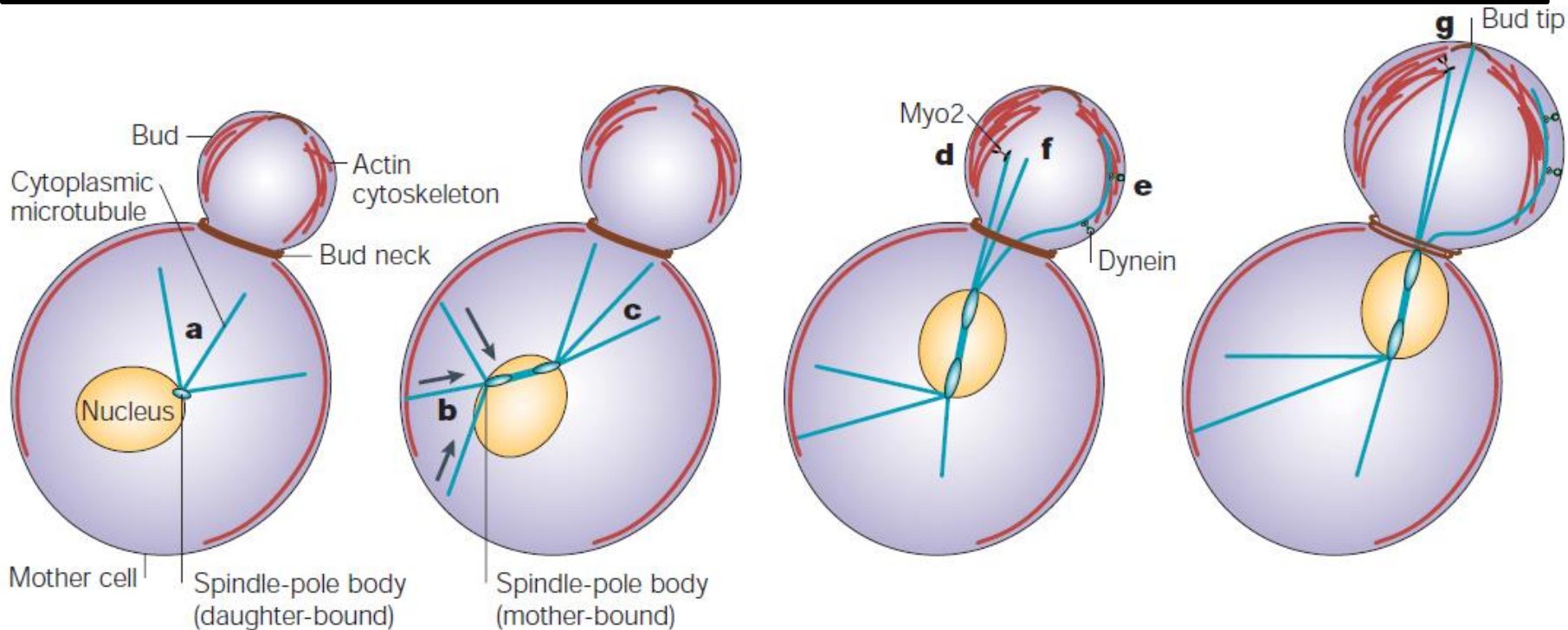
Povrch spory s částečně odhalenou plasmatickou membránou

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

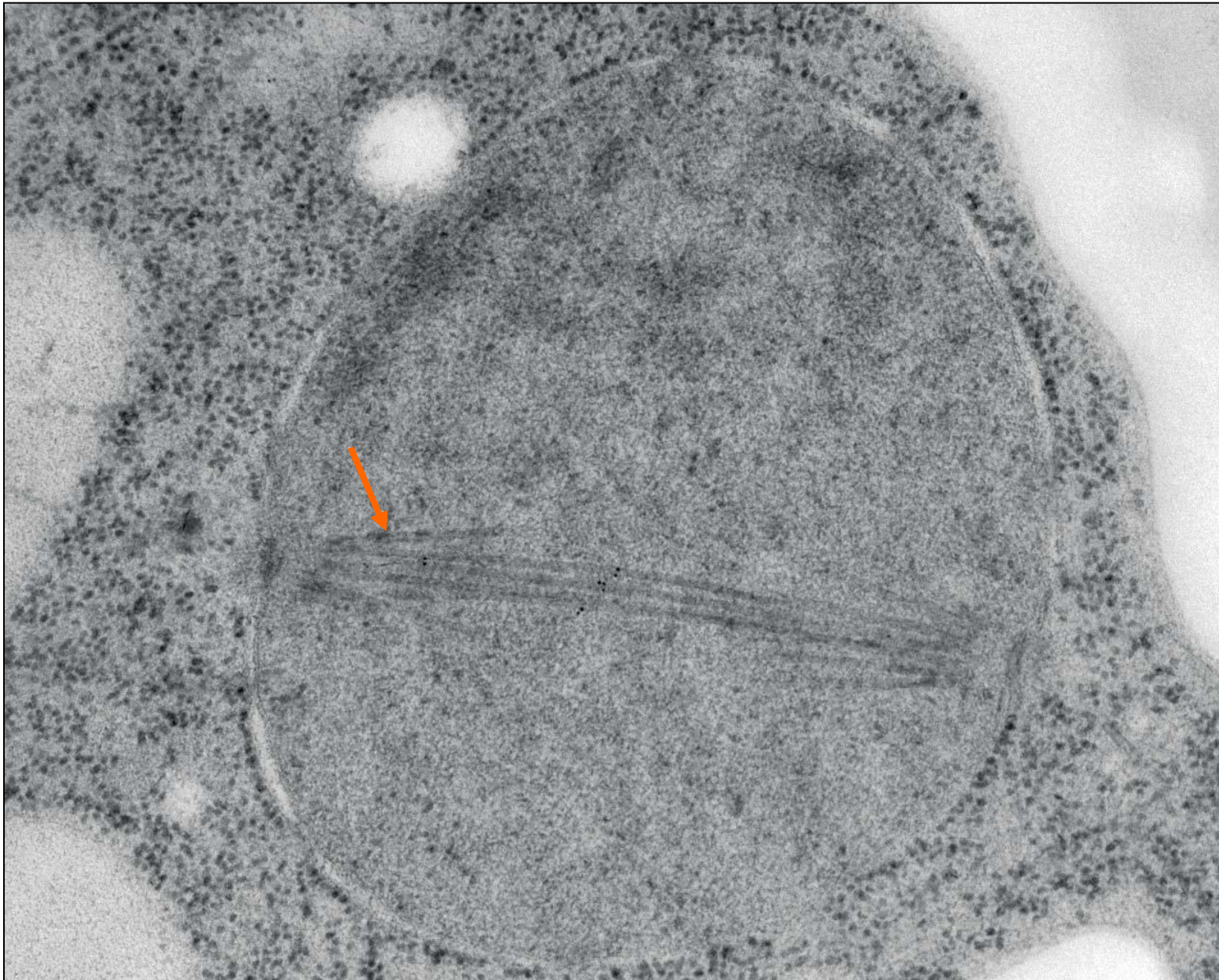
CEN centromera chromosomu

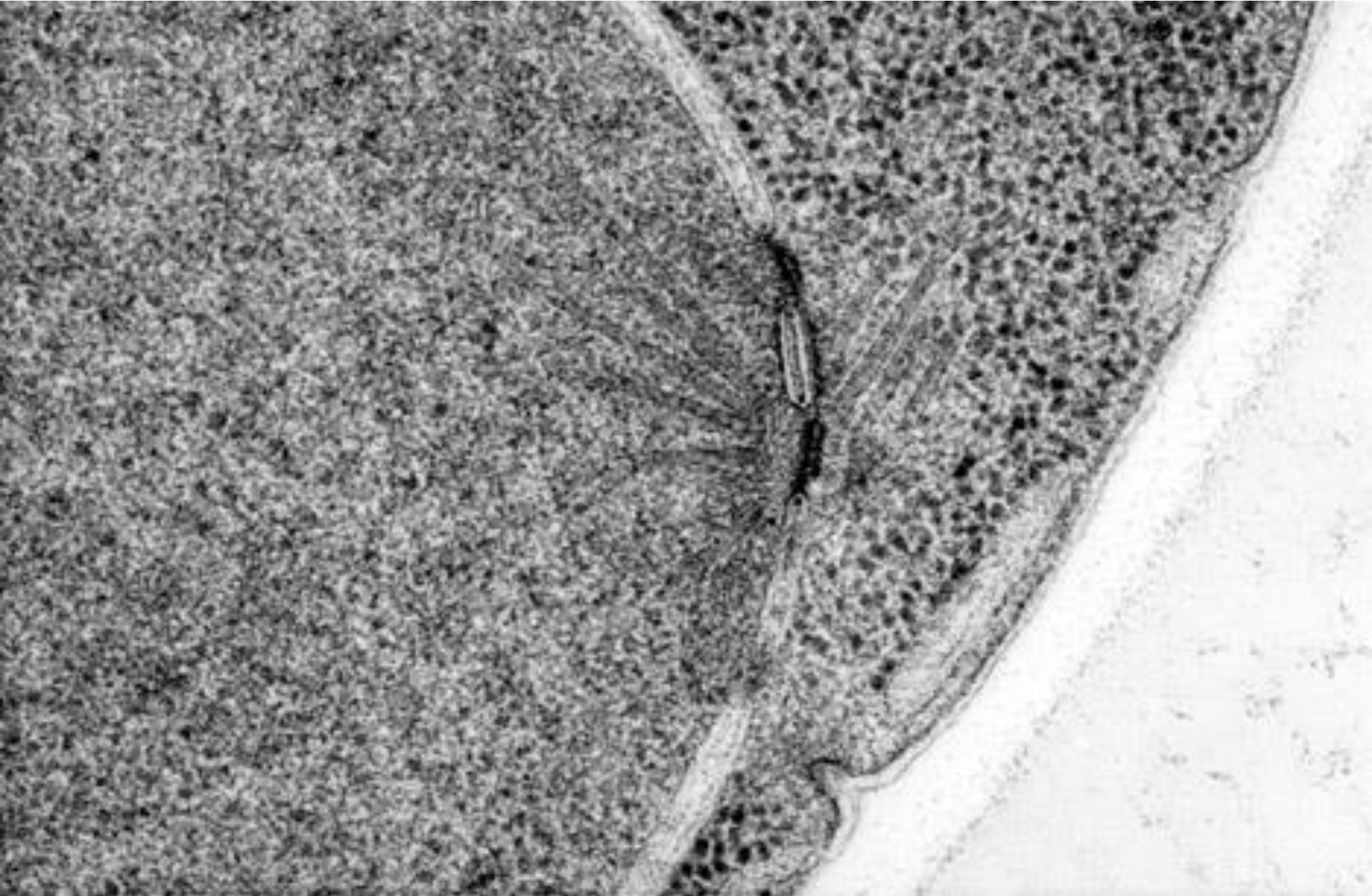
TEL telomery chromosomů



Cytoplazmatické dyneiny umožňují vnitrobuněčný transport různých membránových organel a růst pupenu.

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:

sít' 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 (MT)**, které vychází ze SPB (spindle pole body), tělíška v jaderném obalu.

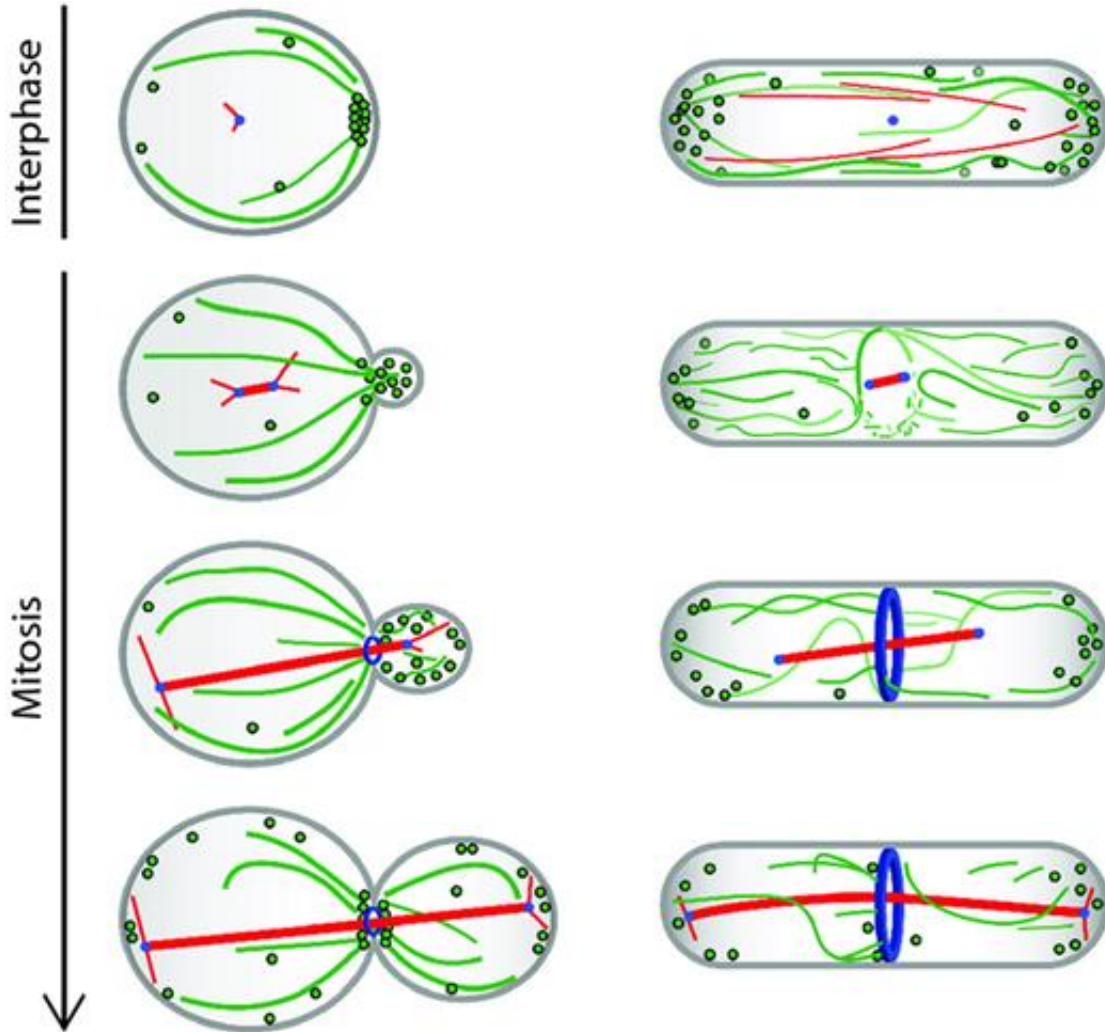
V nedělicí se buňce jsou MT radiálně uspořádány v cytoplasmě a zajišťují polohu jádra.

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

Cytoskeletální struktury kvasinkové buňky

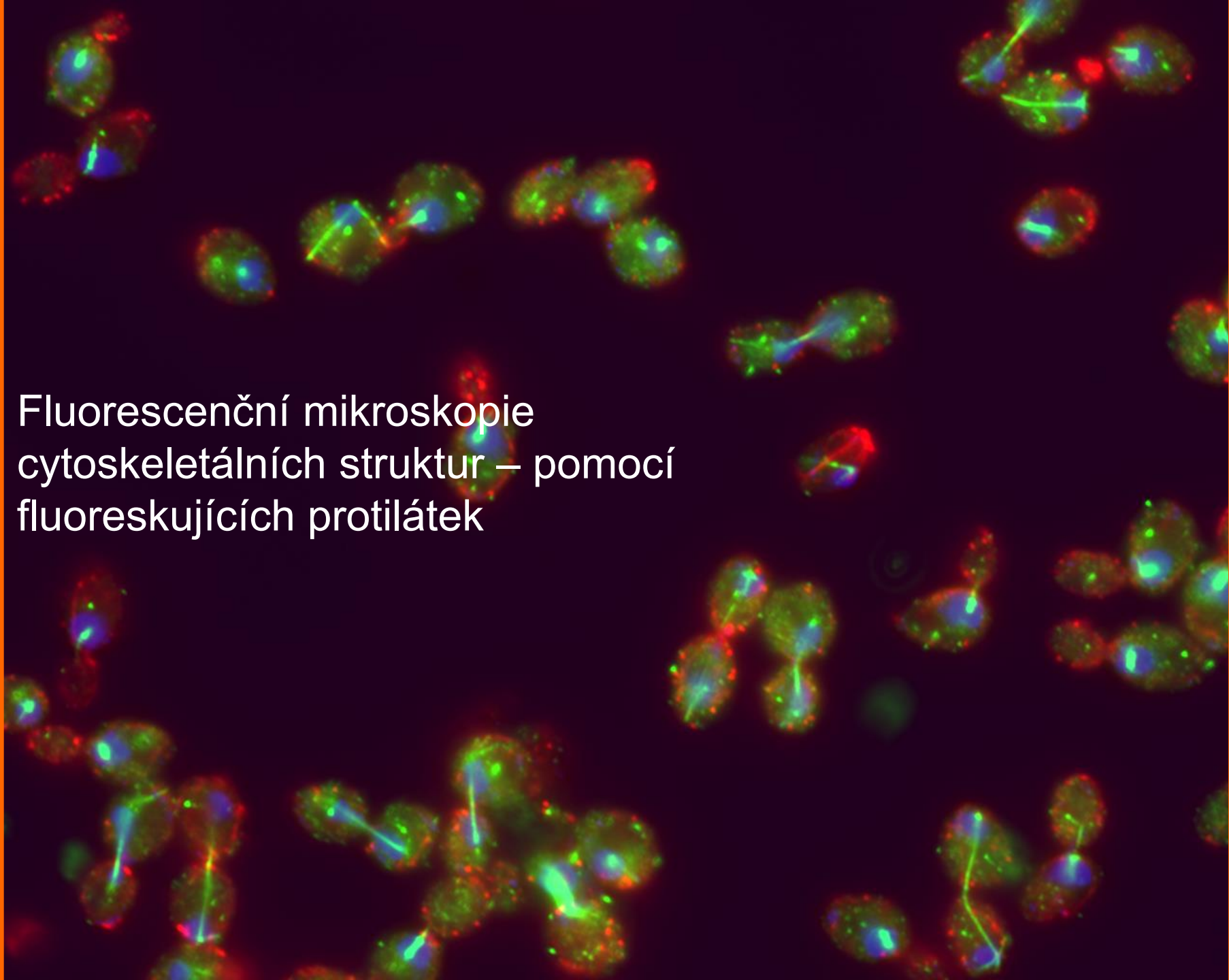
S. cerevisiae

Sch. pombe



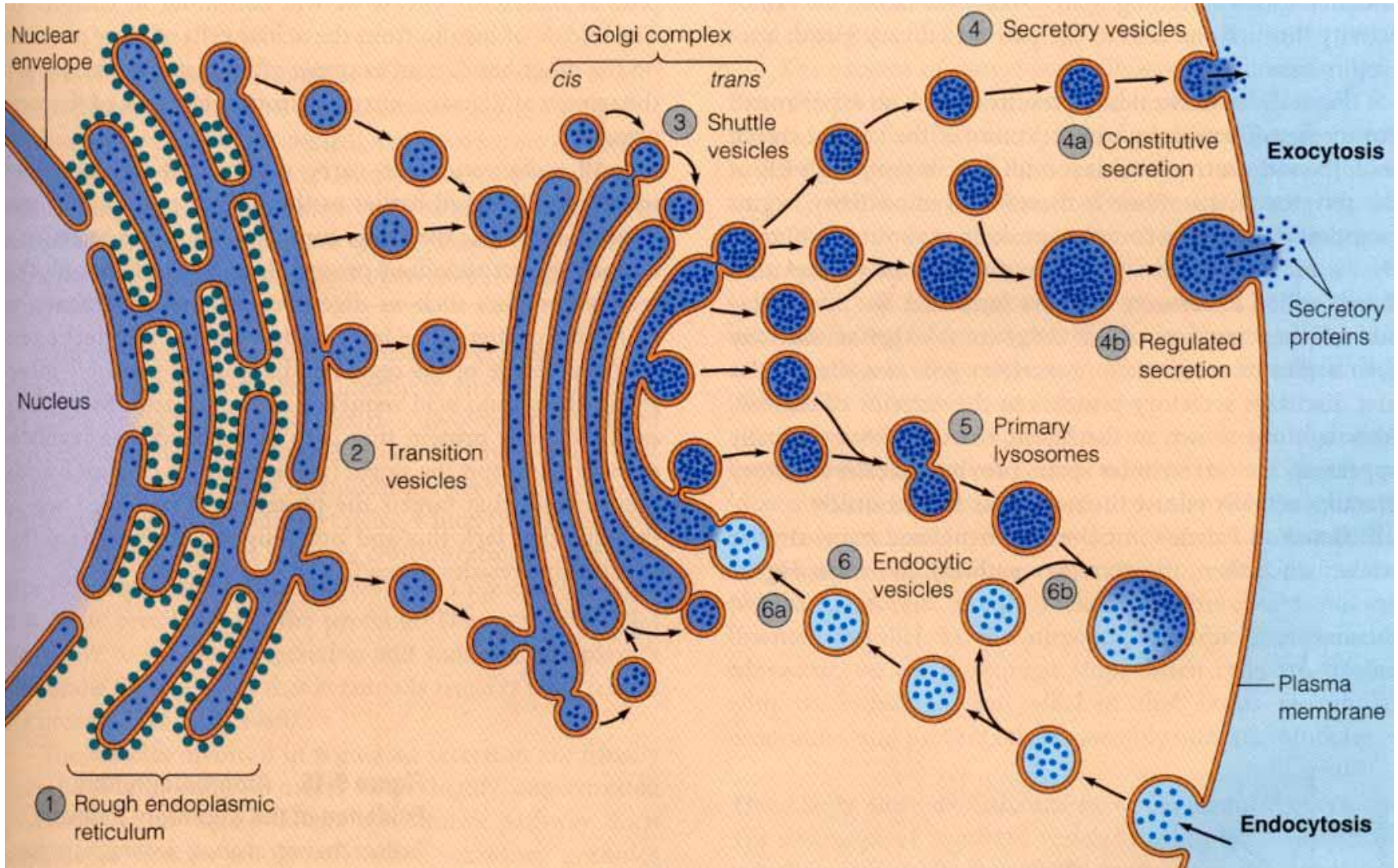
— F-actin cable or filament ● Actin patch ○ Actomyosin ring
● Spindle pole body — Spindle

Fluorescenční mikroskopie
cytoskeletálních struktur – pomocí
fluoreskujících protilátek



Sekreční dráha a endocytóza (vesikulární transport)

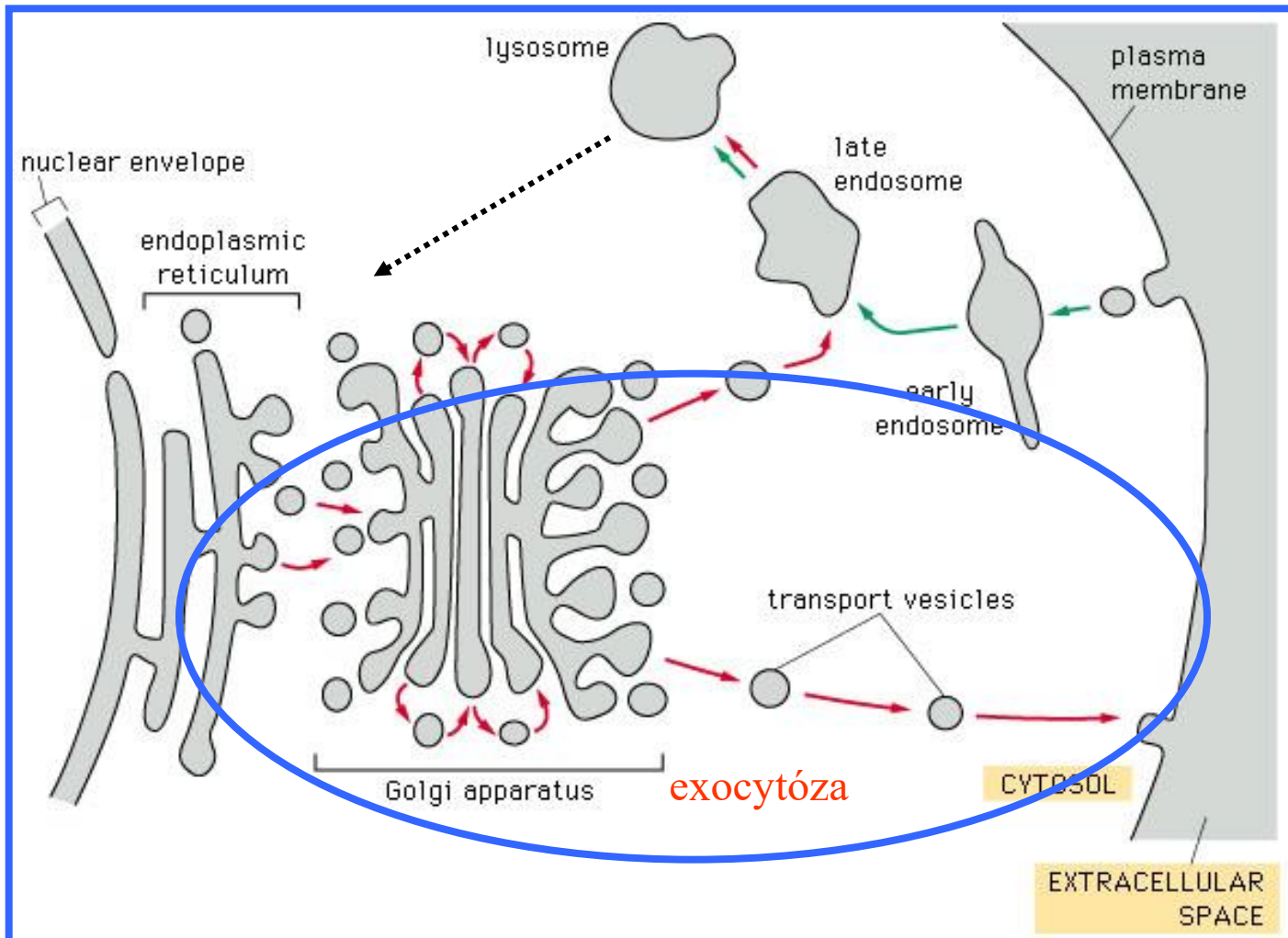
Charakteristika pojmů: endocytóza pinocytóza (tekutiny)-
fagocytóza (pevné látky)
exocytóza (sekrece) regulovaná / konstitutivní



Spřažení exocytózy a endocytózy

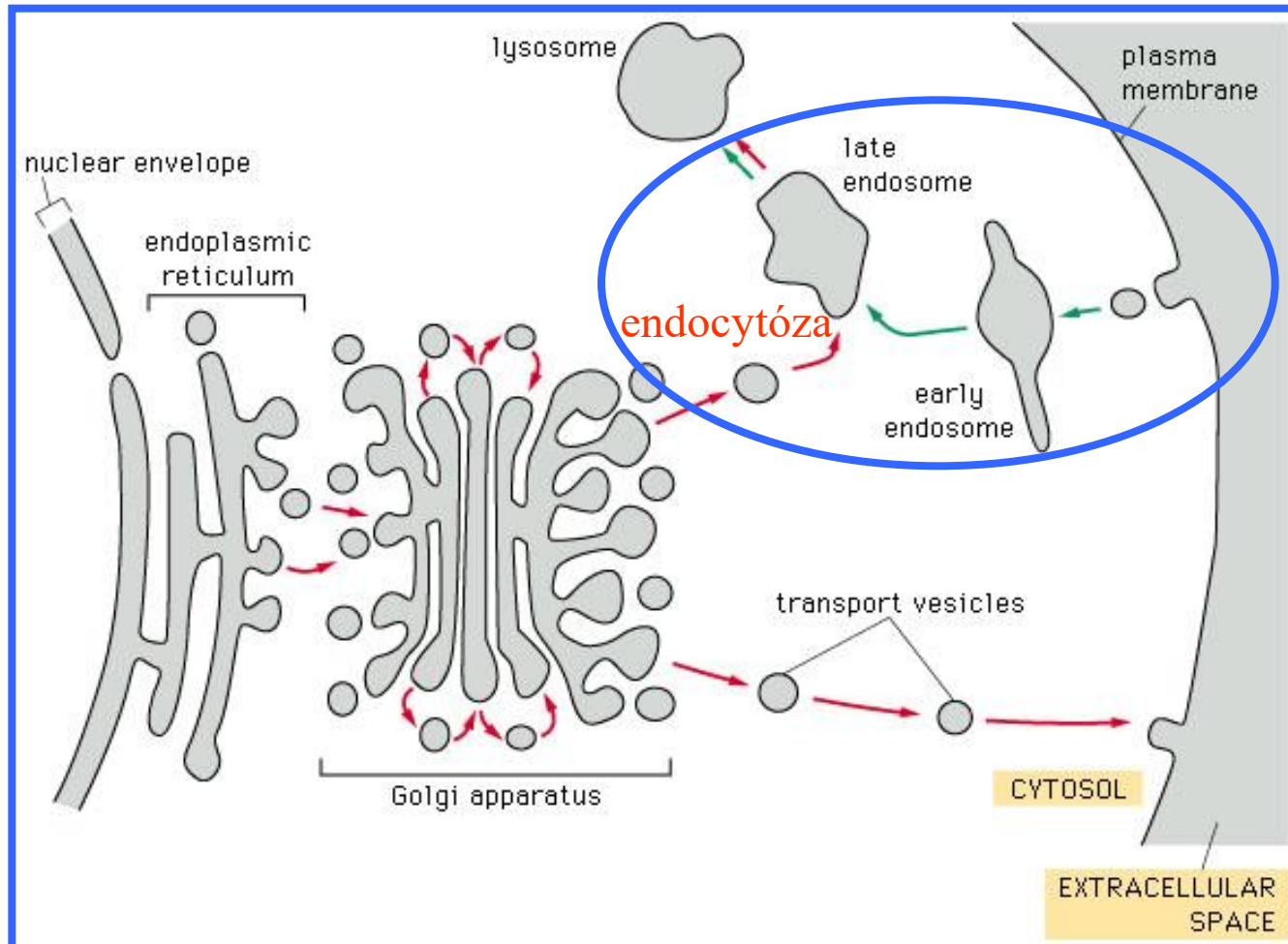
Integrace sekreční dráhy a endocytózy: tok membrán

Proteiny syntetizované na ER jsou transportovány přes GA do sekrečních vesiklů, které splývají s PM nebo lyzosomy/vakuolou. Plocha PM se zvětšuje o povrch sekrečních vesiklů.



Integrace sekreční dráhy a endocytózy: tok membrán

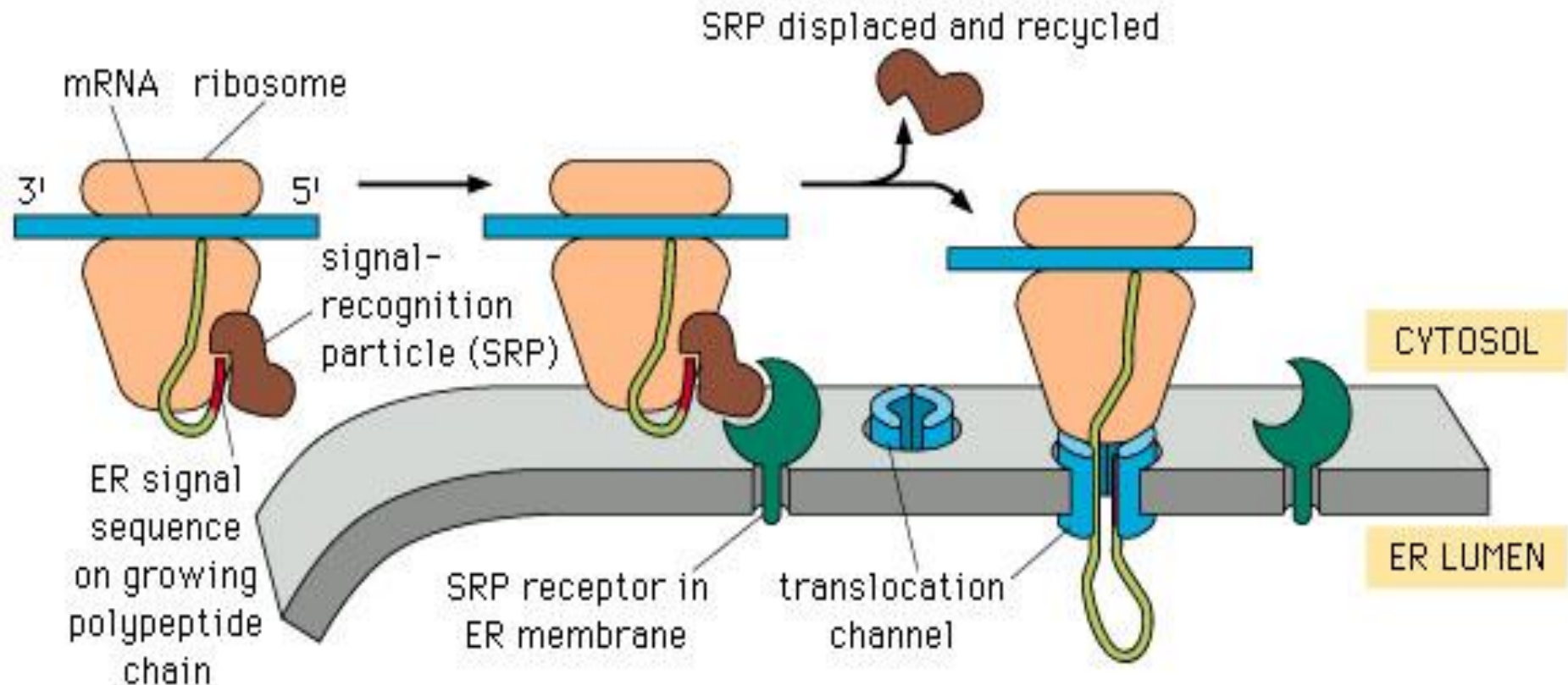
Plasmatická membrána se vchlipuje do cytoplasmy, odštěpuje se endosom a splývá s lyzozomem/vakuolou. Vchlipováním měchýřků se plocha PM zmenšuje.



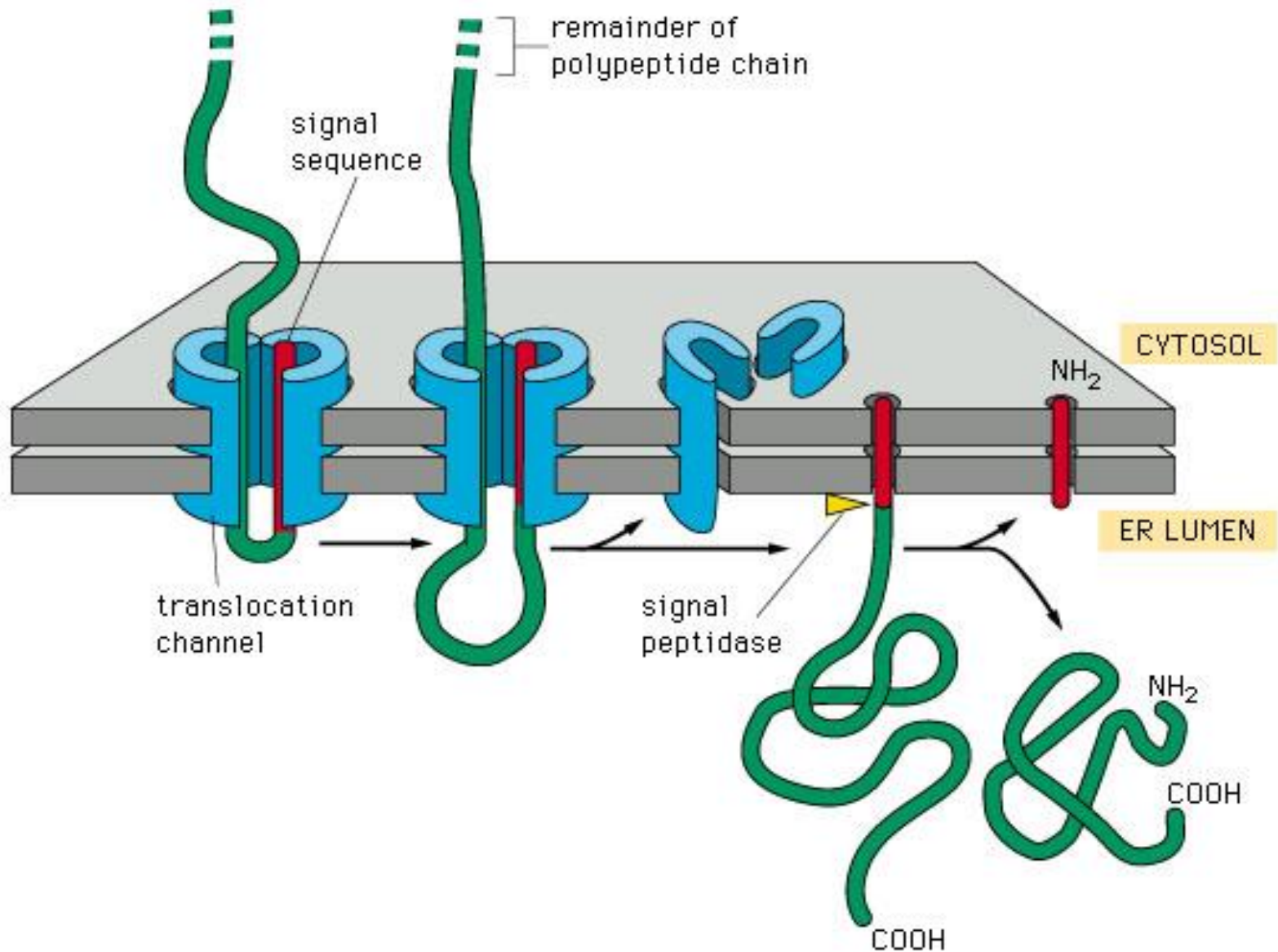
Integrací sekrečních vesikul se povrch PM zvětšuje, odštěpováním endosomů se plocha PM redukuje. Rozměr povrchu buňky se tedy nemění. Membránový materiál tak neustále prochází všemi kompartmenty – tok membrán

Začátek sekreční dráhy: syntéza proteinů na ribosomech, vázaných na povrch membrán endoplasmatického retikula.

Syntéza sekrečního proteinu začíná na cytoplasmatických ribosomech. Po vytvoření ER signální sekvence se na ni naváže SRP částice, komplex se dostane na SRP receptor na povrchu ER, SRP se uvolní a ribosom se přesune na translokační kanál. Syntéza proteinu se obnoví, polypeptid je však nyní translokován do lumina ER.



Translokace proteinu do lumina ER



Proteiny uvnitř ER jsou glykosylovány:

Oligosacharid, obsahující 14 monomerů, se syntetizuje na dolicholu a pak se navazuje na aminoskupinu asparaginu

Glykosylace – monitorování správného foldingu proteinů

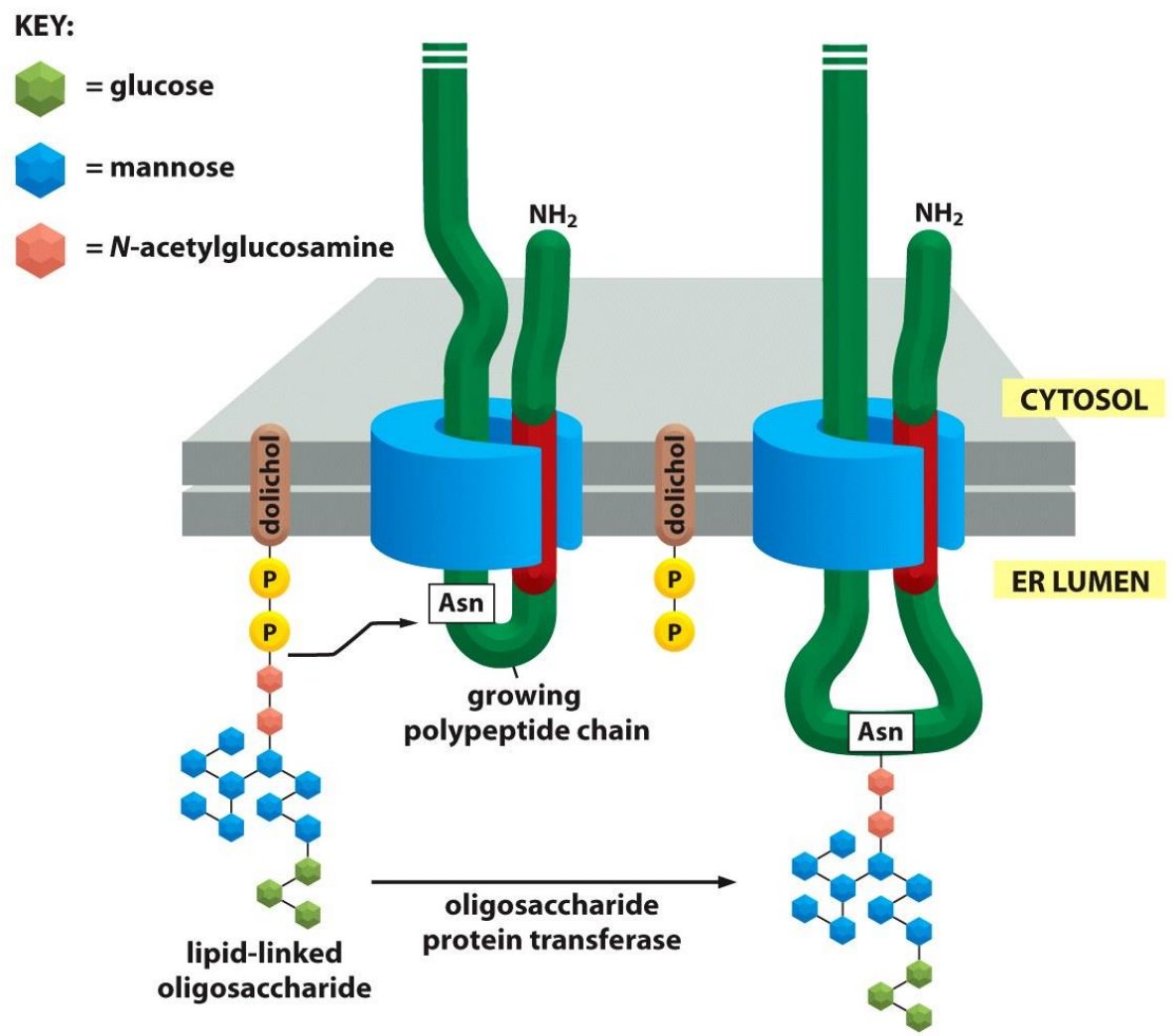
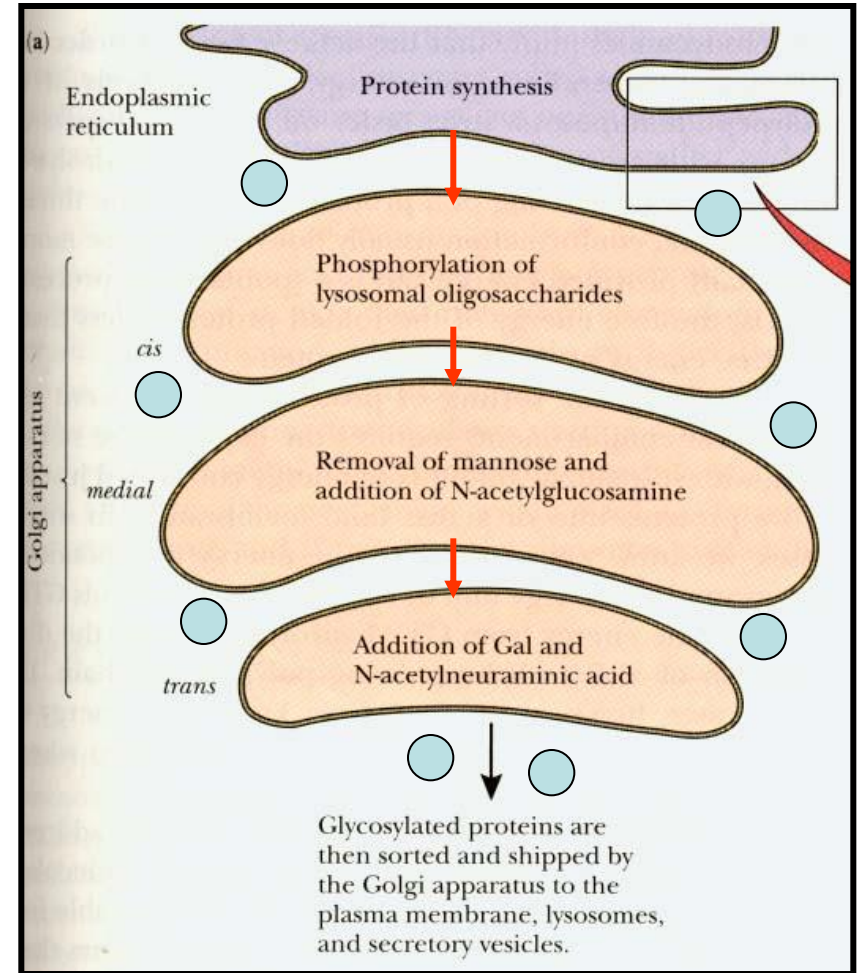


Figure 15-23 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Posttranslační modifikace v Golgiho aparátu

Glykoproteiny, které jsou nyní v cisternách ER se (zabaleny v membránových měchýřcích) dostávají do GA, kde se, opět v měchýřcích, přesouvají z jedné cisterny do další a jejich molekuly jsou chemicky upravovány (přidávání galaktózy, N-acetylglukosaminu).

Z GA pak putují, zabaleny v měchýřcích, do lyzozomů (vakuoly) nebo do plasmatické membrány



Jak je kontrolován postup sekrečního produktu po sekreční dráze?

U kvasinek *S.cerevisiae* byly detekovány geny, jejichž produkty jsou potřebné pro průběh sekrece. Mutací těchto genů je blokována sekreční dráha v místě, kde schází genový produkt.



Randy Schekman

Jak se izolují sec mutanty?

Jestliže syntéza bílkovin pokračuje, ale sekrece je zastavena, vzrůstá specifická hmotnost buněk a v hustotním gradientu jsou těžší. Z frakce těžších buněk se případně izolují **teplotně senzitivní mutanty**: v pokojové teplotě 25°C probíhá sekrece proteinů normálně, avšak při zvýšení kultivační teploty na 37°C je sekrece zastavena na tom místě, kde schází teplotně denaturovaný protein.

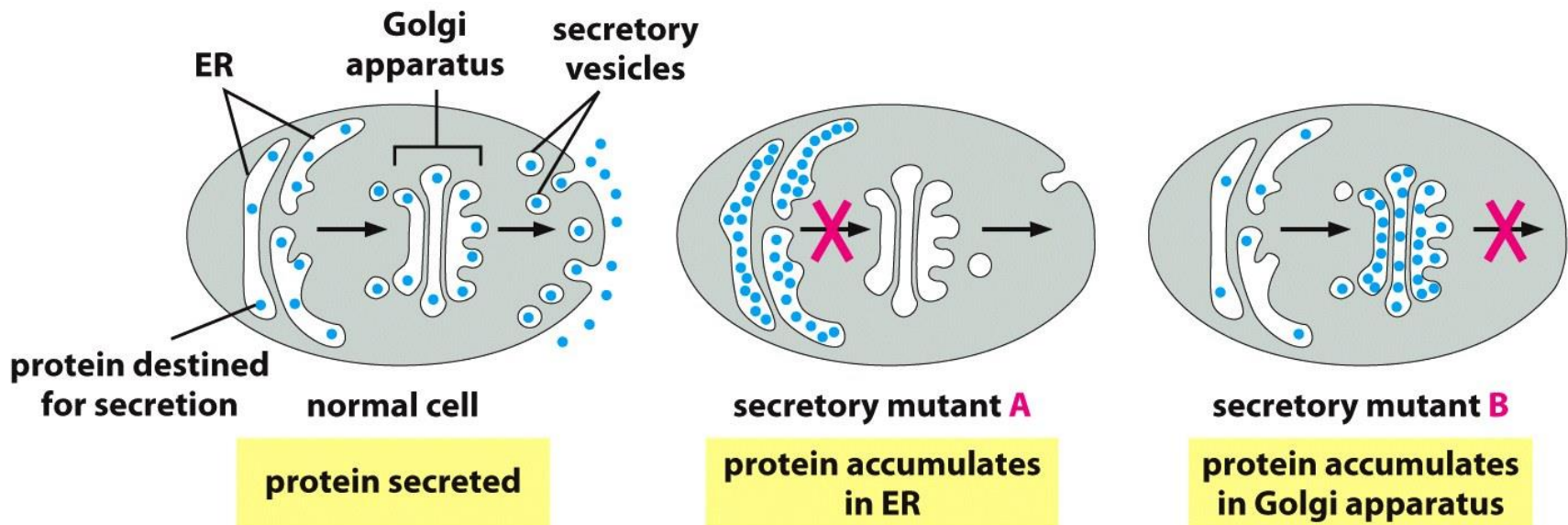
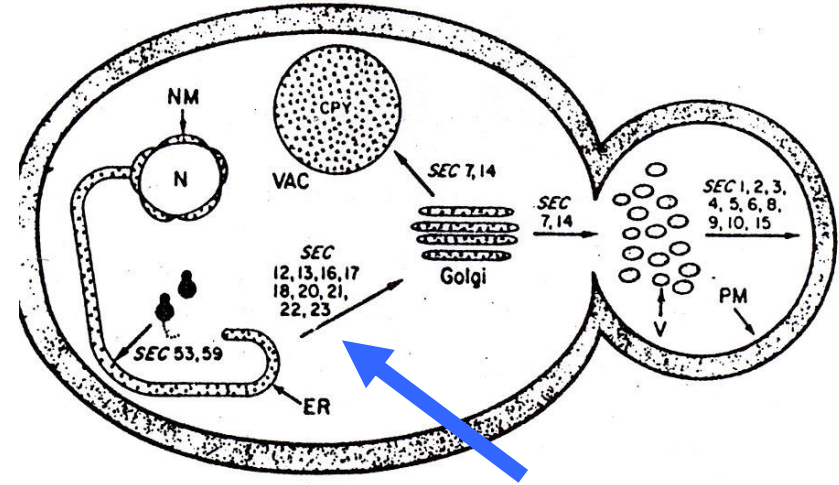


Figure 15-30 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Sekreční mutanta *S. cerevisiae*
sec 18, přenos z 25 °C do 37 °C

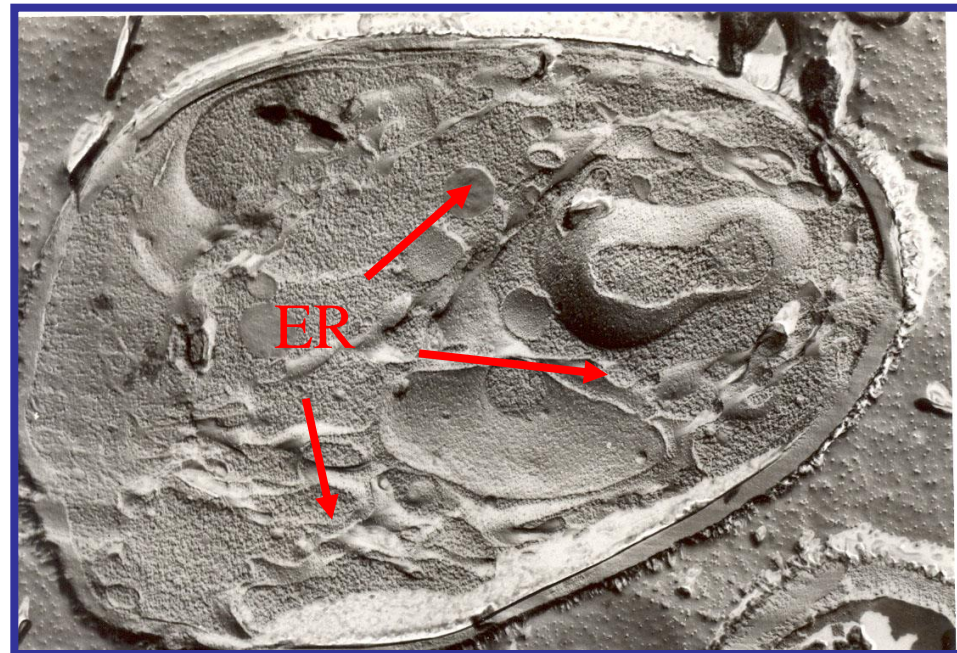


25 °C



Abnormální ER

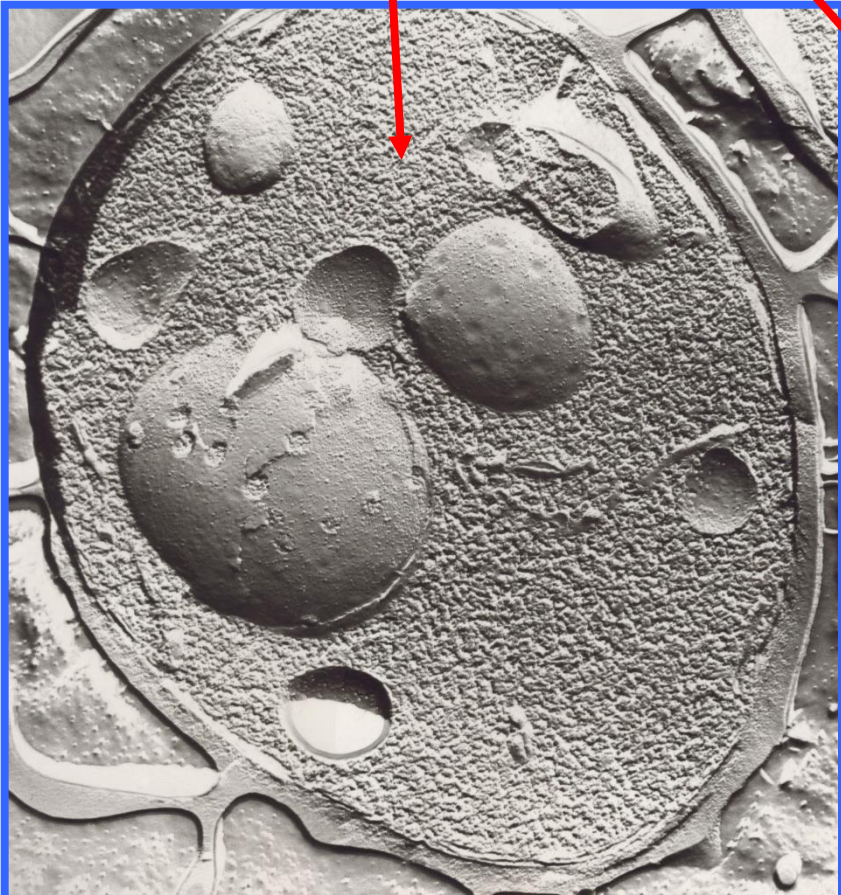
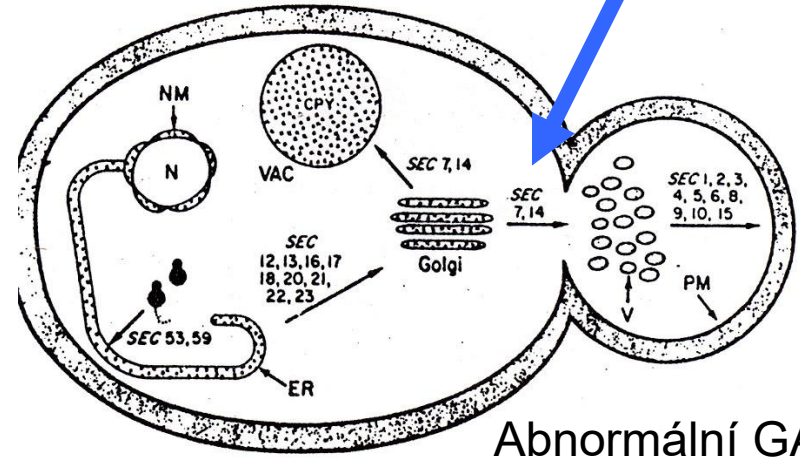
37 °C



Sekreční mutanta *S. cerevisiae*

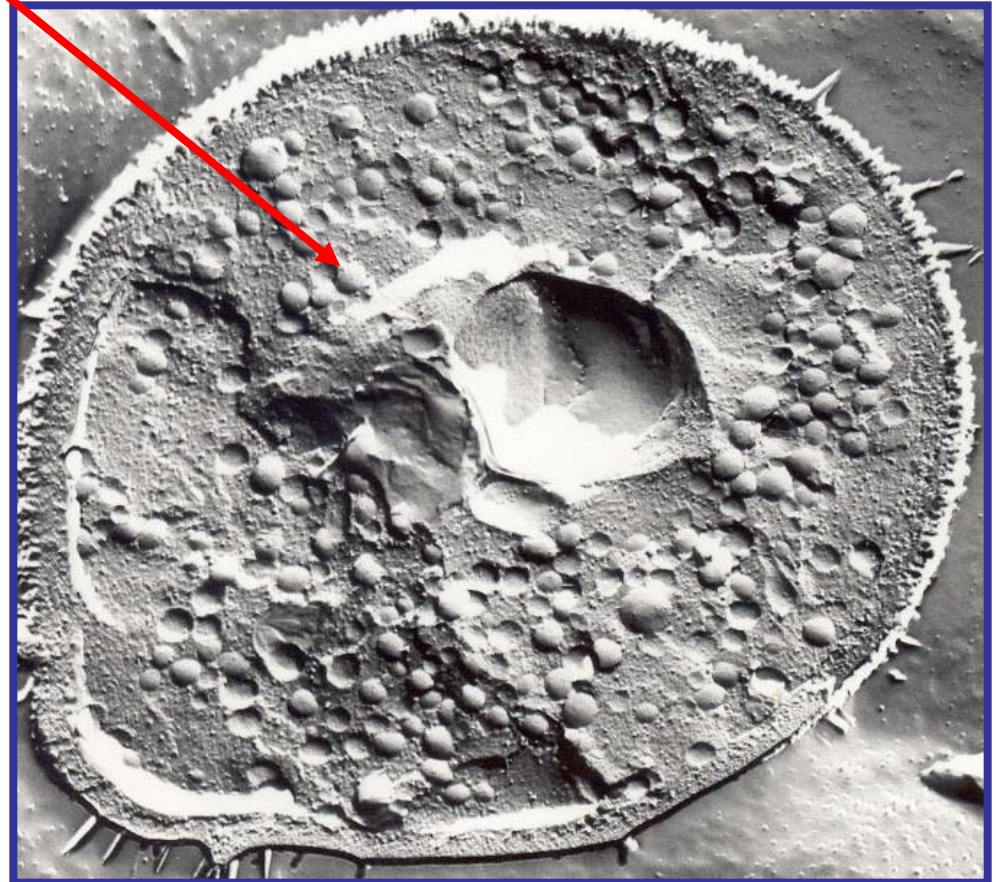
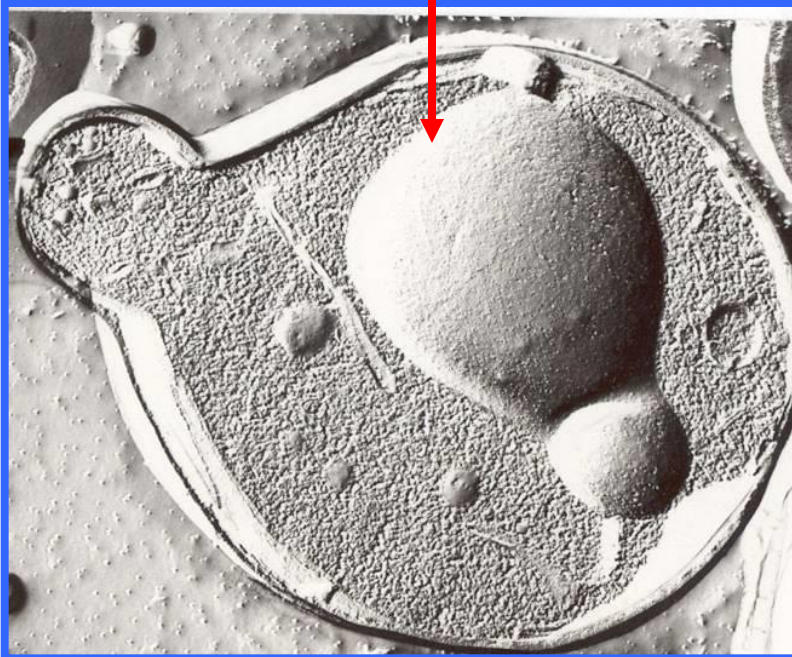
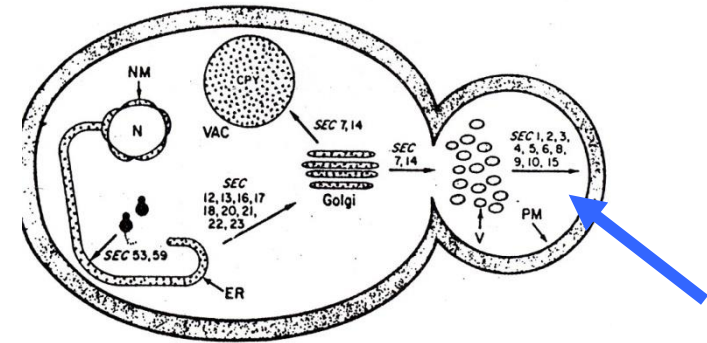
sec 7

Transfer z 25 °C do 37 °C

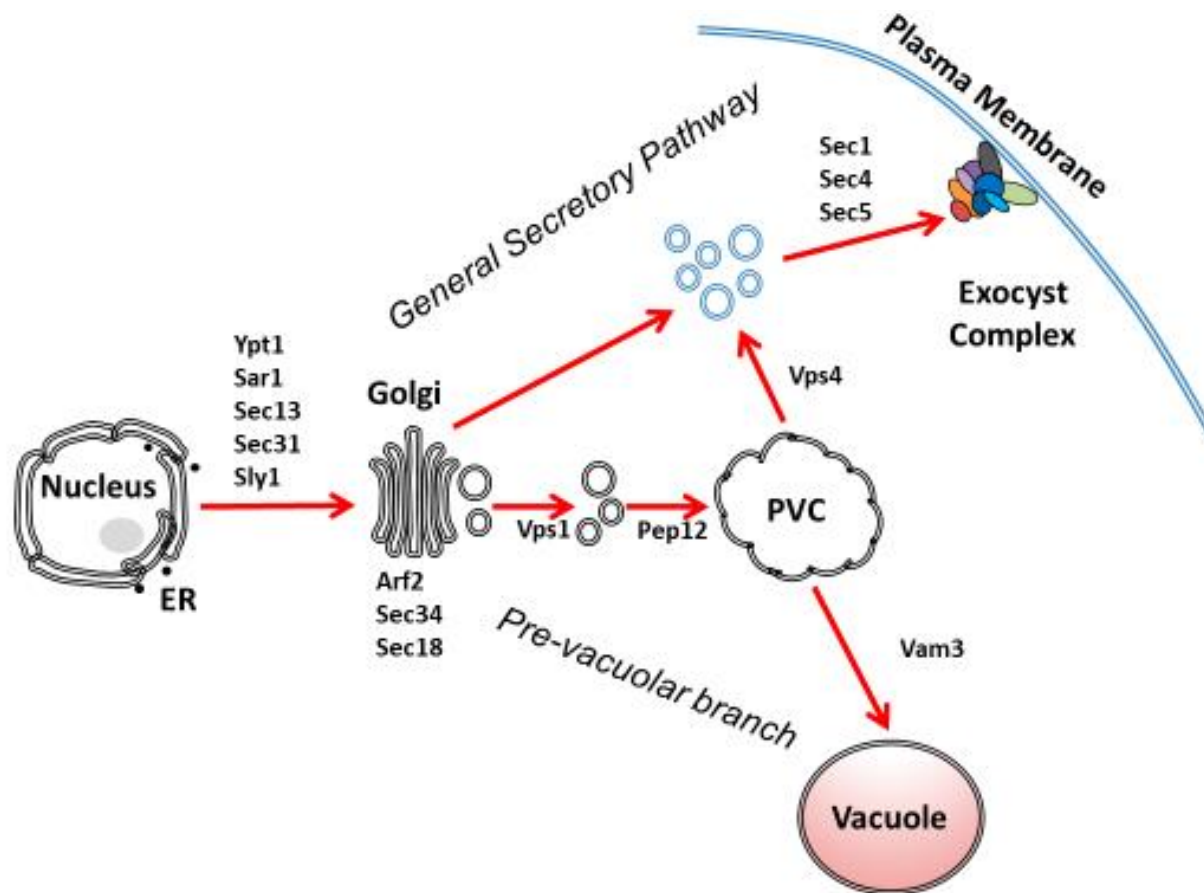


Sekreční mutanty *S. cerevisiae*: sec 1

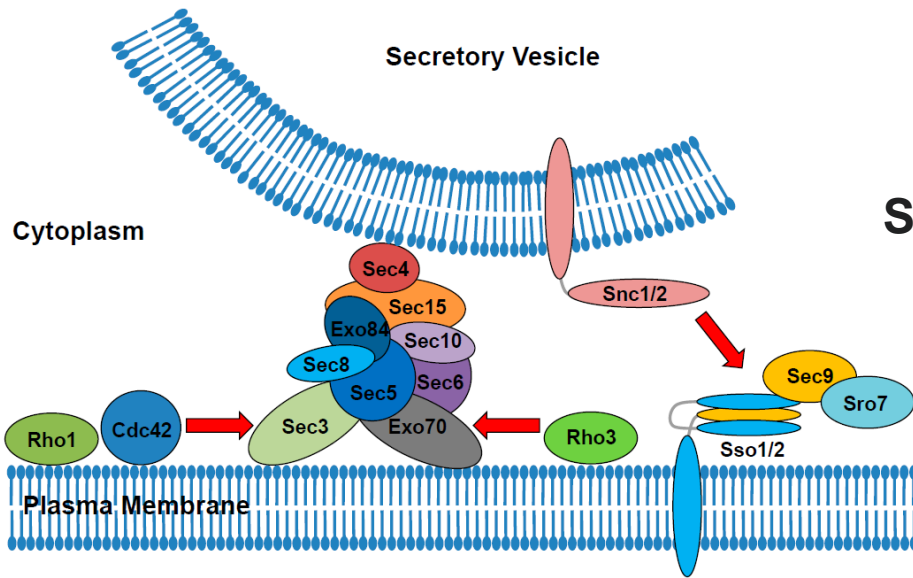
25 °C → 37 °C



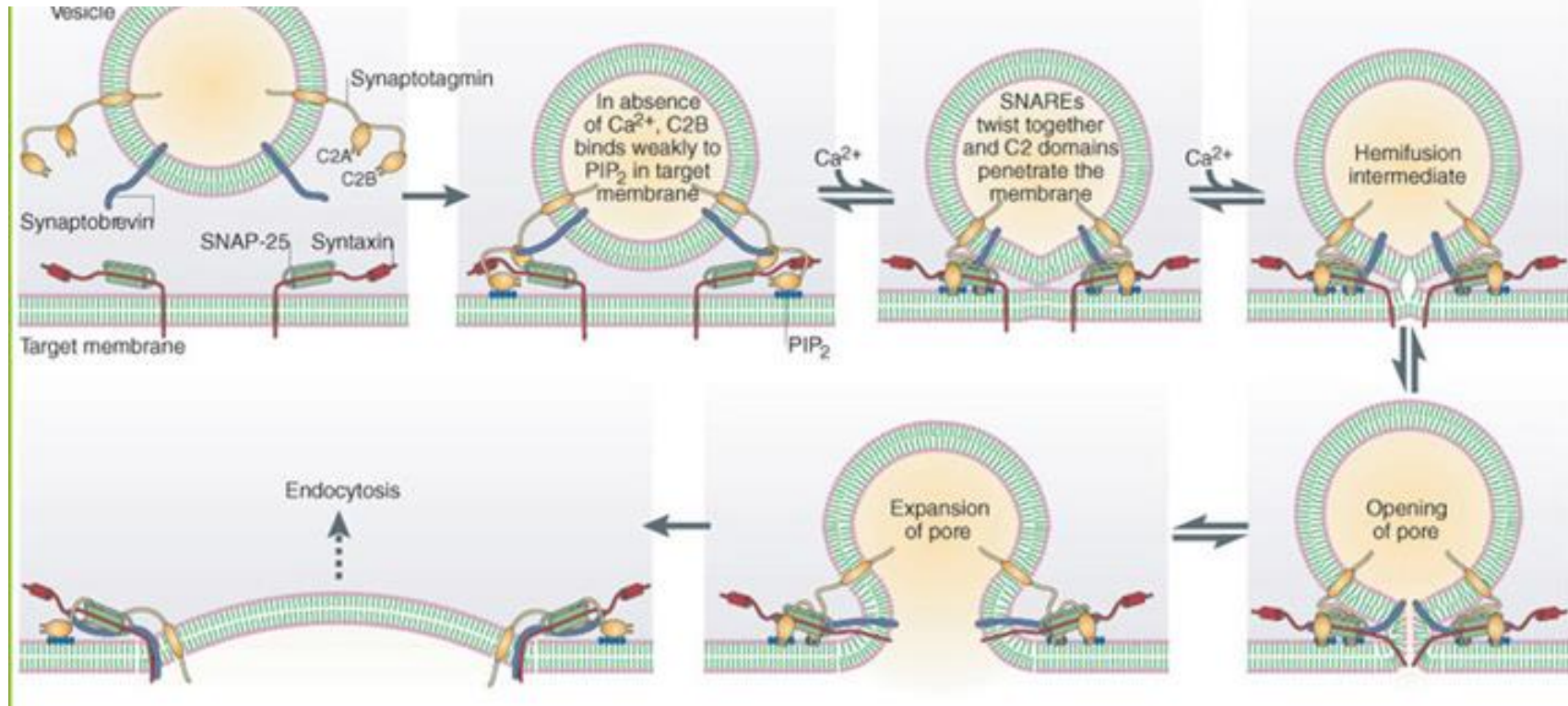
Proteiny, potřebné k exocytóze sekrečního váčku (post-Golgi secretory vesicle), definované na základě genetické analýzy sekrečních mutant kvasinek



Vps1p je dynamin-like GTPasa a Vps4p je AAA-type ATPasa zprostředkující pučení vezikul (*Candida albicans*)

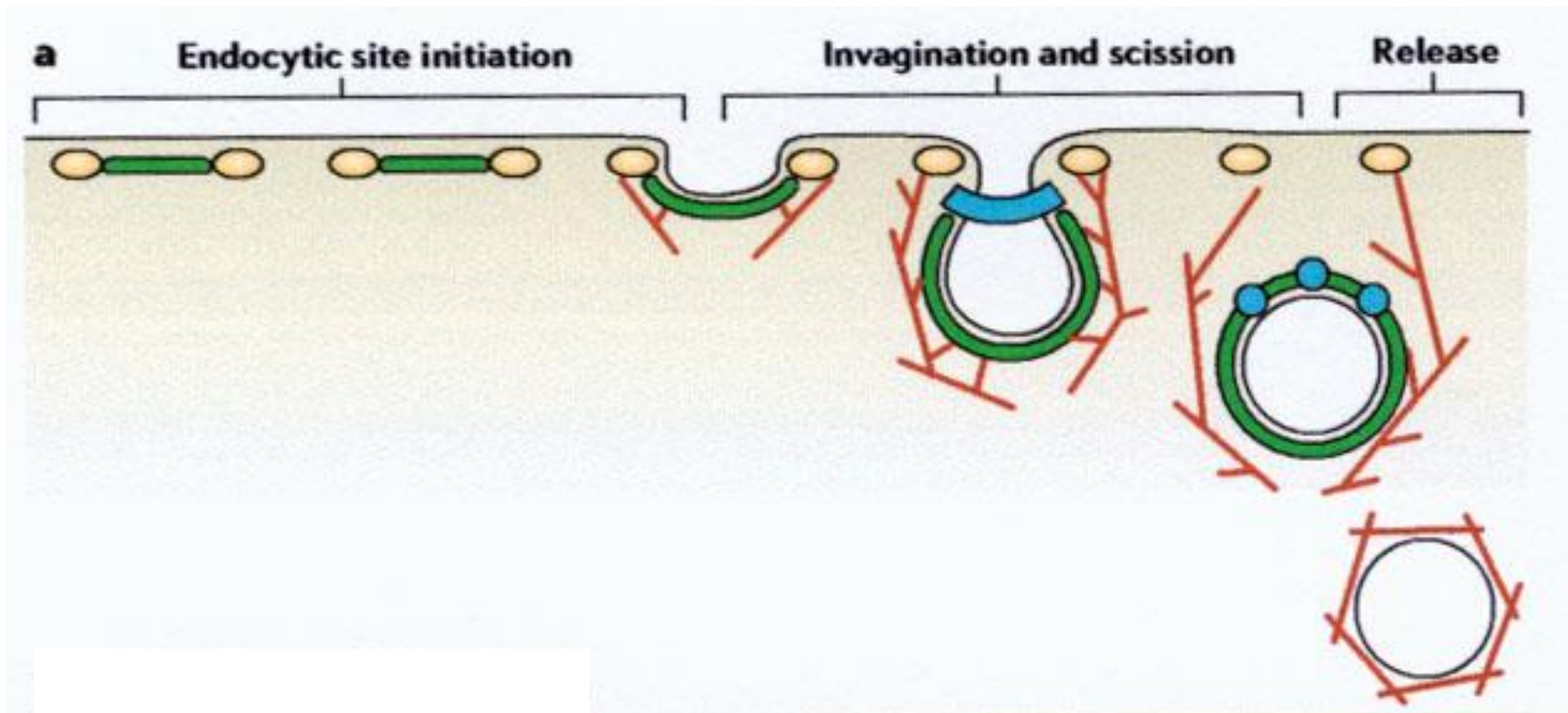


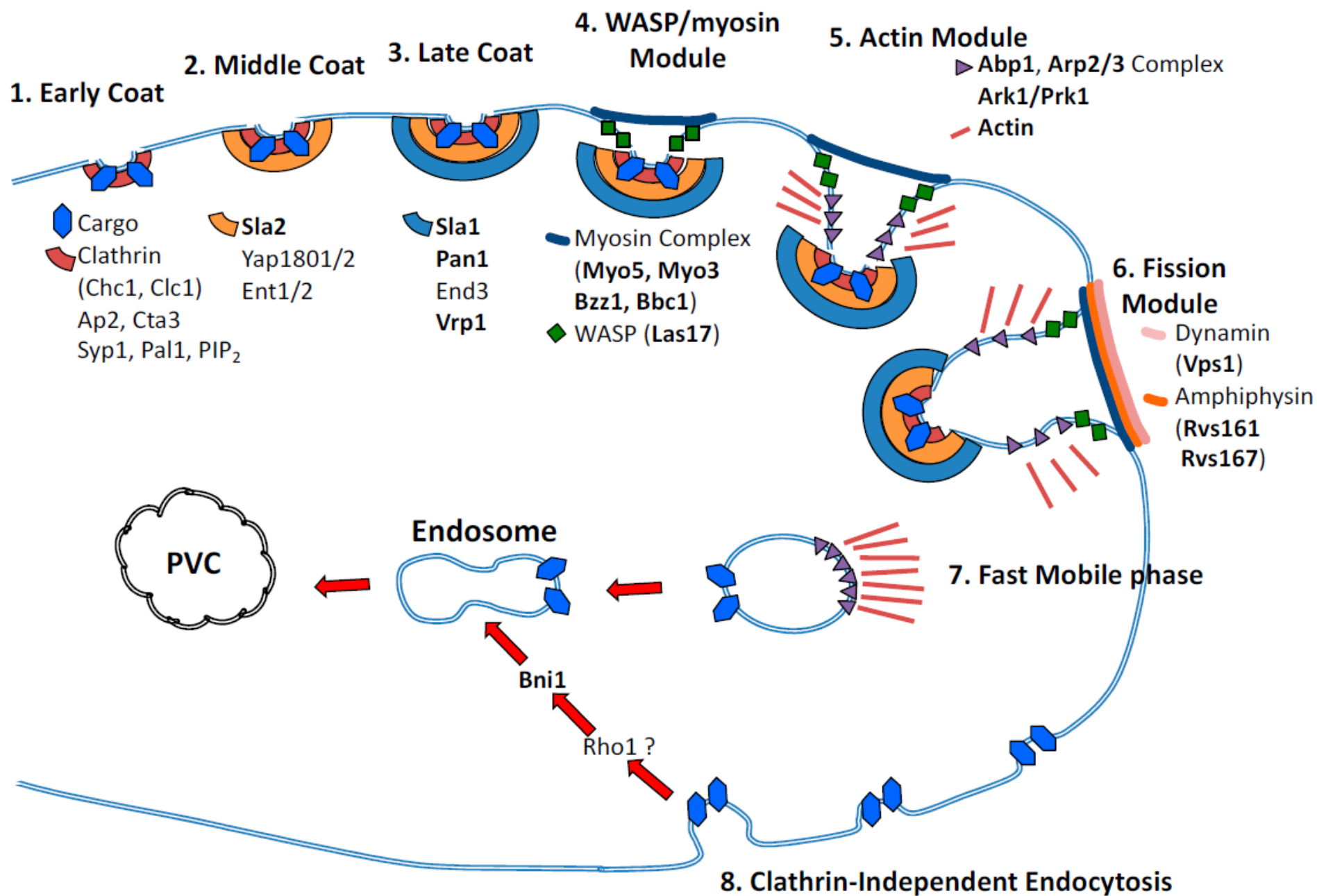
SNARE proteins – "SNAP REceptors



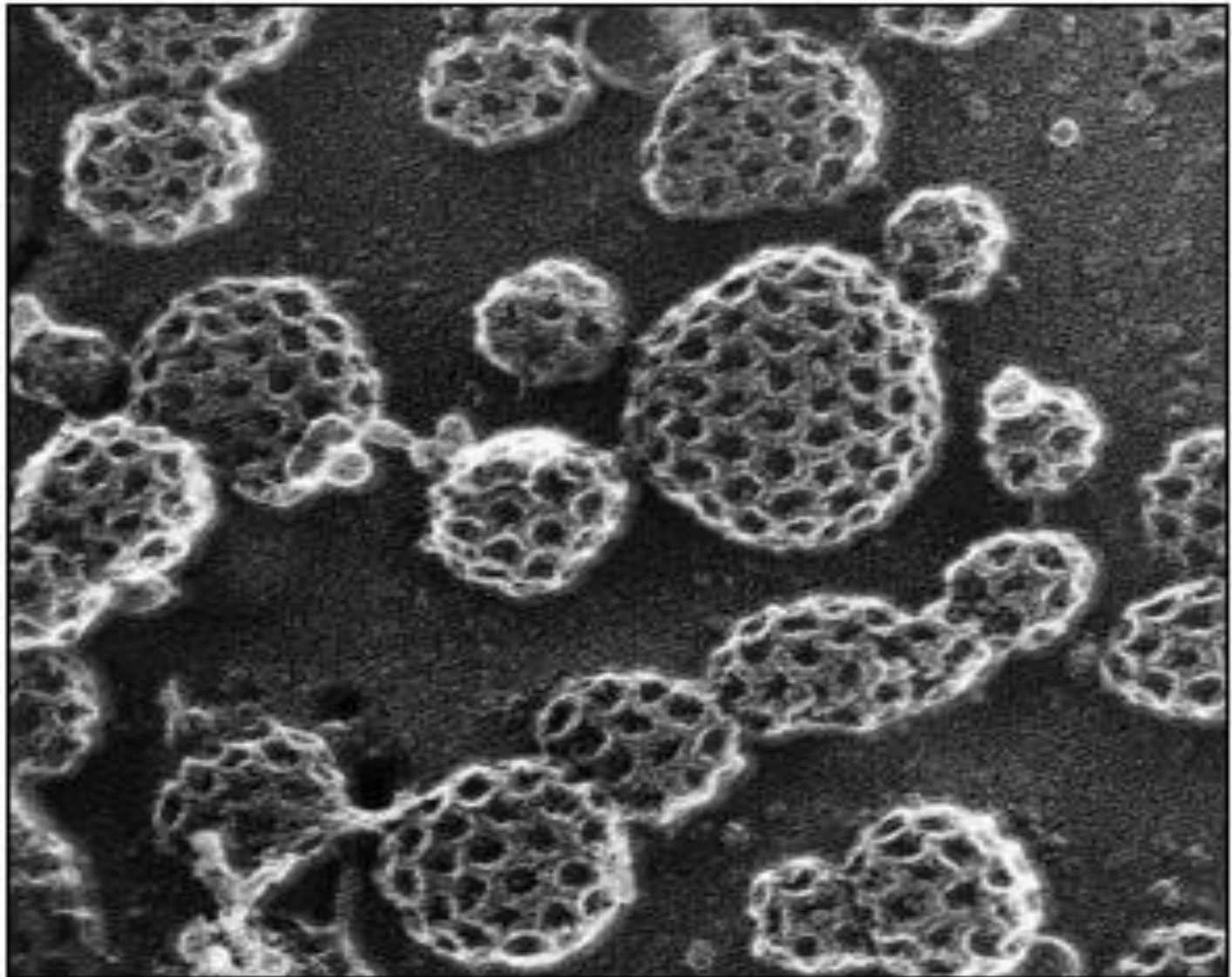
Endocytóza: invaginace plasma-tické membrány, na jejíž receptory jsou navázány makro-molekuly z okolí buňky

Organizace molekul, které řídí místo tvorby receptorové jamky a odštěpení endosomu od plasmatické membrány: molekuly clathrinu vytváří kolem vchlipujícího se měchýřku „klíčku“, na jejím povrchu pak polymerizují vlákna aktinu, který spolu s myozinem pomáhá odštěpení endosomu a jeho pohybu do cytoplasmy





ELM obrázek izolovaných endosomů, pokrytých klatrinovou „klecí“



(B)



0.2 μm