

O podstatě buněčných stěn kvasinek

Prof. MUDr. Marie Kopecká, CSc.

Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity

Kamenice 5, A6, 625 00 Brno

mkopecka@med.muni.cz

<http://www.med.muni.cz/~mkopecka/>

tel. 54949 4778

Buněčná stěna kvasinek

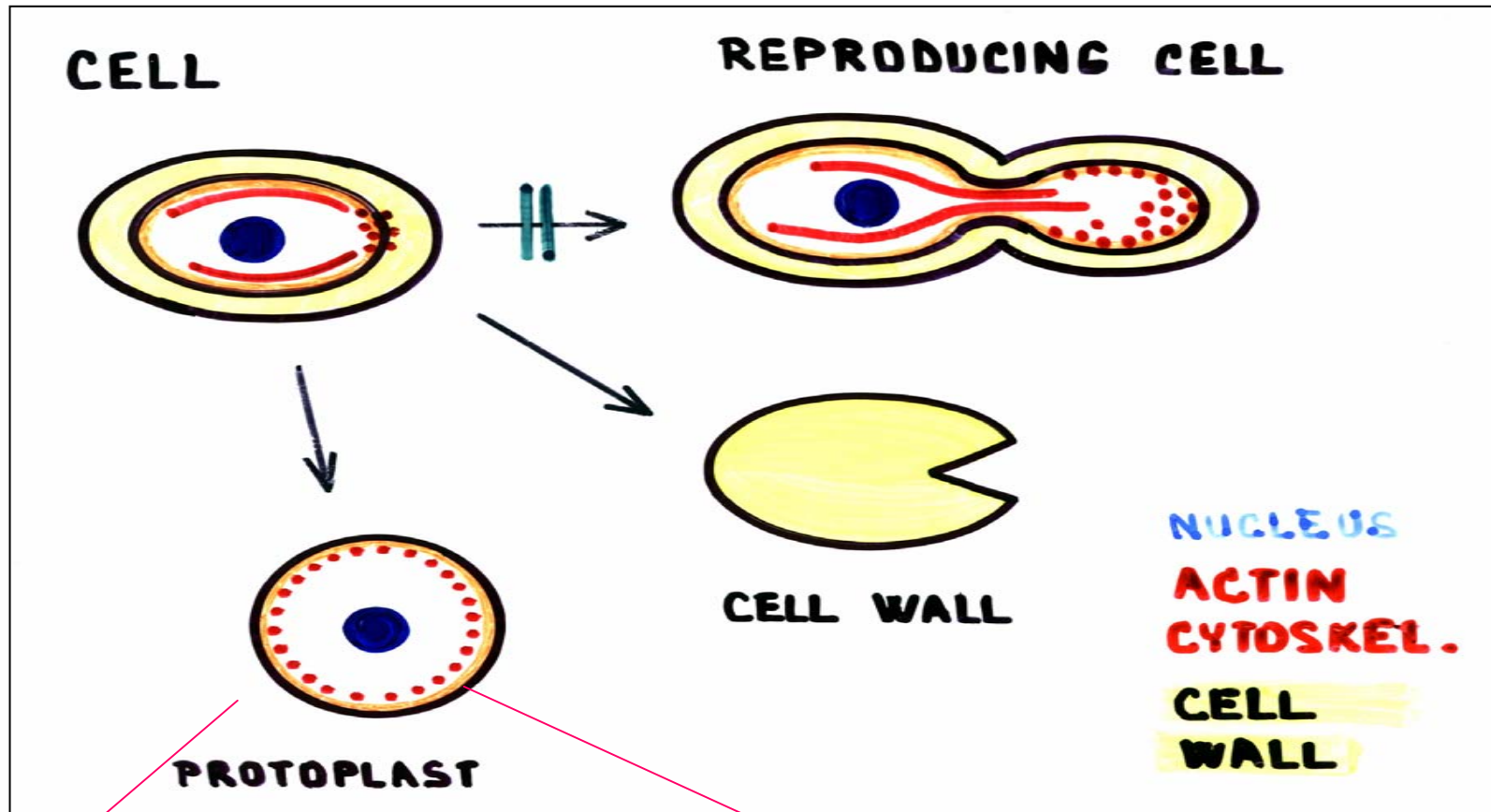
- 1. Chemická podstata?
- 2. Ultrastruktura?
- 3. Funkce?
- 4. Mechanismus vzniku?
- 5. Na jakých modelech zkoumat?
- 6. Jakými metodikami ?

Modely použité ke studiu podstaty a ultrastruktury buněčné stěny kvasinek

- Celé buňky
- Protoplasty
- Isolované buněčné stěny kvasinek
- Purifikované biopolymery buněčné stěny kvasinek in vitro

Saccharomyces cerevisiae :

1. celé buňky
2. nahé protoplasty
3. isolované stěny buněk
4. in vitro assembly



Nečas, 1956, 1961, 1965, 1971...; Gabriel 1965, 1968, 1973, 1984, 1992, 1994; Gabriel et al. 1992, 1998, 2000, 2003, 2006..; Svoboda 1965, 1966, 1974, 1992, 2005; Eddy a Williamson 1957, 1959; Nečas a Svoboda 1981, 1985.

Metodické přístupy ke studiu buněčných stěn kvasinek

- Světelná mikroskopie
(fázový kontrast, diferenciální interferenční kontrast)
- Fluorescenční mikroskopie
- Elektronová mikroskopie transmisní (TEM)
- Elektronová mikroskopie skenovací SEM)
- Rentgenová difrakční analýsa (*zahraniční spolupráce*)
- Purifikované enzymy (*zahraniční spolupráce*)
- Specifické inhibitory
- Mutanty (*získané ze zahraničí*)
- Radioisotopy
- *In vitro* assembly

Ultrastruktura buněčné stěny kvasinkové buňky studovaná transmisní elektronovou mikroskopií

- **1. za použití technik freeze-fracturing**
- **a freeze-substituce**
se jeví buněčná stěna jako bezstrukturní.

- **2. použití techniky ultratenkých řezů**
- **ukázalo jen 2 vrstvy stěny:**
- **– vnější vrstva je elektroaktivní,**
- **- vnitřní vrstva je elektronegativní.**

Závěr: Ultrastruktura buněčné stěny kvasinky zůstává nejasná.

Dalším modelovým objektem studia buněčných stěn kvasinek se staly **protoplasty**

- „**Nahé**“ **protoplasty** (stěna buněk enzymaticky odstraněna) rostou v tekutých médiích.
- Na svém povrchu vytvářejí „fibrilární sítě“.
- Jaká je jejich podstata?
- Jaká je jejich ultrastruktura?
- Jakým mechanismem vznikají?

Chemické složení stěny

Phaff HJ (1963) Cell wall of yeasts.

Ann Rev Microbiol 17: 15-30.

- β -1,3-glukany
- β -1,6-glukan
- mannan
- chitin
- proteiny
- lipidy ?

Struktura stěny kvasinky:

Houwink AL, Kreger DR (1953)

Observations on the cell wall of yeasts. An electromicroscope and X-ray Diffraction study. *Antonie van Leeuwenhoek* 19: 1-24.

Nativní stěna kvasinek

- v ELM amorfní (nefibrilární)
- rtg difrakce: jen difusní difrakční diagramy → chybí krystalický polymer

Stěny po varu 0.5 N HCl 3 hod:

- objevily se mikrofibrily z krystalického glukanu (=hydroglukan)
 - krystalický hydroglukan
 - krystalický chitin
- krystalizace hydroglukanu a chitinu in vitro z uvolněných lineárních řetězců

- 1st ISYP Jena (1965): Kopecká, Čtvrtníček, Nečas: „O podstatě „fibrilárních sítí“, které se tvoří jako první stádium biogenese stěny u protoplastů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*“.
- **PODSTATA FIBRILÁRNÍCH SÍTÍ PROTOPLASTŮ ?**

Vlastnosti sítí:

- **Proteasy** -
- **Lipasy** -
- **Hlemýždí**
enzymy +
- **PAS reakce (*mannan*)** -
- **30% HCl** -
(*chitin*)
- **3% NaOH** +
(*glukan*)

Závěr:

„fibrilární sítě“ protoplastů jsou z alkali-solubilního glukanu

- PODSTATA FIBRILÁRNÍCH SÍTÍ PROTOPLASTŮ dále studována POMOCÍ RENTGENOVÉ DIFRAKČNÍ ANALYSY ve srovnání s HCl-stěnami (tzv. „HCl-stěny“= „HYDROGLUKAN“ byl ukázán na přednášce - (po 3 hod varu stěn kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v 0,5 N HCl se stává rozpustný v alkáliích).
- **Sítě protoplastů po odstranění chitinu dávají vznik diagramu shodnému s lineárním β -1,3-glukanem paramylonem**
- **Závěr: sítě obsahují lineární β -1,3-glukan.**

Publikace o podstatě fibrilárních sítí protoplastů

- Kopecká, M., Čtvrtníček, O., Nečas, O. 1967. Formation and properties of the fibrillar network formed in yeast protoplasts as the first step of biosynthesis of the cell wall. In: "**SYMPOSIUM ON YEAST PROTOPLASTS**". Jena 21.-24.9.1965. R. Müller (ed.). Akademie Verlag Berlin (1967), pp.73-75, 343-344.
- Kreger, D. R., Kopecká, M. 1973. On the nature of the fibrillar nets formed by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* in liquid media. In: "**Yeast, Mould and Plant Protoplasts**". J. R. Villanueva, I. Garcia-Acha, S. Gascon, F. Uruburu (eds.). Academic Press London and New York (1973), pp. 117-130.
- Kreger, D. R., Kopecká, M. 1976.
- Assembly of wall polymers during the regeneration of yeast protoplasts. In: "**Microbial and Plant Protoplasts**". J. F. Peberdy, A. H. Rose, H. J. Rogers, E. C. Cocking (eds.). Academic Press London, New York, San Francisco (1976), pp. 237-252.
- Kreger, D. R., Kopecká, M. 1976. On the nature and formation of the fibrillar nets produced by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* in liquid media: an electronmicroscopic, X-ray diffraction and chemical study. *J. Gen. Microbiol.* 92:207-220.
- Kreger, D.R., Kopecká, M. 1978. Nature of the nets produced by protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe* during the first stage of wall regeneration in liquid media. *J. Gen. Microbiol.* 108: 269-274.
- Kreger, D.R., Kopecká, M. 1981. The molecular organization of chitin in normal and regenerated walls of *Saccharomyces cerevisiae*. A reconsideration of ultrastructural data. In: "**Cell walls 1981**". *Proceedings of the Second Cell Wall Meeting*. Göttingen. D.G. Robinson, H. Quader (eds.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1981), pp. 130-134.

Z čeho jsou vystavěny mikrofibrily – z glukanu nebo chitinu?

Metodický přístup:

- (i) Účinek purifikované chitinasy na sítě protoplastů
- (ii) Účinek purifikované endo- β -1,3 gluknanasy ze *Schizosacch.japonicus* na sítě protoplastů

Výsledky:

Purifikovaná chitinasa nedegraduje mikrofibrily fibrilárních sítí

zatím co purifikovaná β -1,3-glukanasa degraduje mikrofibrily.

Závěr: mikrofibrily protoplastů *S. cerevisiae* jsou z β -1,3-glukanu.

MECHANISMUS VZNIKU MIKROFIBRIL?

2 možné mechanismy vzniku mikrofibril β -1,3-glukanu: -
autoorganisací ?

- „enzyme-directed“ assembly?

Vlhké vzorky(m)

Suché vzorky(d)

A. *In vitro* dialyza

C. *In vitro* neutral. 4°C

B. *In vitro* neutralisace 69°C

D. Nativní síť protopl.

Výsledky studia mechanismu vzniku mikrofibril jsou v publikaci:

Kopecká, M., Kreger, D.R. 1986. Assembly of microfibrils in vivo and in vitro from 1,3- β -D-glucan synthesized by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 143:387-395.

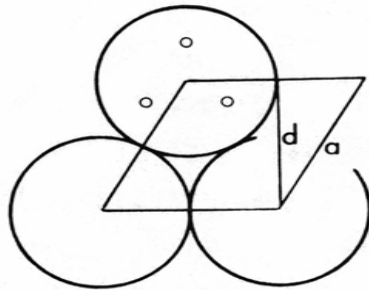
***In vivo* vytvořené mikrofibrily jsou z triple-helixů šířky 15.3 nm, v ELM se jeví jako elementární fibrily šířky 1.6 nm.**

***In vitro* vytvořené mikrofibrily jsou z triple-helixů šířky 17.2 nm, V ELM se jeví jako elementární fibrily šířky 1.7 nm.**

[Kopecká a Kreger (1986) *Arch Microbiol* 143:387-395]

Tabulka XB. (a-Obr.48,50 , a= $2d/\sqrt{3}$)

| Sample | A | C | B | D |
|--------|-------|------|-------|------|
| Moist | 18.25 | 17.9 | 18.45 | 15.8 |
| Dry | 17.2 | 16.5 | 17.0 | 15.3 |



48

Šířky triple-helixů z rtg analysy

in vivo a *in vitro* vzorků mikrofibril

ověřovány v ELM při zvětš. 300 000x



In vivo: triple-helix 15.3 nm, v ELM 1.6 nm
In vitro: triple helix 17.2 nm, v ELM 1.7 nm

Nativní mikrofibrily vznikají mechanismem „enzyme-directed assembly“

- ***In vivo* vytvořené mikrofibrily jsou z triple-helixů šířky 15.3 nm, které se v ELM se jeví jako elementární fibrily šířky 1.6 nm.**

Průkaz elementárních fibril elektronovou mikroskopií je v publikaci:

- Kopecká, M., Gabriel, M. 1992. The influence of Congo red on the cell wall and 1,3- β -D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*.

<http://www.springerlink.com/content/n2n66763n7213404/>

Jsou mikrofibrily také v buněčné stěně kvasinek?

Purifikované enzymy užitě k selektivní degradaci biopolymerů stěny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (poskytnuté H. J. Phaffem)

STAVEBNÍ PRVKY:

GLYKOPROTEINY:

α -MANNOPROTEINY

PURIFIK. ENZYMŮ:

PRONÁSA

ZDROJ:

PLÍSEŇ

POLYSACHARIDY:

β -GLUKAN(Y)

ENDO- β -1,3-GLUKANÁSA

ENDO- β -1,6-GLUKANÁSA

BAKTERIE

BAKTERIE

β -GLUKAN(Y)

EXO- β -1,3-GLUKANÁZA

ENDO- β -1,3-GLUKANÁZA

KVASINKY

KVASINKY

CHITIN

CHITINÁSA

PLÍSEŇ

Účinkem **pronasy** došlo k **částečnému odstranění vnější amorfnní stěnové komponenty** -mannoproteinové vrstvy- pod ní je jemná fibrilární textura, zatmelená amorfnními glukany (viz dále)

Purifikovaná bakteriální **endo- β -1,6-glukanasa a endo- β -1,3-glukanasa** z *Bacillus circulans* **odstraňují ze stěn kvasinky *Sacch.cerevisiae* amorfnní komponentu**, ale mikrofibrilární skelet stěny („exoskelet“) není degradován a dál uchovává původní tvar buňky

Purifikovaná **endo- β -1,3-glukanasa** ze *Schizosaccharomyces japonicus* **degradovala mikrofibrily stěny i amorfnní glukany**, resistantní byly jen jizvy po pučení a agregáty amorfnního mannoproteinu.

[Kopecká, Phaff a Fleet (1974) *J. Cell Biol.* 62, 66-76].

Mikrofibrily jsou i ve stěně celých buněk kvasinkových mutant

1. [Kopecká, Gabriel et al. (1991) *J.Gen. Microbiol.* **137**: 1263-1270;

2. Gabriel a Kopecká (1995), *Microbiology* 141,891-899]

i po účinku Konžské červeni

[Kopecká a Gabriel (1992) *Arch Microbiol.* 158:115-126]

Ultrastruktura buněčných stěn kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* byla také studována po účinku purifikovaných enzymů elektronovou mikroskopií:

- Purifikovaná **endo- β -1,3-glukanasa** z *Bacillus circulans* odstranila amorfní komponentu z buněčné stěny *Schizosaccharomyces pombe* a obnažila mikrofibrily uvnitř stěny, které byly resistantní k účinku enzymu. Podobný účinek měla i **endo- β -1,6-glukanasa**.
- Purifikovaná **endo- β -1,3-glukanasa** kvasinky *Schizosaccharomyces japonicus* odstranila longitudinálně orientované mikrofibrily ze stěn, ale ve stěnách zůstává fibrosní textura s příčnou orientací. Amorfní materiál přetrvával v oblasti jizev.
- Stěny byly ztráveny až kombinovaným účinkem **endo- β -1,3-glukanasy** ze *Schiz. japonicus* + **α -1,3-glukanasy** z *Bacillus circulans*. Nalezeny pouze zbytky neztrávených stěn (jizvy)

[Kopecká, Fleet a Phaff (1995) J. Ultrastruct Res 114:140-152]

- Buněčné stěny kvasinky
- Schizosaccharomyces pombe
- obsahují mikrofibrily
- z beta-1,3-glukanu
- a z alfa-1,3-glukanu

- Jakým mechanismem vzniká
- buněčná stěna kvasinek?

- Zkoumání mechanismu autoorganise stěnových polymerů in vitro

***In vitro* assembly purifikovaných stěnových polymerů:**

β -1,3-glukanové mikrofibrily vznikají mechanismem self-assembly *in vitro* z purifikovaného β -1,3-glukanu sítě protoplastů

Purifikovaný mannan a purifikovaný β -1,6-glukan mají amorfní charakter.

Purifikovaný β -1,3-glukan sítě protoplastů + mannan + β -1,6-glukan stěn mohou vytvářet nadmolekulární komplexy *in vitro*.

Purifik. β -1,3 glukan sítě protopl. + mannan + β -1,6-glukan stěn + β -1,3 glukan stěn kvasinek mohou vytvářet nadmolekulární komplexy *in vitro*.

Purifik. β -1,3 glukan sítě protopl. + mannan + β -1,6-glukan stěn + β -1,3 glukan stěn kvasinek A2 + glykogen mohou vytvářet nadmolekulární komplexy *in vitro*.

Závěr: Při vzniku buněčné stěny kvasinek se může uplatňovat autoorganisace stěnových polymerů do nadmolekulárních struktur

Závěry ad protoplasty *Saccharomyces cerevisiae*

- 1• Sítě syntetizované protoplasty *Saccharomyces cerevisiae* v tekutých médiích jsou z nerozpustných polysacharidů β -1,3-glukanu a chitinu (90% glukanu a 10% chitinu); mikrofibrily sítě jsou z β -1,3-glukanu.**
- 2• Protoplasty *Saccharomyces cerevisiae* syntetizují v tekutých médiích lineární řetězce β -1,3-glukanu.
 β -1,3 glukan „větvicí“ enzym, který „přiháčkovává“ ve stěně kvasinek k lineárním řetězcům boční větve, zřejmě u rostoucích protoplastů v tekutém mediu chybí (byl tekutým médiem z protoplastů odstraněn).**
- 3• Sítě protoplastů nejsou zatmeleny, protože polymery amorfni matrix jsou rozpustné ve vodě.**
- 4• Rozdíly v šířce triple-helixů zjištěné rtg difrakcí a ELM svědčí pro to, že nativní mikrofibrily *in vivo* nevznikají self-assembly, ale „enzyme-directed assembly“.**
- 5• Základní stavební jednotkou nativních mikrofibril sítí protoplastů je elementární fibrila šířky 1.6 nm; její podstatou je triple-helix šířky 1.53 nm (d) a 1.58 nm (m).**

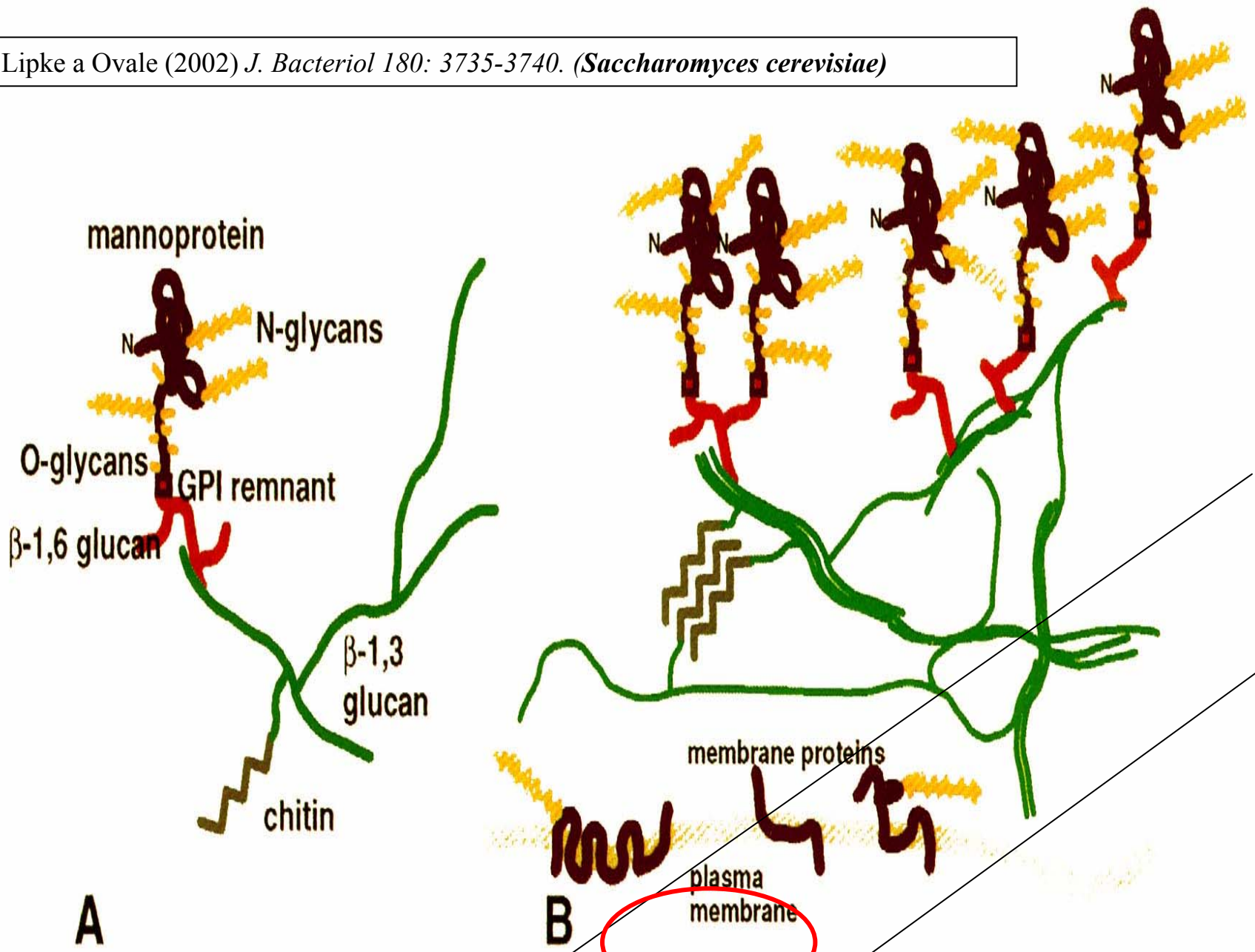
Závěry ad stěna *Saccharomyces cerevisiae*:

- 1• V nativní buněčné stěně kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou mikrofibrily β -1,3-glukanu, které tvoří „exoskeleton“ stěny.
- 2• Tyto mikrofibrily jsou ve stěně zatmeleny amorfními glukany s β -1,3- a β -1,6 vazbami, na které se váží vnější mannoproteiny stěny.
- 3• Při vzniku stěny kvasinek se může uplatňovat autoorganisace biopolymerů stěny.

Závěry ad protoplasty a stěna *Schizosaccharomyces pombe*

- 1• Mikrofibrily sítí protoplastů *Schizosaccharom. pombe* obsahují β -1,3-glukan a α -1,3-glukan. V sítích po reagregaci *in vitro* jsou 2 typy mikrofibril.
- 2• Stěna kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* obsahuje mikrofibrilární kostru (exoskelet), která je z β -1,3-glukanových a z α -1,3-glukanových mikrofibril. Fibrilární skelet je maskován amorfními glukany s β -1,3- a β -1,6-vazbami.

Lipke a Ovale (2002) *J. Bacteriol* 180: 3735-3740. (*Saccharomyces cerevisiae*)



Souhrn přednášky

I. STRUKTURA BUNĚČNÉ STĚNY KVASINEK

- 1. Buněčná stěna kvasinek je lokalizovaná na povrchu buněk.
- 2. Je vystavěna z biopolymerů: z polysacharidů a z glykoproteinů.
- 3. Biopolymery zahrnují β -1,3-glukany, β -1,6-glukan, mannoproteiny a chitin.
- 4. Chitin je akumulován v jizvách po pučení, ale část molekul chitinu je také dispergována v laterální stěně, kde asociuje s dalšími biopolymery.
- 5. β -1,3-glukan asociuje do mikrofibril. Mikrofibrily tvoří rigidní skelet buněčné stěny. Ostatní biopolymery tvoří amorfní matrix, která zatmeluje mikrofibrilární glukanovou komponentu.

II. PROTOPLASTY KVASINEK JAKO MODELY KE STUDIU BIOGENESE NOVÉ BUNĚČNÉ STĚNY

1. Protoplasty *Saccharomyces cerevisiae* vytvářejí v tekutém živném médiu tzv. „fibrilární síť“. Jsou vystavěny z mikrofibril β -1,3-glukanu (90%) a obsahují také chitin (10%).
2. „Fibrilární síť protoplastů „obsahují lineární β -1,3-glukan, rozpustný v NaOH, jehož rentgenový difrakční diagram odpovídá lineárnímu polysacharidu paramylonu (zásobní polymer Euglenophyt).
3. „Fibrilární síť protoplastů „obsahují také rozvětvený β -1,3-glukan, jehož rentgenový difrakční diagram odpovídá rozvětvenému glukanu buněčných stěn kvasinek, který je v komplexu s chitinem, a tento komplex je nerozpustný v alkáliích.
4. Protoplasty kvasinek, které vytvoří v tekutém médiu jen „fibrilární síť“, nejsou schopné se dělit, a přežívají asi 24 hod.
5. Protoplasty kvasinek jsou však schopné sporulovat. Spory jsou životaschopné a schopné přežít a dát vznik vegetativním buňkám.

III. FUNKCE BUNĚČNÉ STĚNY KVASINEK

- 1. Buněčná stěna kvasinek je lokalizovaná na povrchu buněk, a proto poskytuje kvasinkové buňce mechanickou ochranu.
- 2. Buněčná stěna kvasinek je nezbytná pro vývoj geneticky podmíněného tvaru buňky (cylindrického, ovoidního atp.).
- 3. Buňky, které jsou zbaveny buněčné stěny, zaujmají tvar koule („protoplasty“).
- 4. Buňky zbavené buněčné stěny („protoplasty“) nejsou schopné se dělit – nemohou realizovat cytokinesi, ale jaderné dělení (mitosa) probíhat může; tak může vzniknout vícejaderný kvasinkový útvar, který však není schopen bez buněčné stěny přežít ani se dělit, a časem umírá.
- 5. Buněčná stěna je nutná ke konjugaci kvasinek.
- 6. Buněčná stěna obsahuje enzymy a antigeny.

IV. BIOGENESE BUNĚČNÉ STĚNY KVASINEK

- 1. β -1,3-glukan po rozpuštění může asociovat do nadmolekulárních komplexů in vitro na principu autoorganisace.
- 2. β -1,3-glukan asociuje in vitro autoorganisací do mikrofibril.
- 3. Biopolymery stěny mohou asociovat do nadmolekulárních komplexů na principu autoorganisace molekul in vitro bez účasti enzymů, bez dodání energie, bez přítomnosti templátových struktur.
- 4. Tyto nadmolekulární komplexy stěnových biopolymerů vzniklé in vitro na principu autoorganisace molekul obsahují mikrofibrily i amorfní matrix a připomínají texturu buněčné stěny.

Děkuji za pozornost.

Seznam publikací, týkajících se výzkumu buněčné stěny kvasinek v období 1965 – 2011

lze nalézt na adrese:

<http://www.med.muni.cz/~mkopecka/>