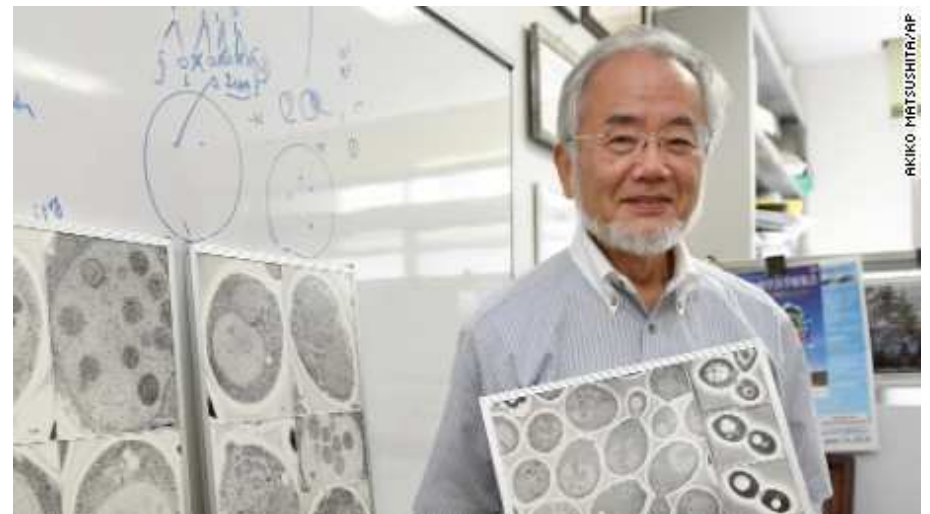


Osnova přednášky

- Taxonomie kvasinek
- Základní charakteristiky kvasinek
- Podmínky růstu
- Morfologie buněk a kolonií
- Komunikace (killer toxiny, priony ...)



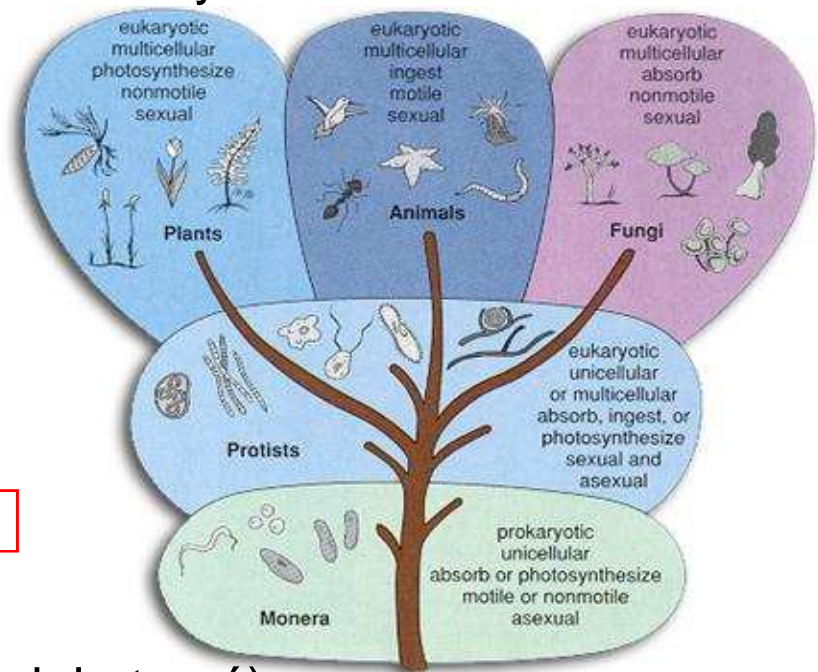
Bakterie x kvasinka

	Bakterie	Kvasinka
Četnost v lidské mikrofloře	99%	<1%
Velikost buňky	1um	10um
Buněčná stěna	peptidoglykan, LPS, LTA	chitin, mannan PPM, PLM, glukan
pH	6,5-7,5	4,5-6,5
Teplota	10-80	20-30
Rezistence na antibiotika	Ne	Ano
Přenos genetického materiálu	Ano	Ne
Jádro	Ne	Ano

LPS – lipopolysacharid, LTA – lipoteichoová kyselina,
PPM – fosfopeptidomannan, PLM - fosfolipomannan

Taxonomie kvasinek

- Kvasinky se řadí do říše hub (ačkoliv jsou to mikroskopické jednobuněčné organizmy), superskupiny Opisthokonta, domény (nadříše) Eukaryota. Netvoří však žádnou přirozenou taxonomickou skupinu, a proto je nemožné je jednotně definovat. Jako takové jsou roztroušeny ve dvou odděleních hub, buď jako houby vřeckovýtrusné nebo stopkovýtrusné (asko-, basidio- a deuteromycetes + kvasinkové mikroorganismy)



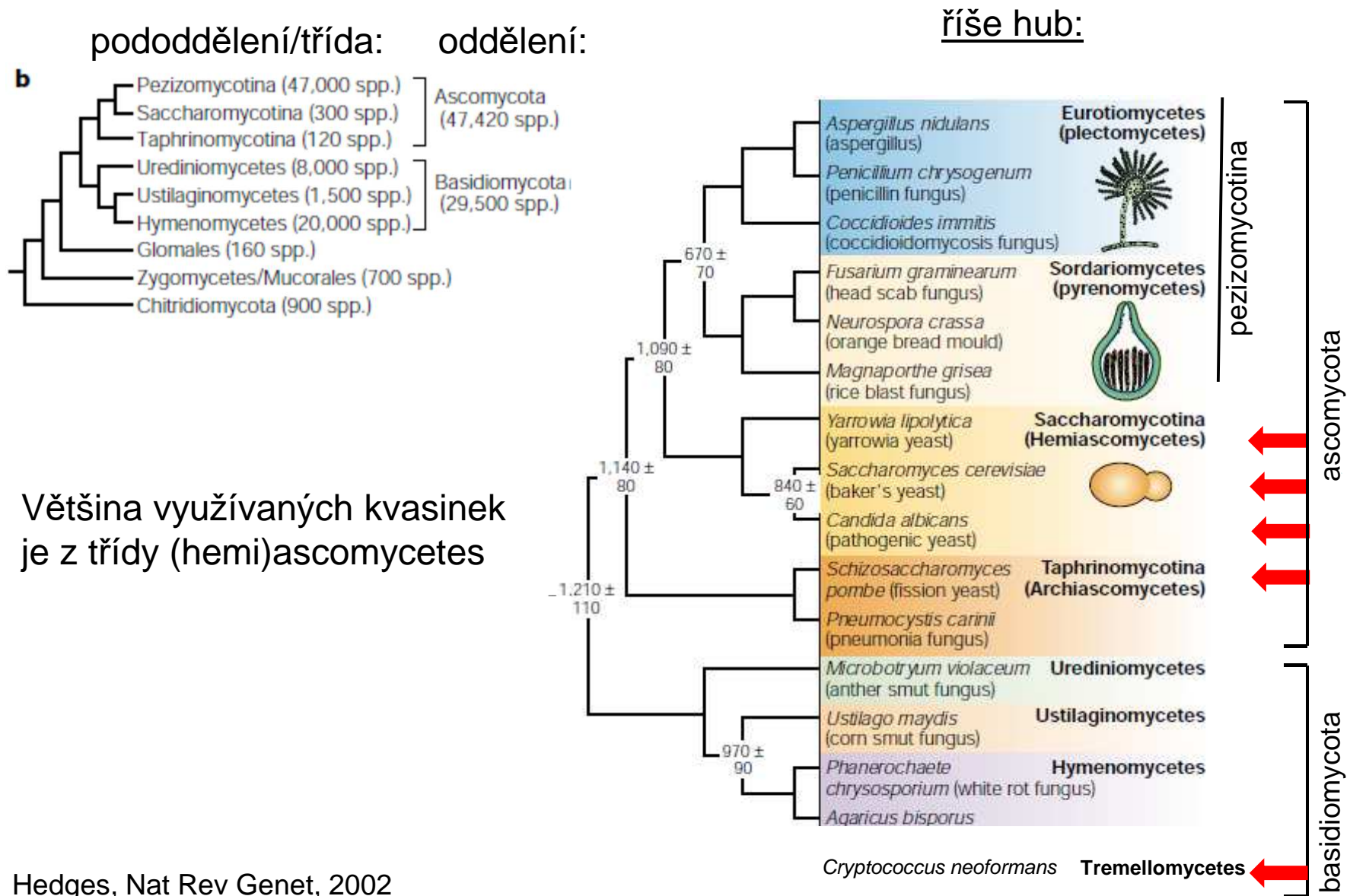
Saccharomyces cerevisiae:

- nadříše › Eukaryota
- říše › Fungi (houby)
- oddělení** › Ascomycota (vřeckovýtrusé)
- pododdělení › Ascomycotina
- třída › (hemi) Ascomycetes
- řád › Saccharomycetales (kvasinkotvaré)
- čeleď › Saccharomycetaceae
- rod › Saccharomyces
- druh › Saccharomyces cerevisiae

wikipedie

Hedges, Nat Rev Genet, 2002

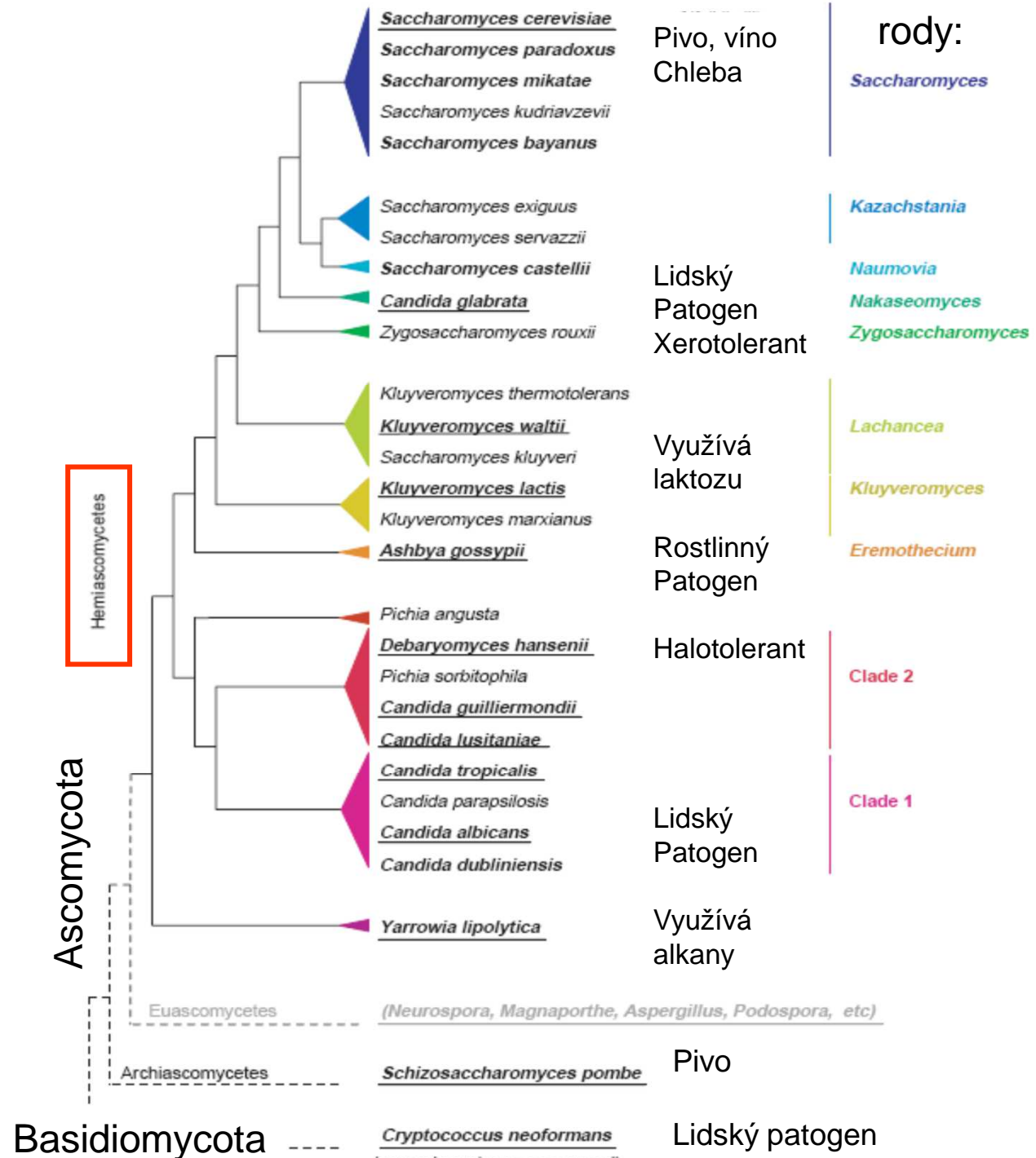
Kvasinky netvoří žádnou přirozenou taxonomickou skupinu - jsou roztroušeny ve dvou odděleních hub, buď jako houby vřeckovýtrusné nebo stopkovýtrusné



Taxonomie kvasinek

Většina využívaných kvasinek je z třídy (hemi)ascomycetes

mezidruhová vzdálenost

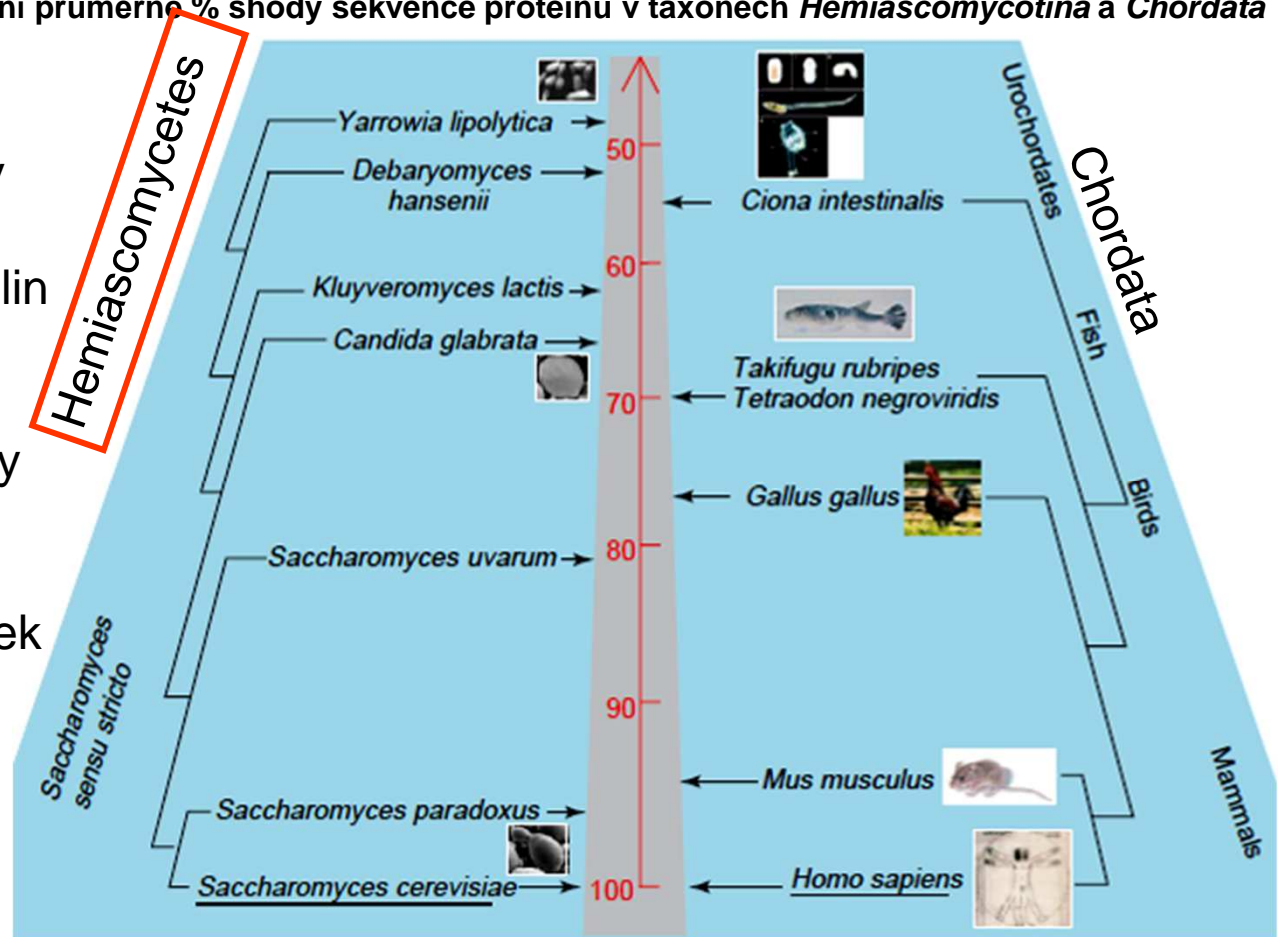


TRENDS in Genetics 22 (2006)

Srovnání průměrné % shody sekvence proteinů v taxonech *Hemiascomycotina* a *Chordata*

Vychází převážně z analýzy rDNA; nověji srovnáním rozdílů sekvencí aminokyselin v ortologních proteinech. Přes velkou morfologickou podobnost vykazují kvasinky velké rozdíly v genomu.

Genomy (sekvence) kvasinek ze vzdálenějších větví fylogenetického stromu se srovnávají těžko



% odlišnost sekvence proteinů:

- *S. cerevisiae* a *C. glabrata* ~ člověk a ryba
 - mezi druhy *S. sensu stricto* ~ mezi řády savců
 - Proteiny člověka a hlodavců jsou si více podobné (Ize rekonstruovat změny, jimiž genomy během evoluce od společného předka prošly) než proteiny druhů ze skupiny *sensu stricto*, mezi nimiž mohou vznikat životaschopné hybridy!
- rozdíl mezi *S.c.* a *S.p.* je cca 300MYA

Potřebují vodné prostředí, kyslík a živiny

volná voda (nikoli chemicky vázaná) - Vodní aktivita = volně přístupná voda/fyziologicky využitelná voda = available water (a_w)

a_w = poměr tlaku vodních par nad substrátem 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 %) nebo na 10% NaCl

Podmínky růstu - kyslík

- Většina kvasinek je **obligatorně aerobní** (vyžadují aspoň stopová množství kyslíku nezbytné pro syntézu některých esenciálních metabolitů – ergosterol, nenasycené mastné kyseliny)
 - fermentativní typy (*Sacharomces c.*, *S. p.*) – pro fermentaci jsou vhodnější anaerobní podmínky, ale *S.c.* i v aerobních podmínkách fermentují (gluk. repr.)
 - respirativní typy (většina) – převládá energeticky výhodnější respirace nad fermentací - 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.
- Nejpreferovanějším cukrem je glukóza (**represe ostatních**)
- Zdrojem dusíku jsou amonné ionty a aminokyseliny

Laboratorní podmínky:

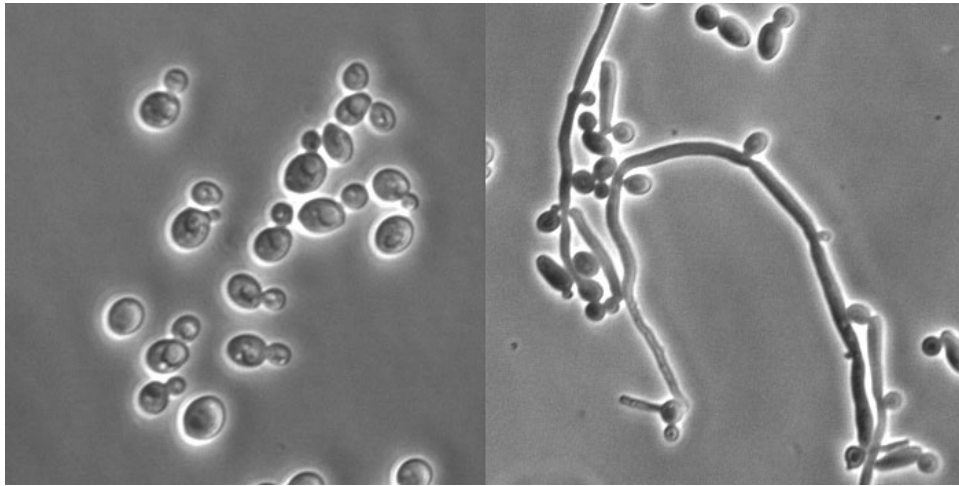
YPD/YES – bohaté médium = 10g/l yeast extract, 20g/l pepton, 20g/l dextrose (2%glukosa)/u *S.pombe* supplements: A, U, H, L, K

Sabouraudův agar (1892) = 10g/l pepton, 40g/l dextrose (4%glukosa), 20g/l agar, pH 5.6

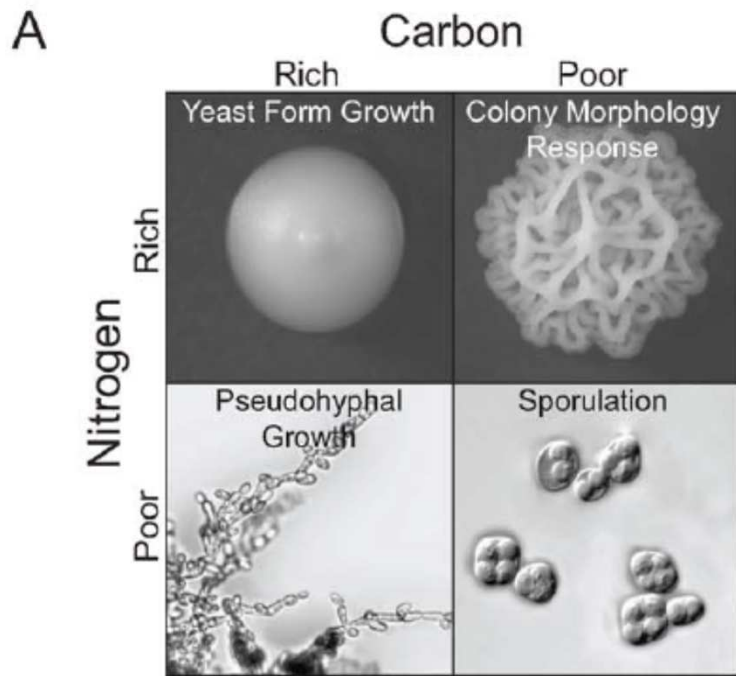
Syntetické SD médium = 6.7g/l yeast nitrogen base w/o amino acids (aminokyseliny se přidávají dle potřeby), 20g/l dextrose (2% glukosa)

Minimální agarová půda = 5g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g/l KH_2SO_4 , 0,5g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10g/l glukosa, 1ml/l Wickerhamův roztok, 20g/l agar

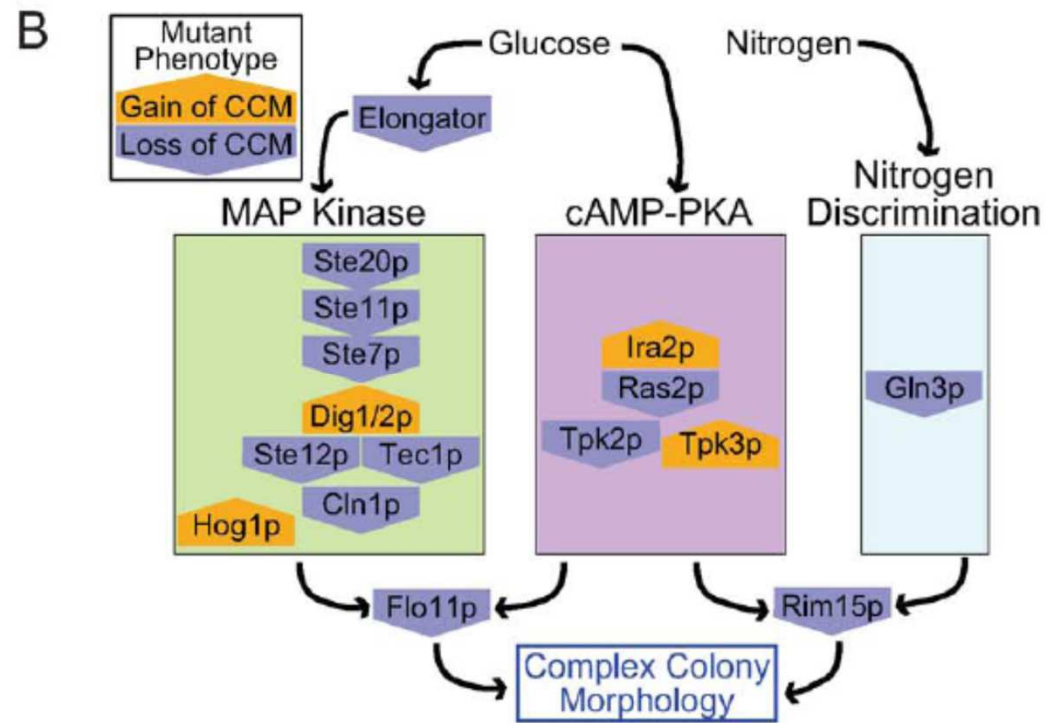
Wickerhamův roztok: 0.2mg biotin, 200mg inositol, 20mg riboflavin, 40mg thiamin, 40mg pyridoxin, 20mg kyselina p-aminobenzoová, 40mg kyselina nikotinová, 0,2mg kyselina listová (na 100ml vody)



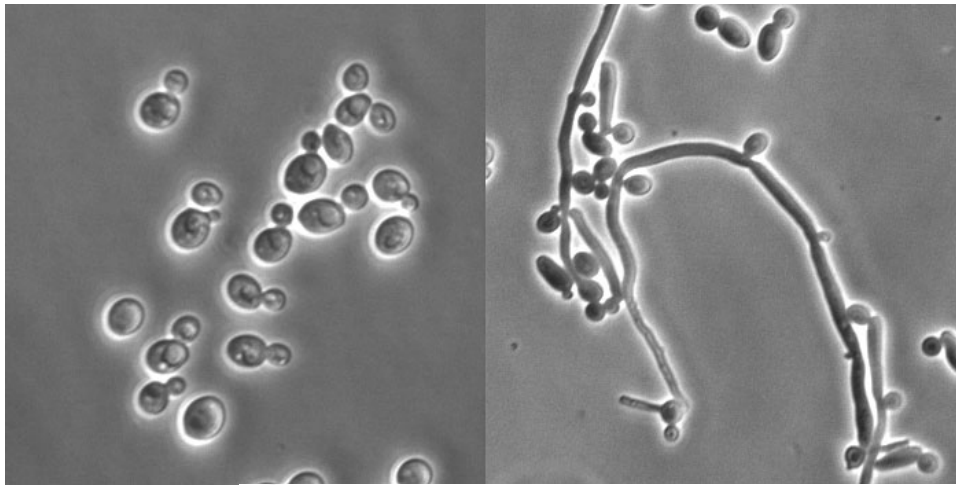
- Živiny určují morfologii/buněčnou formu – kvasinková nebo houbová (pseudohyfy) nebo sporulace ...
- limitování klíčových živin spouští různé vývojové odpovědi
- zdroje uhlíku a dusíku jsou monitorovány signálními dráhami




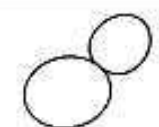
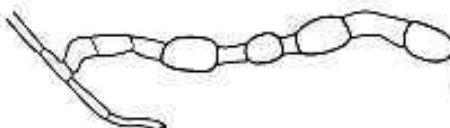
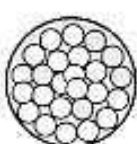

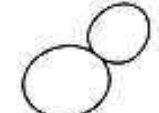
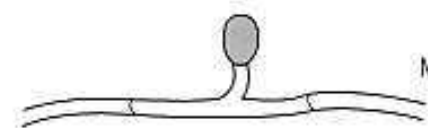


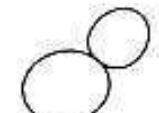
Sporulace/meiosa



Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)



- Živiny určují morfologii/buněčnou formu – kvasinková nebo houbová/pseudo/hyfální
- často se tato stádia odlišují infekčností (hyfy v napadeném organismu zatímco „normálně“ kvasinková forma/ nebo naopak)

Fungus	In vitro (25° C)	In vivo (37° C)
<i>Blastomyces</i>	 Mold	 Yeast
<i>Coccidioides</i>	 Mold	 Spherule
<i>Histoplasma</i>	 Mold	 Yeast
<i>Paracoccidioides</i>	 Mold	 Yeast
<i>Sporothrix</i>	 Mold	 Yeast

Kvasinková forma - morfologie

- za běžných podmínek (bohaté C i N zdroje) převládá kvasinková f.
- rotační elipsoid, kulaté, protáhlé – rod *Dipodascus* až 130 mikrometrů
- 3-15 mikrometrů (bakterie < kvasinky < savčí buňky)
- u jednoho druhu (haploidní < diploidní < polyploidní)

<https://vimeo.com/14316828>

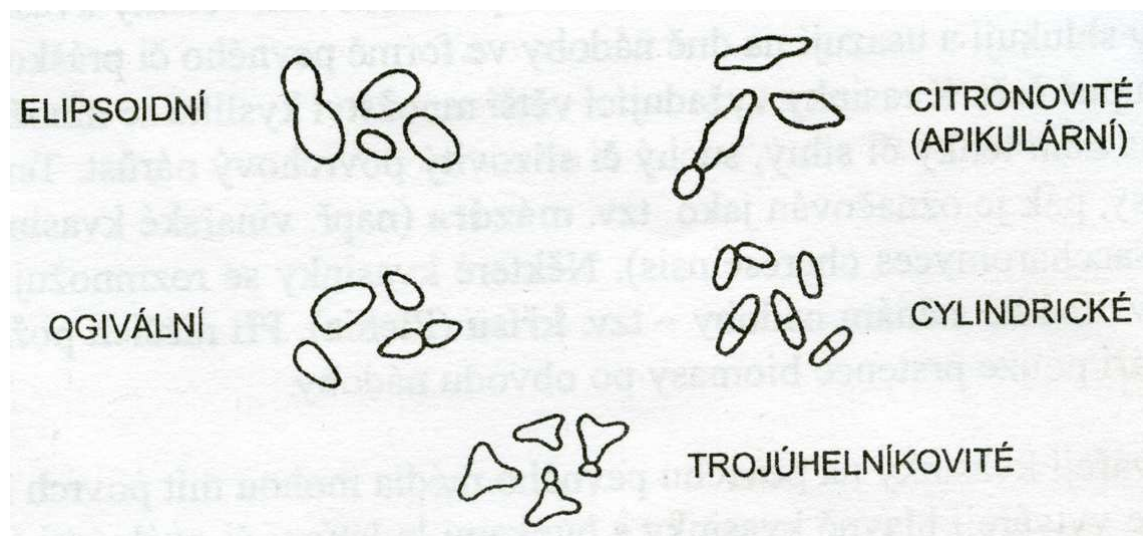
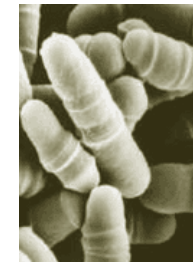
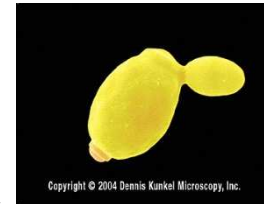


Hoffmann a spol, Genetics, 2015
<http://www.genetics.org/content/suppl/2015/10/02/201.2.403.DC1>



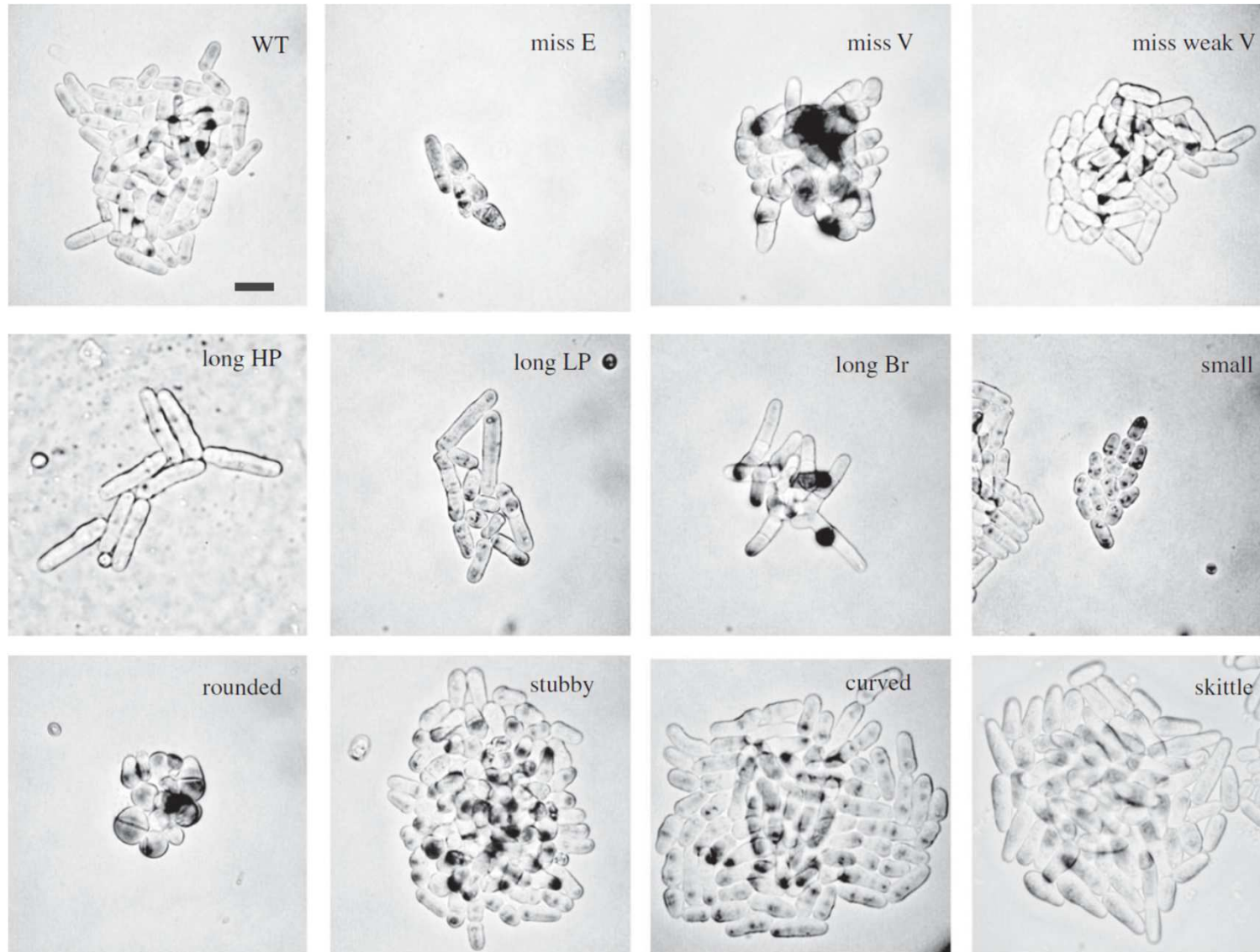
Kvasinková forma - morfologie

- za běžných podmínek (bohaté C i N zdroje) převládá kvasinková f.
- rotační elipsoid, kulaté, protáhlé – rod *Dipodascus* až 130 mikrometrů
- 3-15 mikrometrů (bakterie < kvasinky < savčí buňky)
- u jednoho druhu (haploidní < diploidní < polyploidní)
- vegetativní rozmnožování:
 - pučení – monopolární (rod *Malassezia*), bipolární (střídavě na obou pólech = citronovitý tvar) nebo multipolární (*Saccharomyces*, kdekoli, ale nikdy ne na stejném místě), na sterigmě (pupen spojen s mateřskou buňkou úzkou stopkou)
 - *Schizosaccharomycetes* přehrádečné dělení
 - Zvláštní tvar má za některých kultivačních podmínek rod *Trigonopsis*



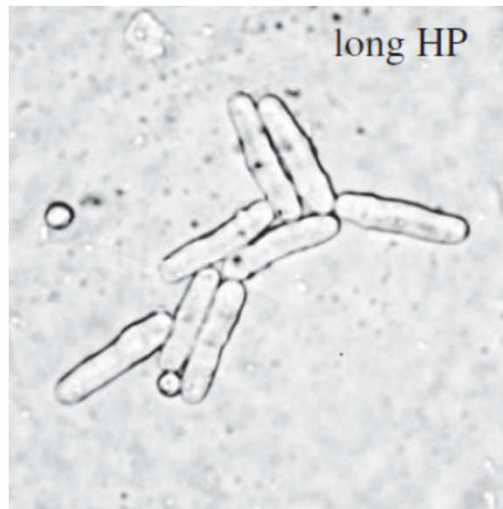
Kvasinková forma - morfologie

visuální analýza kvasinek deleční knihovny ~3500 kmenů (1. genome-wide)

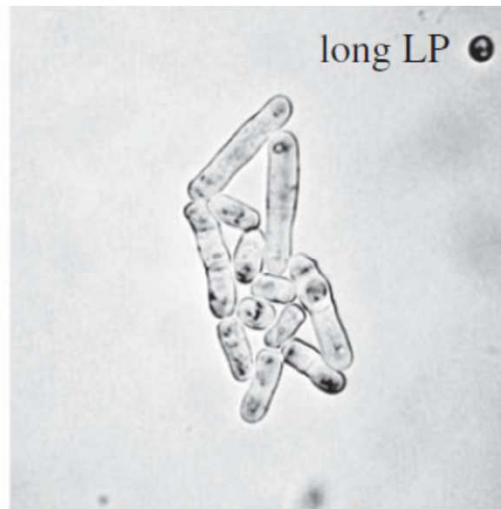


Kvasinková forma - morfologie

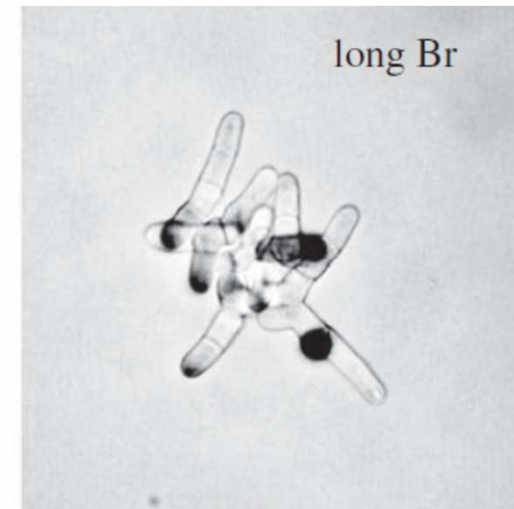
visuální analýza kvasinek deleční knihovny ~3500 kmenů (1. genome-wide)
- např. delece genů regulujících buněčný cyklus *S. pombe* způsobovaly protažený tvar buněk (buňky pokračovaly v růstu, přestože byl buněčný cyklus/mitoza defektní – v důsledku delece genu x)



replikace & transkripce
(splicing, MCM,
biogenese nukleotidů)



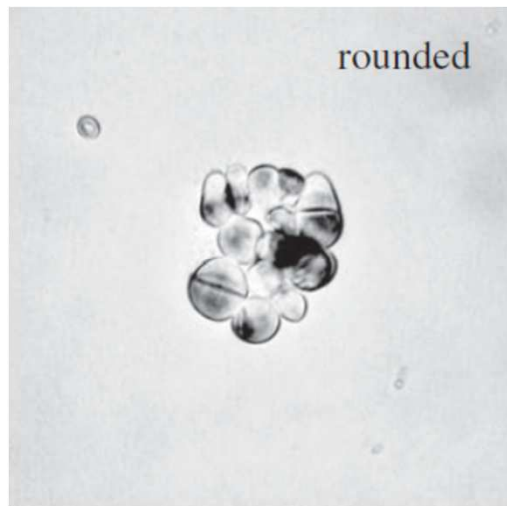
segregace chromosomů
(kinetochora, kondensin,
SMC5/6, APC, biogenese
ribosomů)



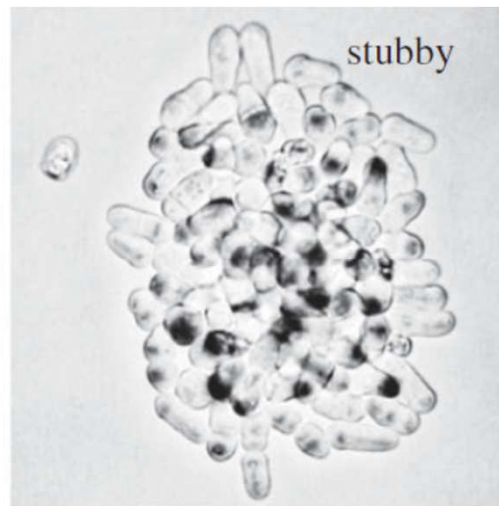
cytokinese & transkripce
(RNA pol, mediator, SAGA)

Kvasinková forma - morfologie

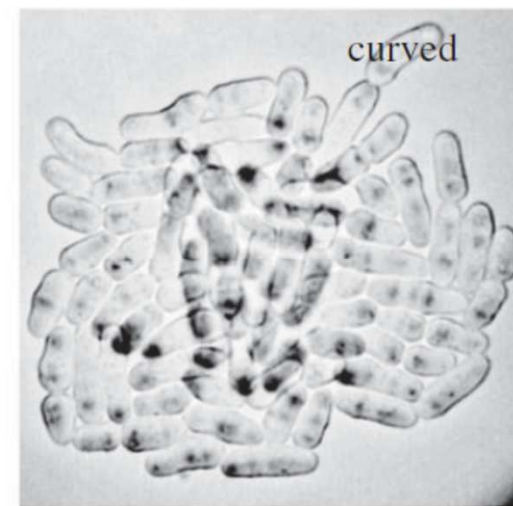
visuální analýza kvasinek deleční knihovny ~3500 kmenů (1. genome-wide)
- např. delece genů regulujících buněčnou polaritu *S. pombe* způsobovaly oválný tvar buněk



buněčná stěna



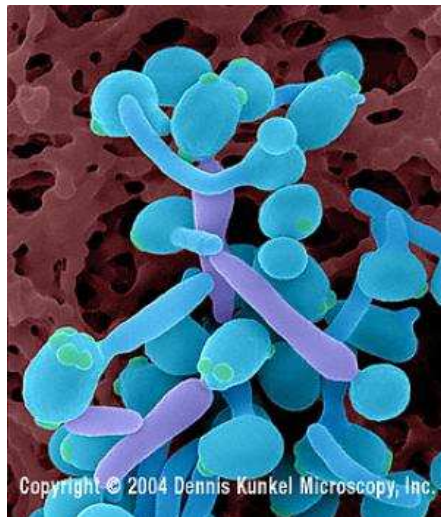
buněčná stěna a aktin



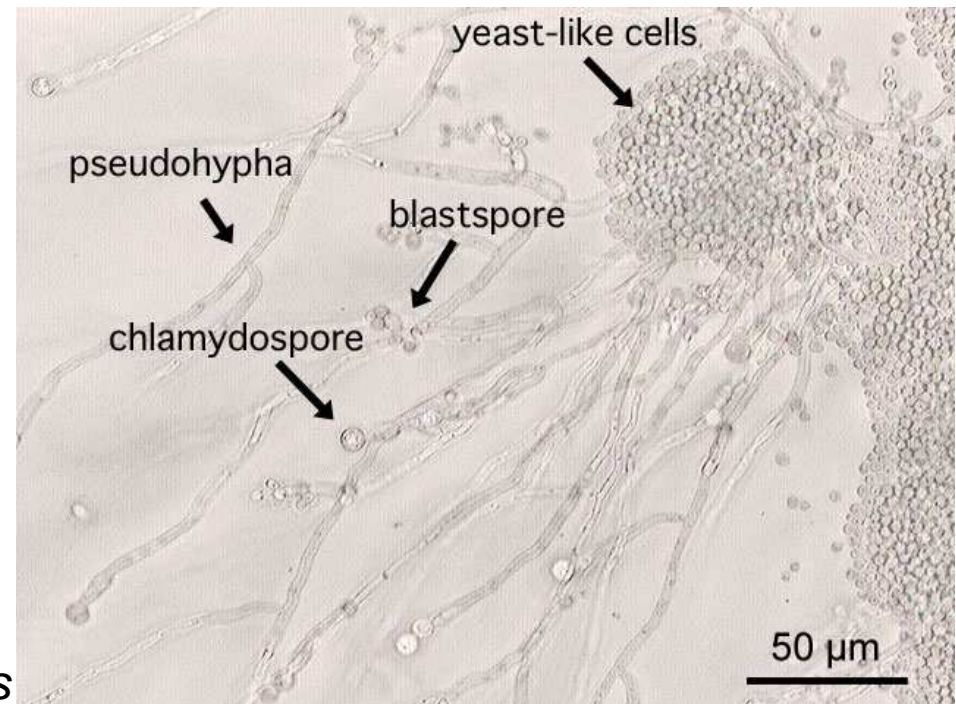
mikrotubuly

Pseudohyfy ...

- při nedostatku dusíku se diploidní buňky protahují a vytváří **pseudohyfy** – vrůstají do agaru
- unipolární pučení, mateřské a dceřiné buňky zůstávají spojené (úplná přepážka, neoddelí se dceřiné buňky x pravé hyfy mají přepážky průtočné)
- **chlamydospory** – 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

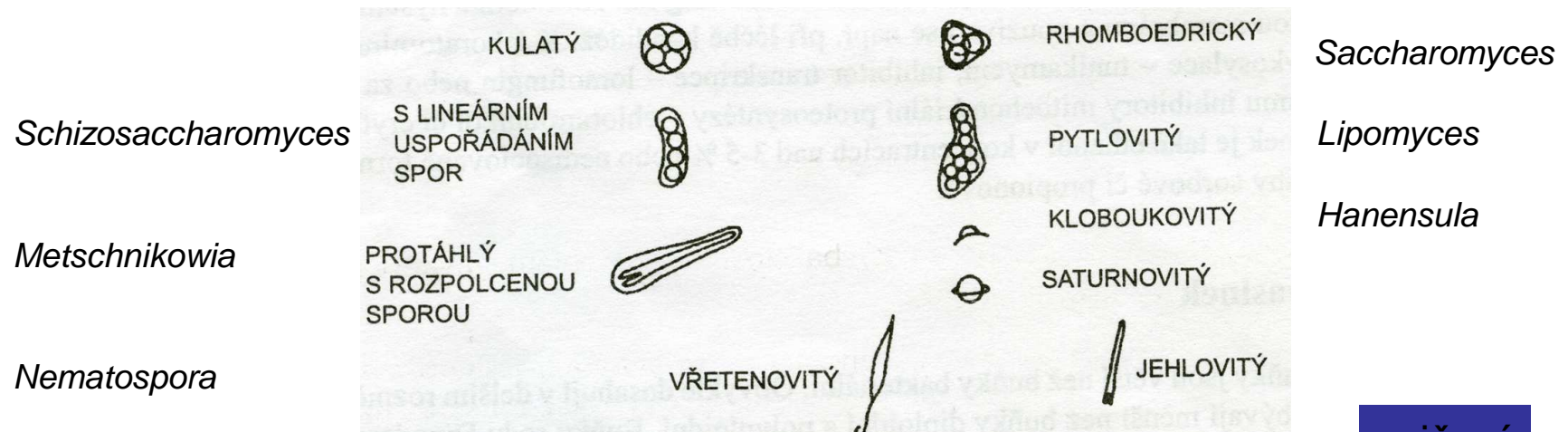
- při nedostatku dusíku v kombinaci s ne-fermentovatelným uhlíkatým zdrojem dochází k indukci meiosis a sporulace

C. dubliniensis:
nadbytek
chlamydospor na
koncích krátkých
pseudohyf

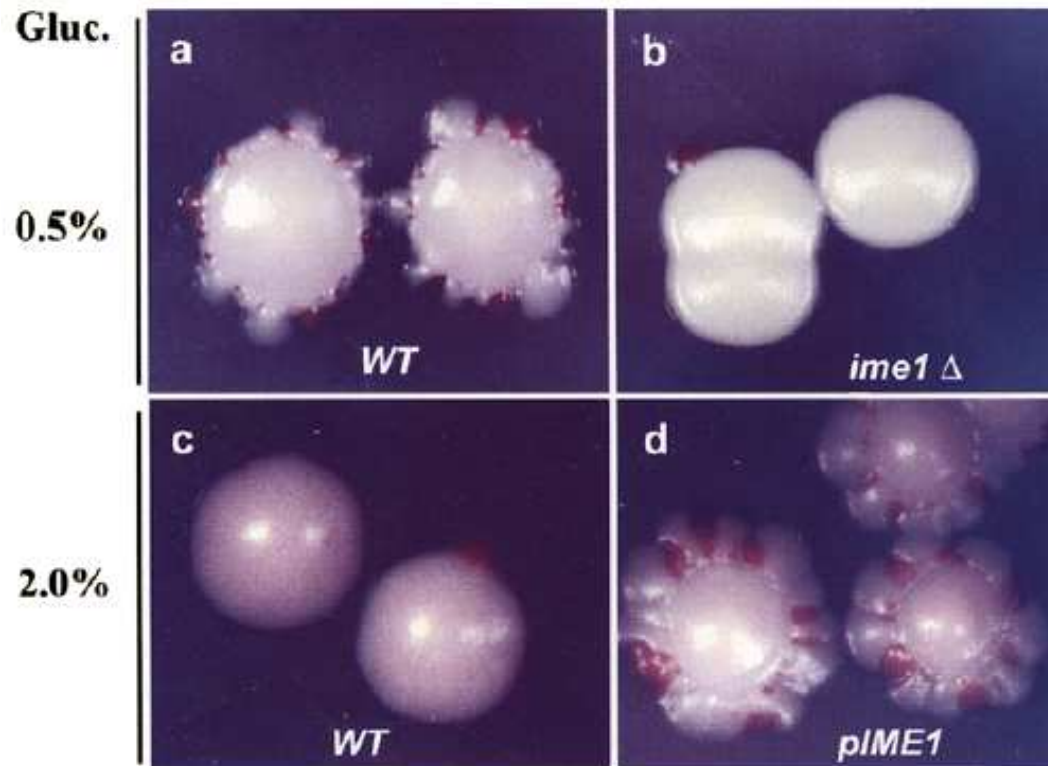


C. albicans: na delších
hyfách či pseudohyfách jen
jedna terminální
chlamydospora

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



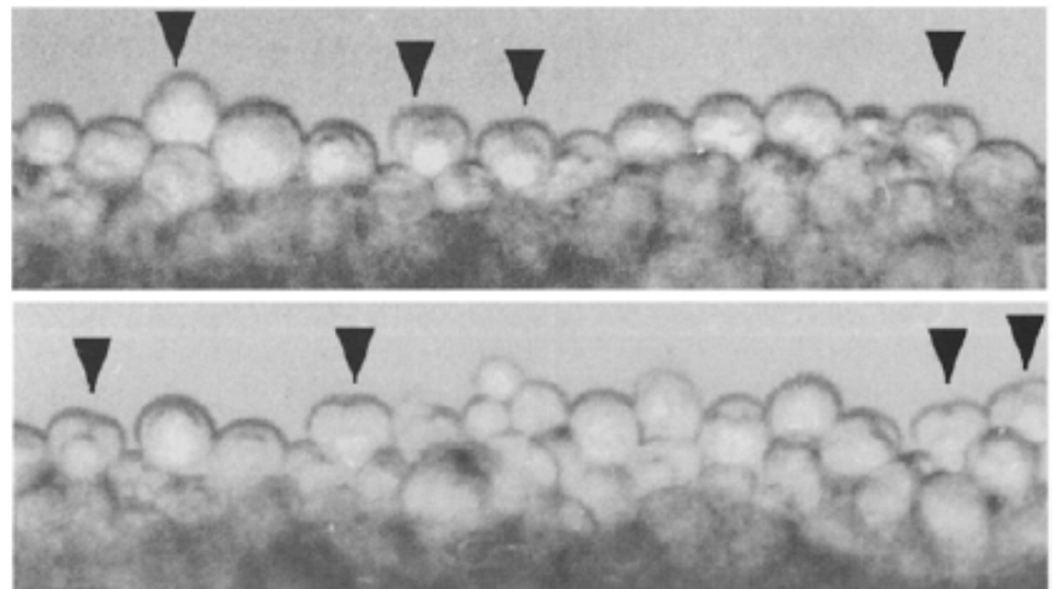
Spory - kolonie



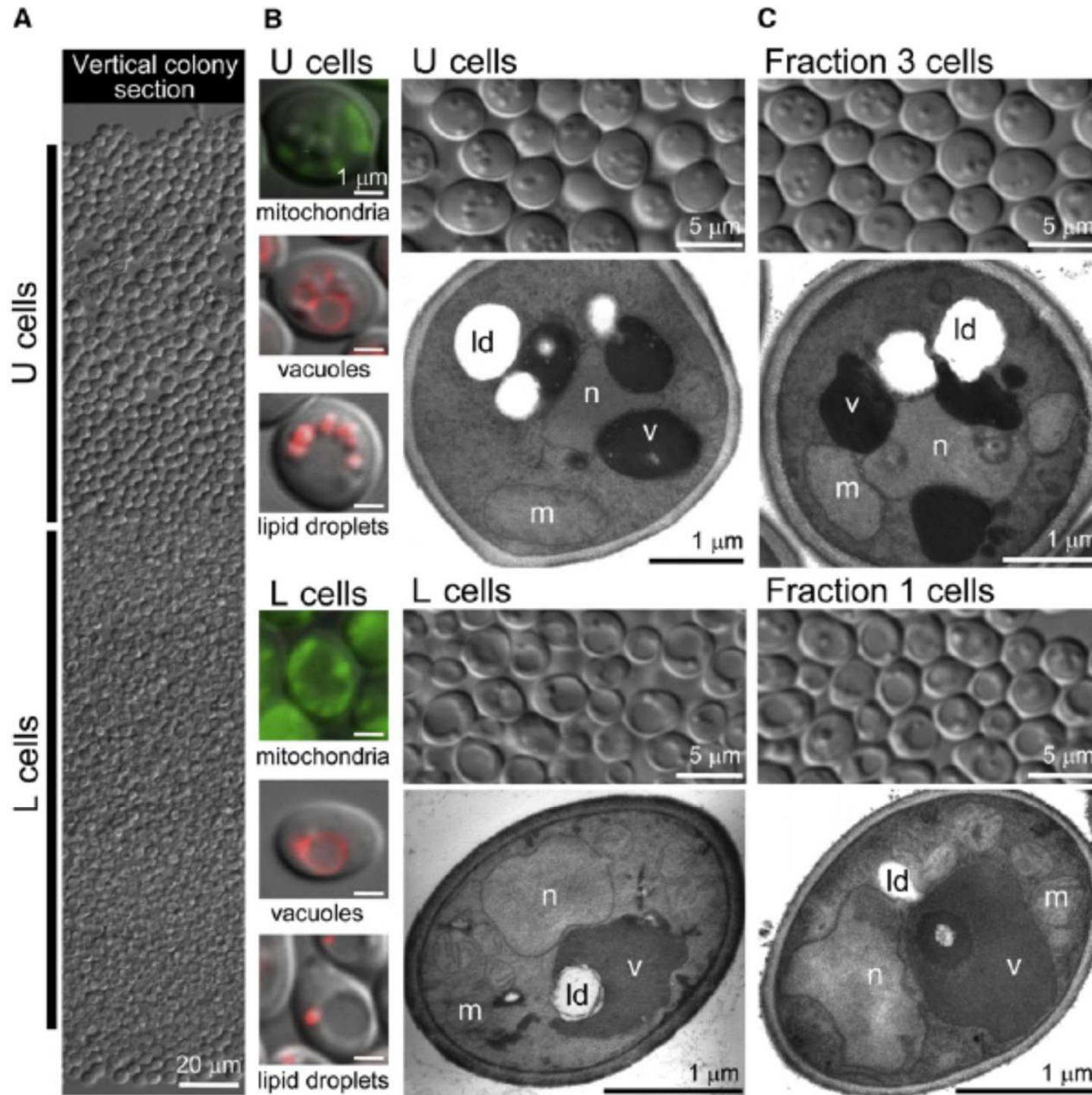
- při vyčerpání živin na misce mohou (krajní) buňky začít meiotické dělení (diploidní *S. cerevisiae*)
- meiosa je indukovaná *IME1* transkripčním faktorem (v *ime1*Δ se meiosa neindukuje vs. v *pIME1* overexprimovaných buňkách je indukována meiosa i bez vyčerpání živin tj. 2% glukosa)

ade2 (červená barva) ukazuje haploidizaci heterozygotního diploida (některé hapl. bílé vs červené)

šipky ukazují vřecka se čtyřmi sporami



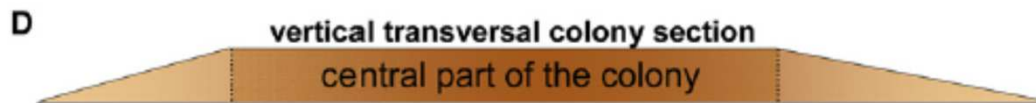
kolonie



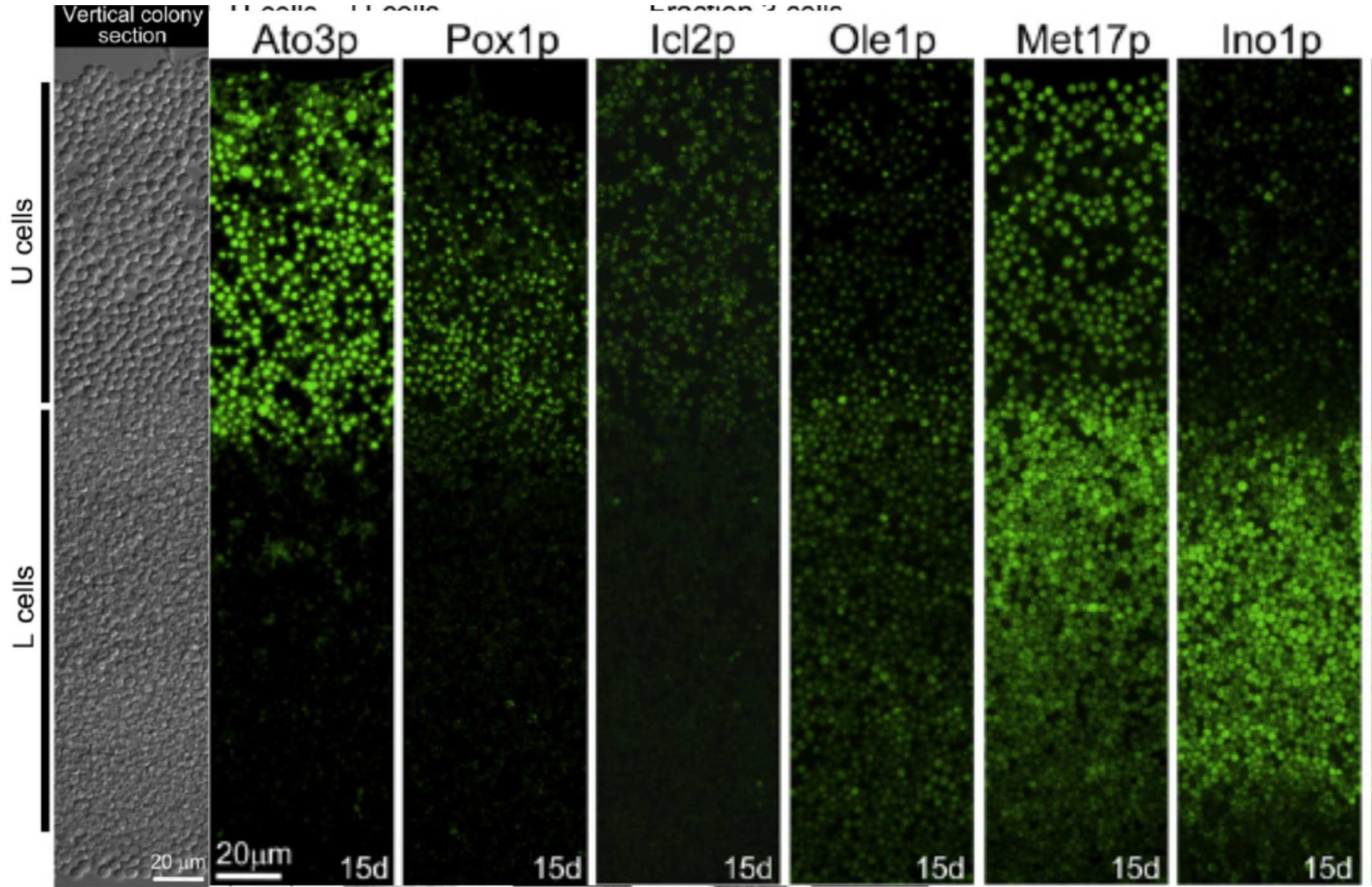
- větší buňky (4 μm)
- malé mitochondrie a vakuoly
- více lipidových váčků

rozdíly jsou patrné i na expresní úrovni proteinů

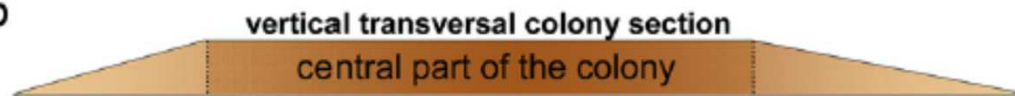
- menší buňky (3 μm)
- velké mitochondrie i vakuoly (aktivnější respirace a více ROS)



rozdíly jsou patrné i na expresní úrovni proteinů

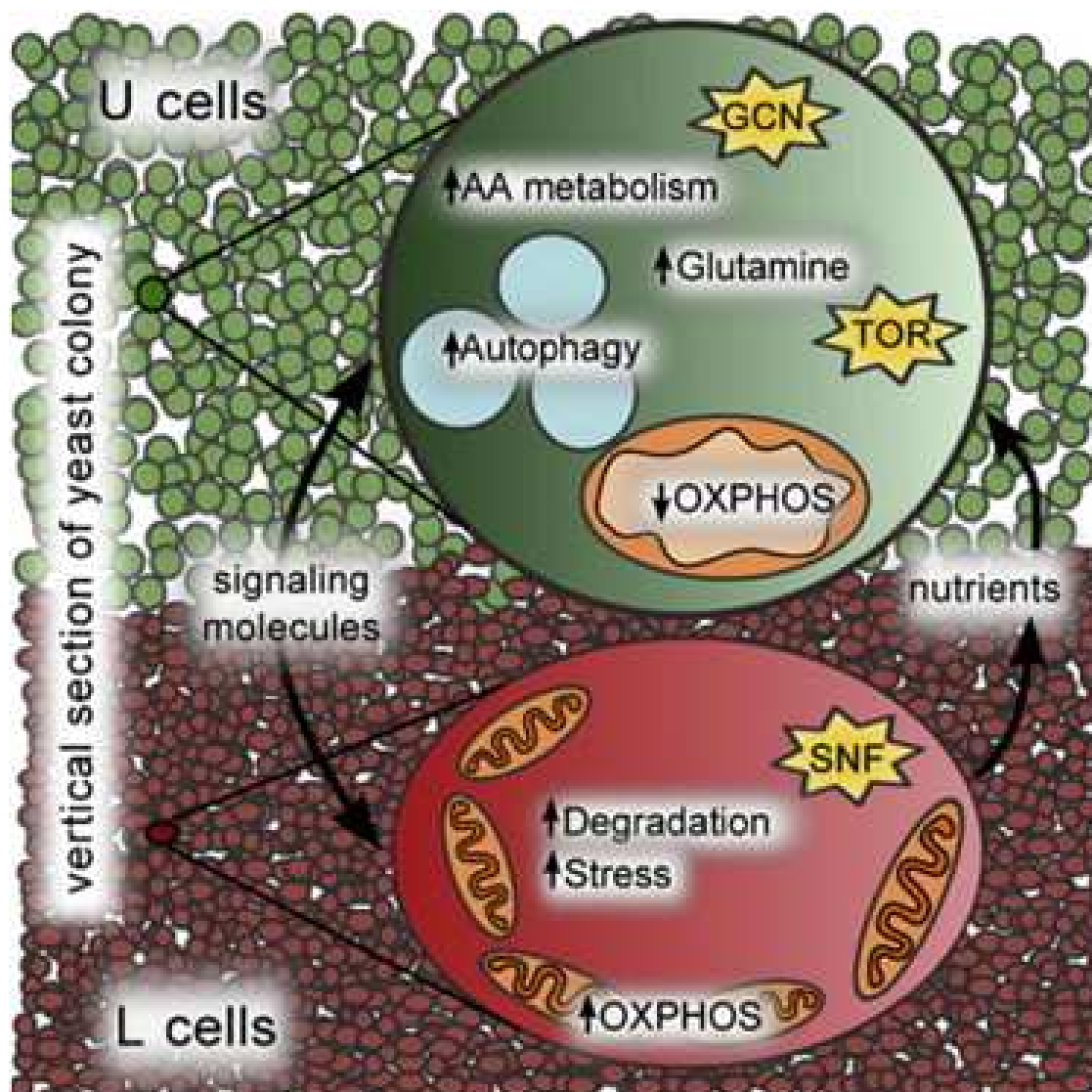


D



Čáp et al., Mol Cell, 2012

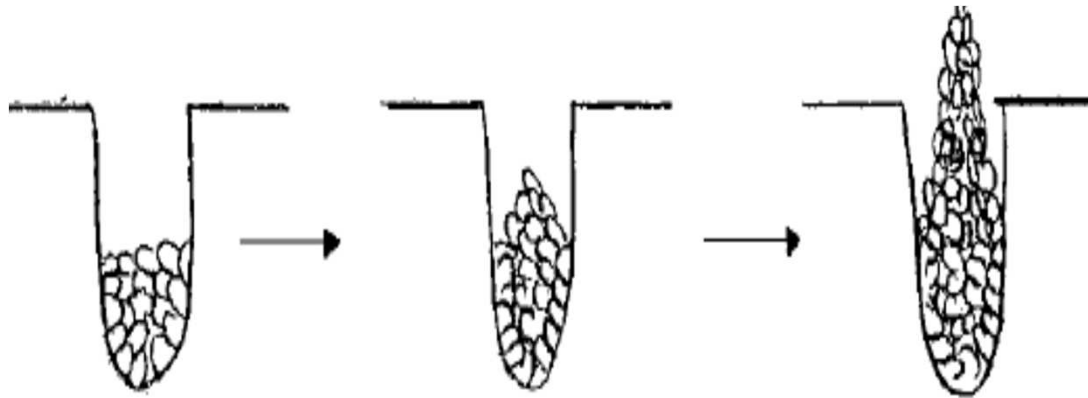
Diferenciace *S.cerevisiae* v kolonii



U (upper) buňky - aktivní glutaminem-indukovanou TOR dráhu, sníženou respiraci (málo mitochondrii), AMK-sensing systém (Gcn4) a vyšší „turnover“ AMK (souvisí s produkcí amoniaku), produkují amoniak pro komunikaci kolonii - využívají živiny uvolněné z L buněk (autofagie) - jsou odolnější vůči stresu – déle přežijí - schopné proliferovat (po 10 dnech)

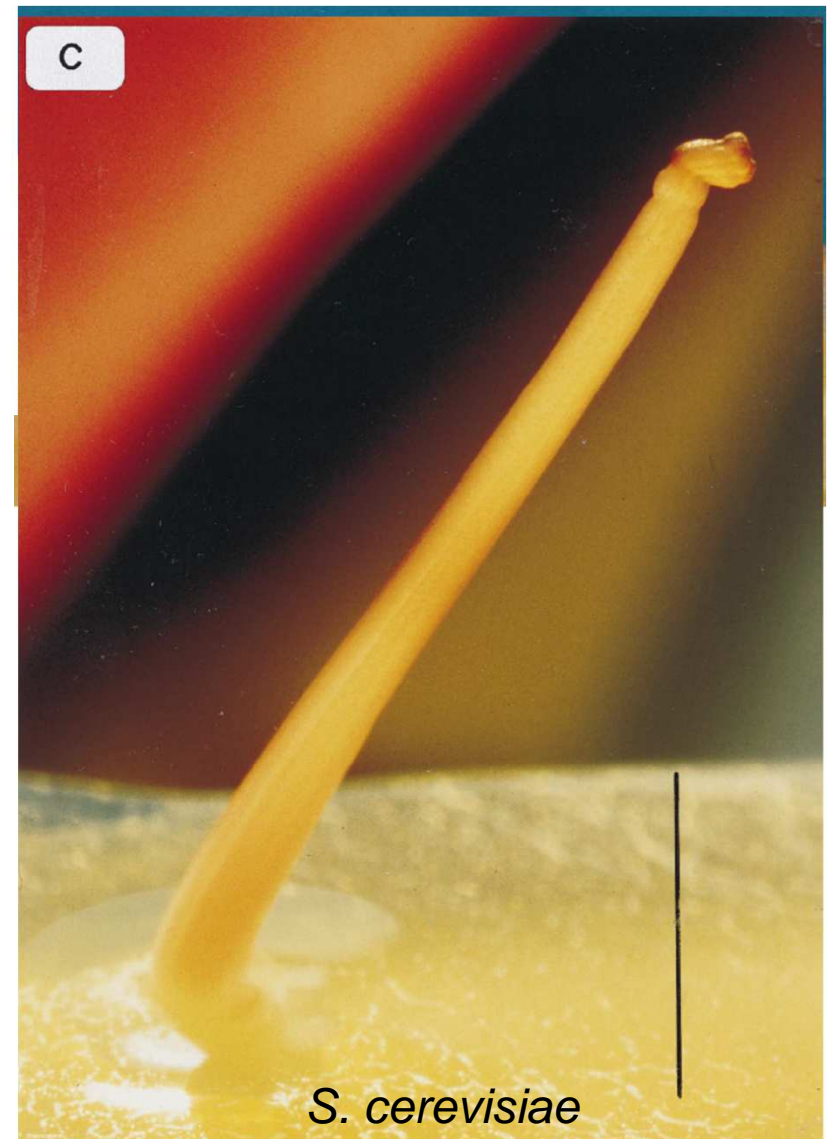
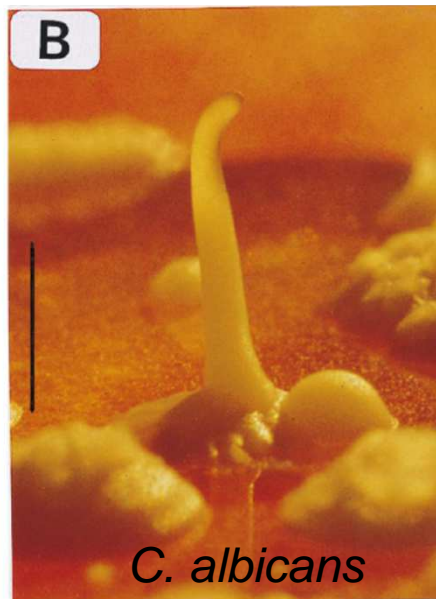
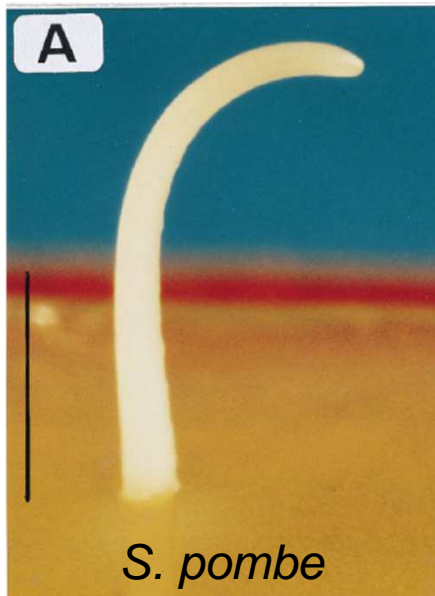
L (lower) buňky – podléhají více stresu, hladoví (přestože jsou blíže mediu), aktivují degradační mechanismy (zásobují U buňky)

- různé vývojové programy (formy) vedou k mnoho-buněčným strukturám (pseudohyfy)
- tvorba biofilmu na pevném podkladu se sníženým množstvím agaru (málo glukózy)
- naopak tvrdý agar (4%, + suchá) a UV záření indukuje „stopkování“ (složená z kvasinkových nikoli pseudohyfálních buněk) – zvyšuje šanci na diseminaci

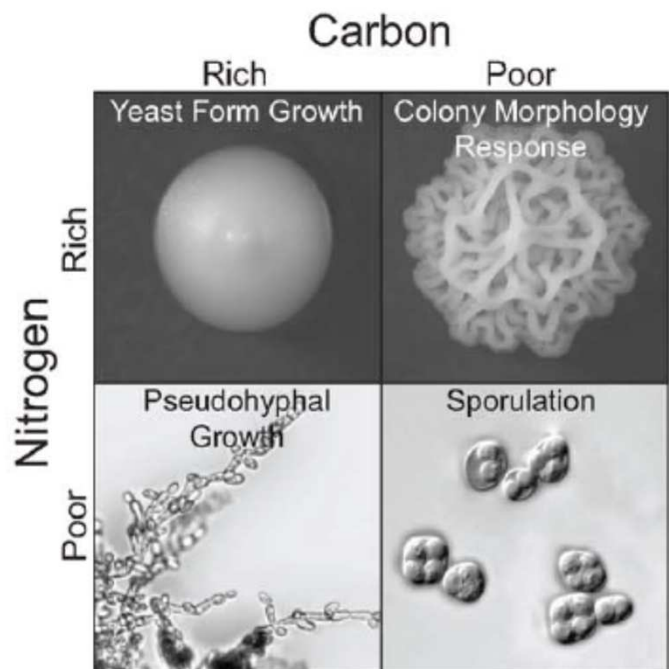


- Buňky v jamkách jsou chráněny před UV, zatímco ty na povrchu jsou zabity

Engelberg a spol., J Bacter, 1998

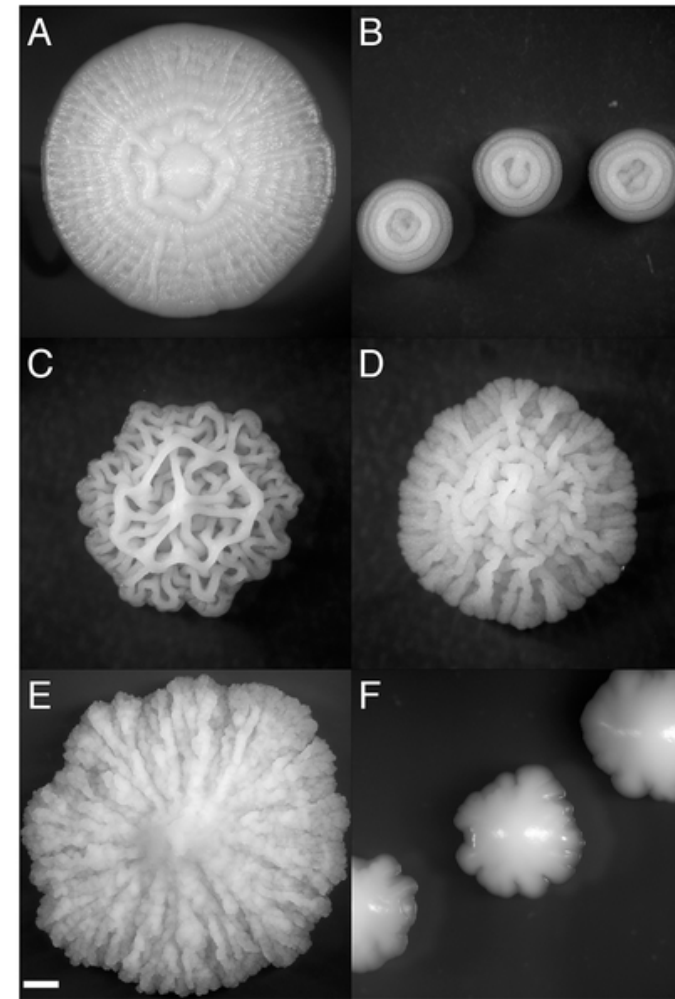


- různé vývojové programy (formy) vedou k mnoho-buněčným strukturám
- tvorba biofilmu na pevném podkladu se sníženým množstvím agaru (málo glukózy)
- naopak tvrdý agar a UV záření indukuje „stopkování“
- různé tvary kolonií:
 - hladké i „fluffy“ kolonie – kulaté a oválné buňky (*S.c.*) – není určující faktor
 - drsné kolonie – protáhlé buňky (*Pichia*)
 - slizovité kolonie – pouzdra (*Lipomyces*)
- obvykle krémová barva –
- červený pigment (*Rhodotorula*, *Sporidiobolus*)
- černý pigment (melanin – *Aureobasidium*)
- používá se např. pro odlišení *C.d.* od *C.a.* (kultivace na Staibově agaru při teplotě 37°C)



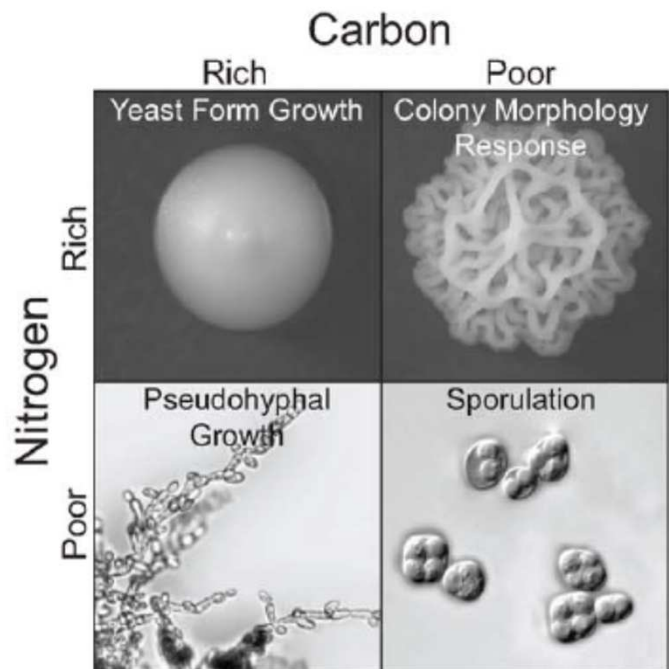
Kolonie

cvičení

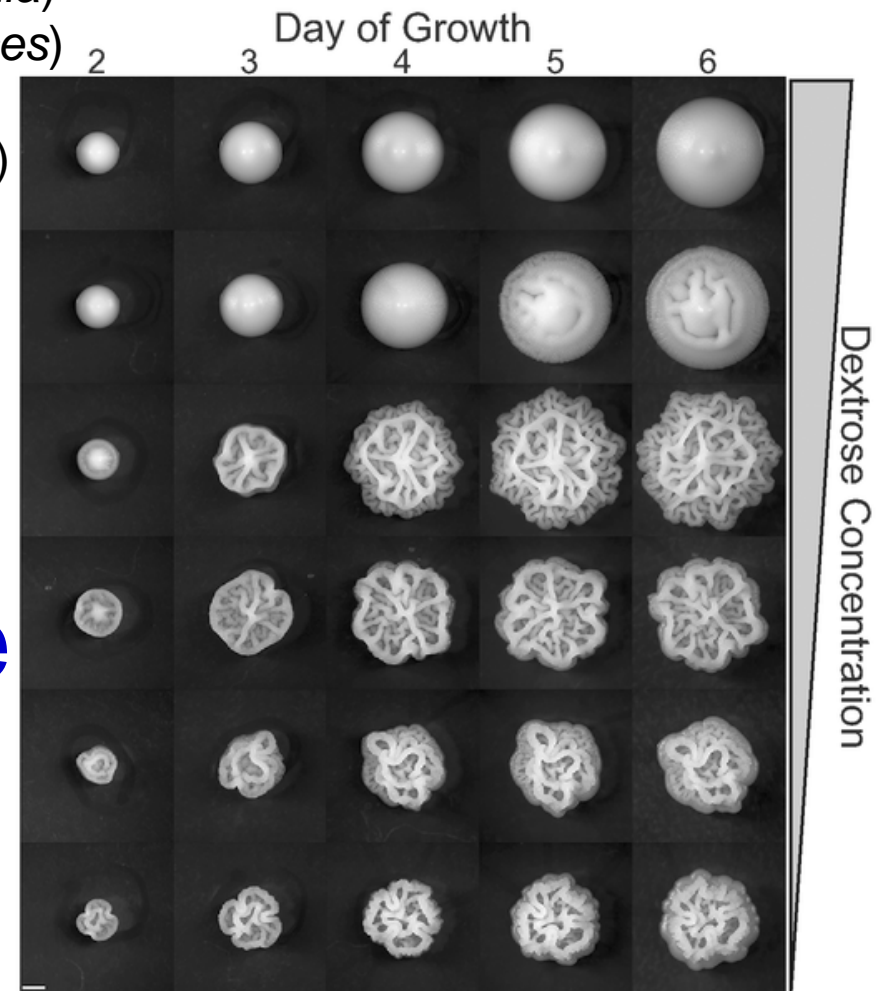


Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

- různé vývojové programy (formy) vedou k mnoho-buněčným strukturám
- tvorba biofilmu na pevném podkladu se sníženým množstvím agaru (málo glukózy)
- naopak tvrdý agar a UV záření indukuje „stopkování“
- různé tvary kolonií:
 - hladké i „fluffy“ kolonie – kulaté a oválné buňky (*S.c.*) – není určující faktor
 - drsné kolonie – protáhlé buňky (*Pichia*)
 - slizovité kolonie – pouzdra (*Lipomyces*)
- obvykle krémová barva –
- červený pigment (*Rhodotorula*, *Sporidiobolus*)
- černý pigment (melanin – *Aureobasidium*)
- používá se např. pro odlišení *C.d.* od *C.a.* (kultivace na Staibově agaru při teplotě 37°C)

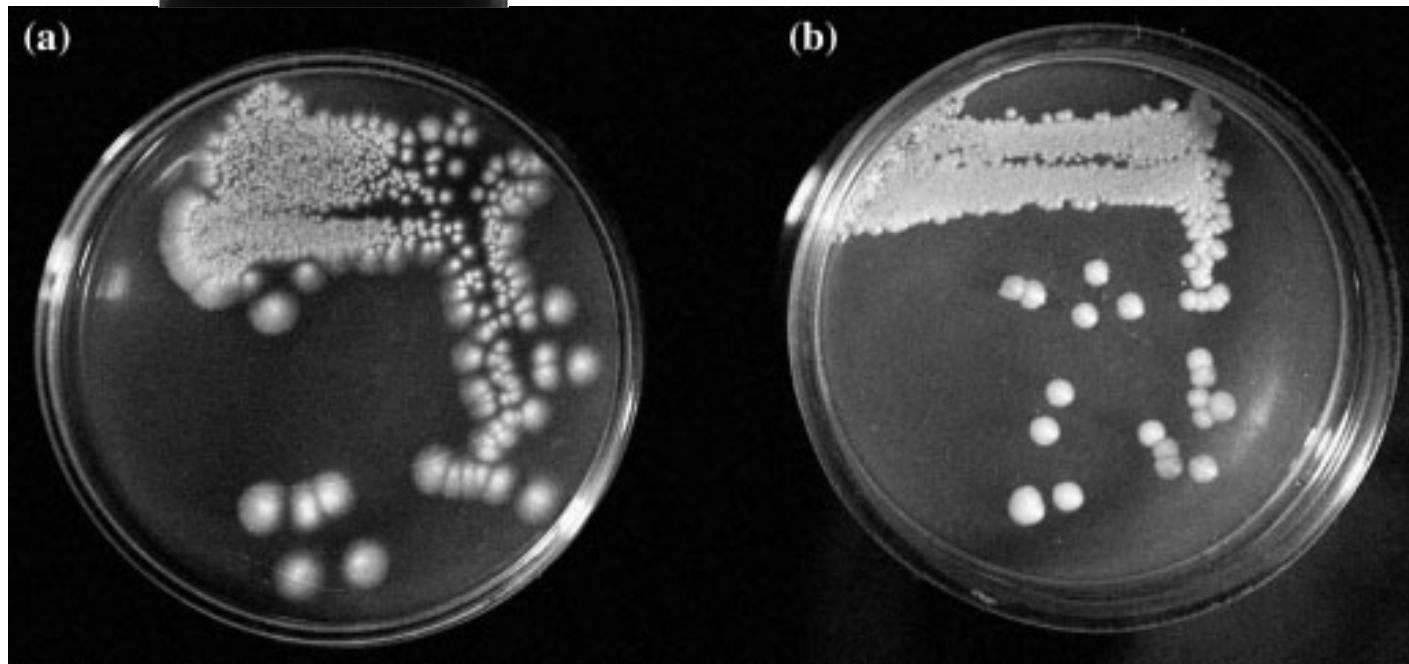
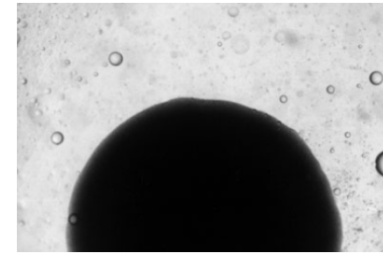
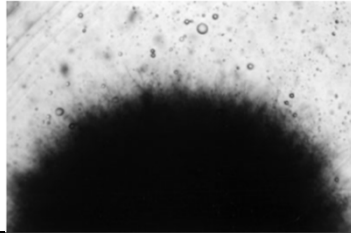


Kolonie



Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

Morfologie kolonie - Candida



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

(a) *C. dubliniensis*

(b) *C. albicans*

Extracelulární matrix

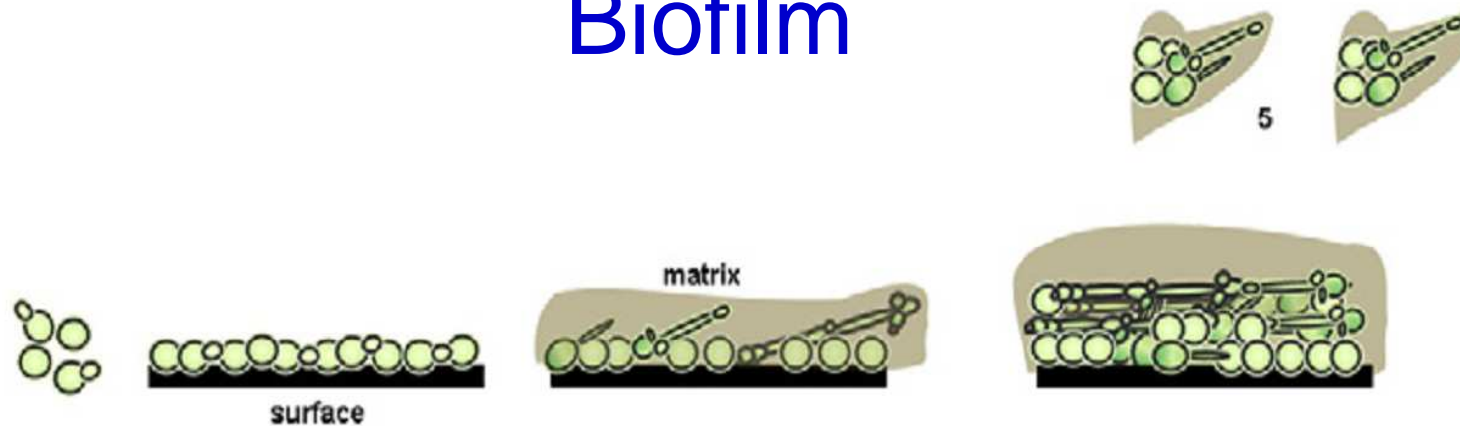


- závisí na ECM (extracellular matrix tj. glykoproteiny)
- ECM zachycuje vodu a chrání kolonii před vyschnutím
- buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (... biofilm, flokulace)
- závisí na FLO11 (adhesin – glykoprotein – faktor důležitý pro flokulaci, biofilm, pseudohyfy)

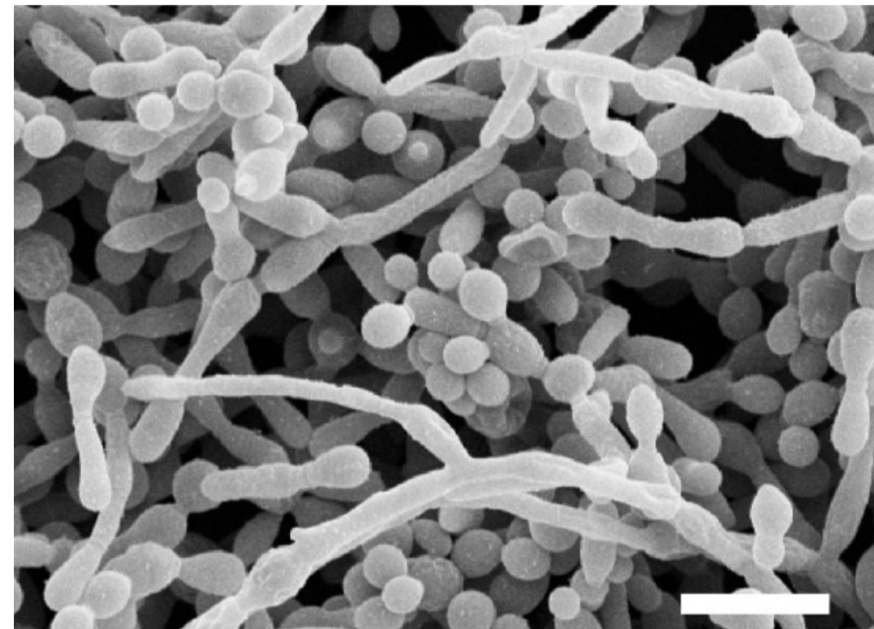
Stovicek et al, Fungal Gen Biol (2010)

Laboratorní kmeny jsou hladké
 (např. S288C - Genotyp: *MAT α*
SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1)

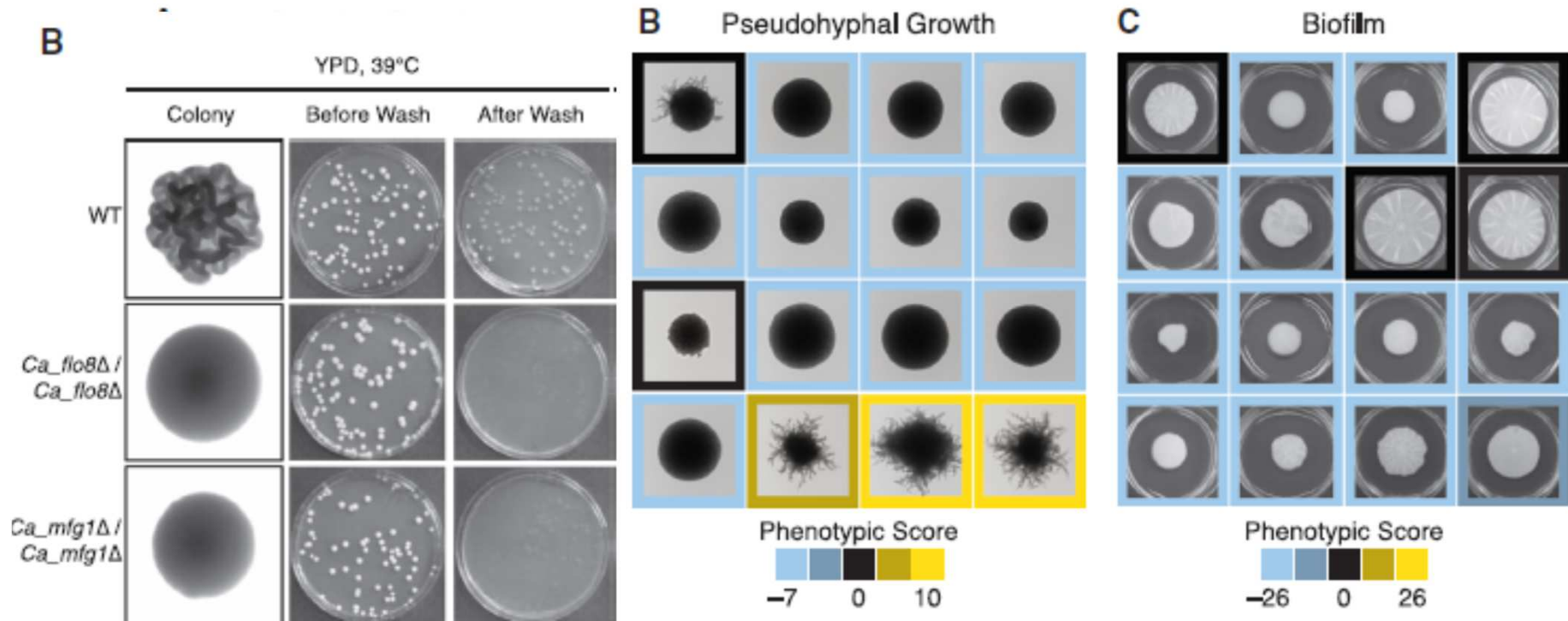
Biofilm



- tvořen matrix s mikrokoloniemi kvasinek, hyfami a pseudohyfami (komplexní struktura)
- více rezistentní než planktonické buňky
- významně přispívá k rozvoji a odolnosti kandidóz (rezistentní k antimykotickým látkám)
- ECM a adhesiny/flokuliny *FLO1*, *FLO11* jsou potřebné pro tvorbu biofilmu
- 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)

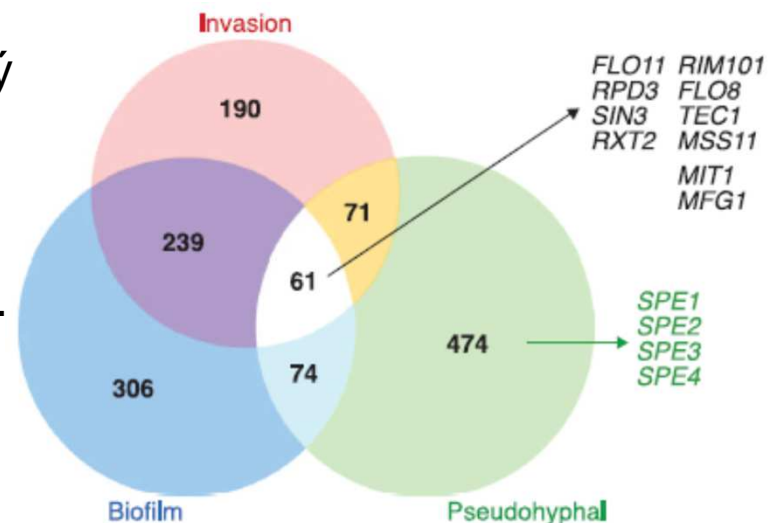


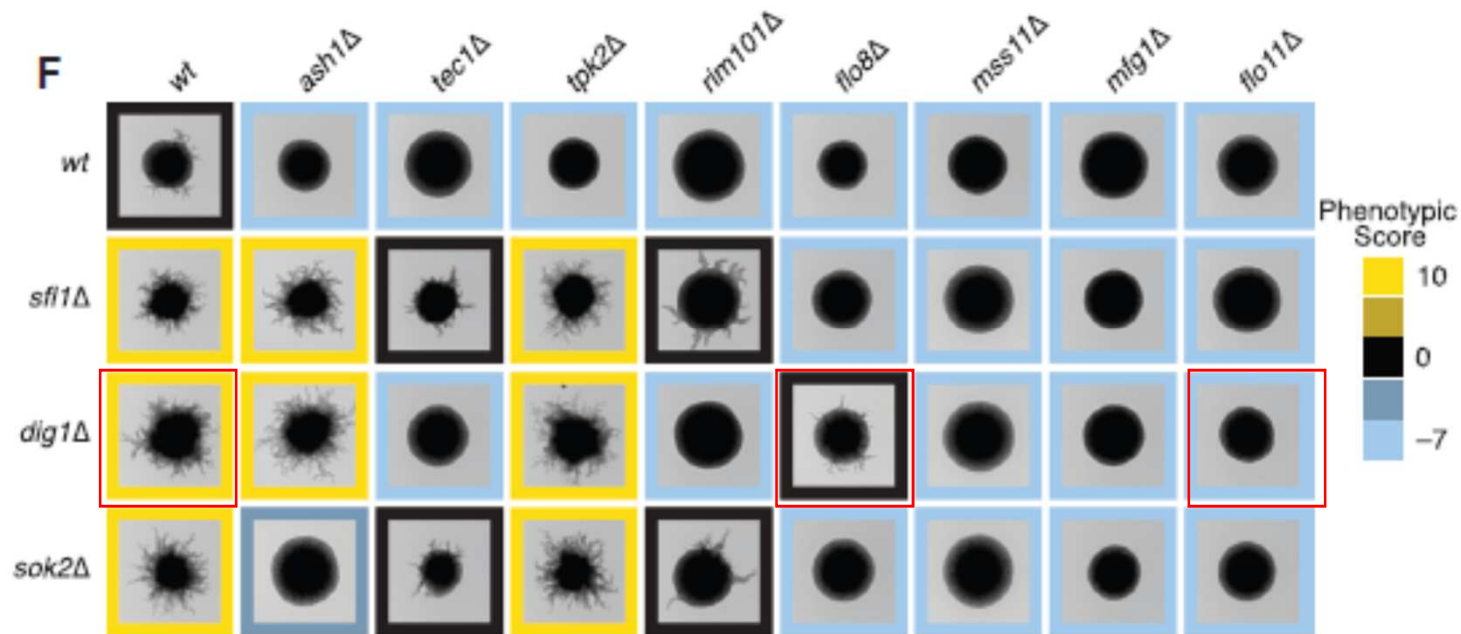
S.c. kmen Σ1278b



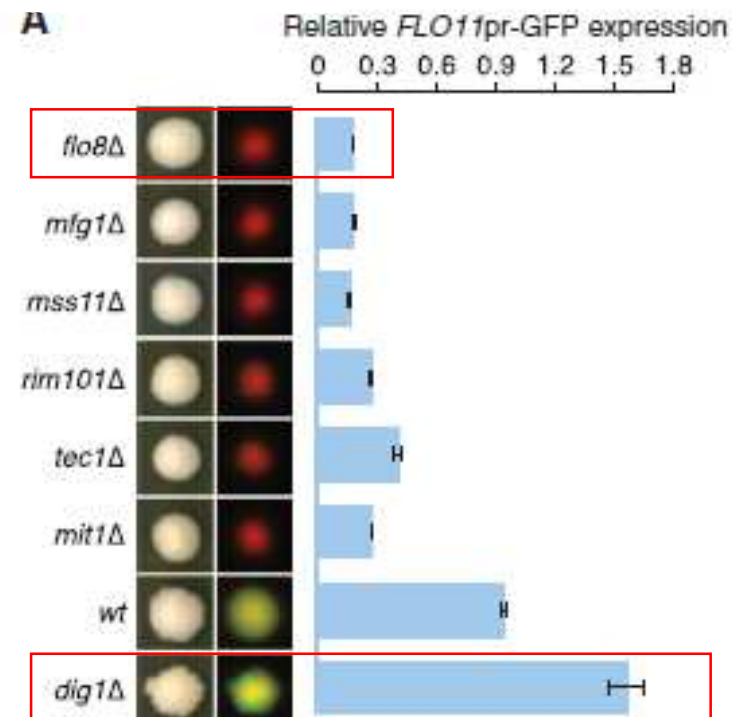
- Flo8, Mfg1 jsou TF aktivující transkripci Flo11
- Dig1 je represor transkripce Flo11
- FLO11 = adhesin (glykoprotein – faktor důležitý pro uchycení - buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (... biofilm, flokulace)
- Flo11, Flo8, Mfg1 faktory jsou konzervovány ... a podílí se na invazivních vlastnostech (virulenci) patogenních kvasinek *C. albicans*

Ryan et al, Science (2012)





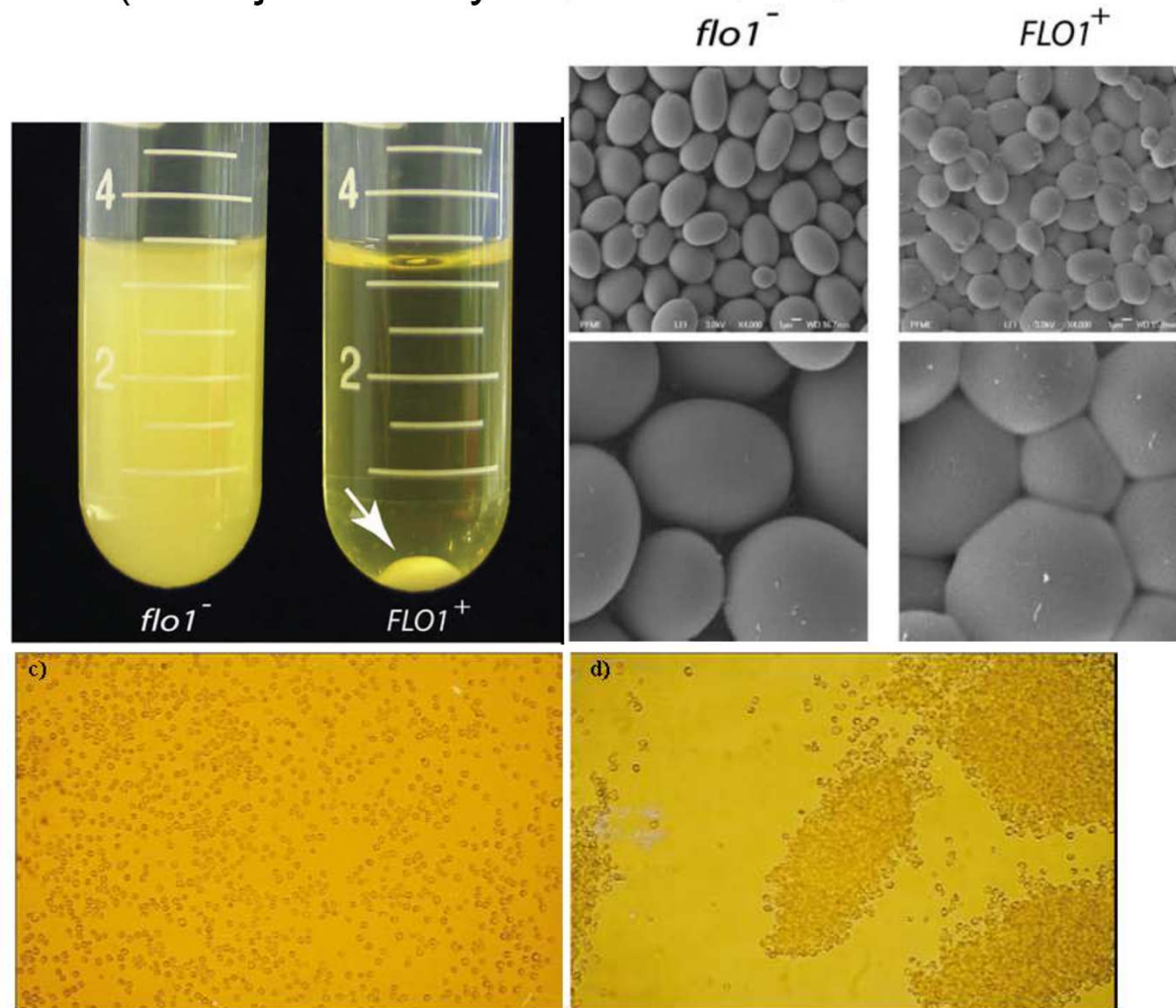
- Flo8, Mfg1 jsou TF aktivující transkripci Flo11
- Dig1 je represor transkripce Flo11
- FLO11 = adhesin (glykoprotein – faktor důležitý pro uchycení - buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (... biofilm, flokulace)



Ryan et al, Science (2012)

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)

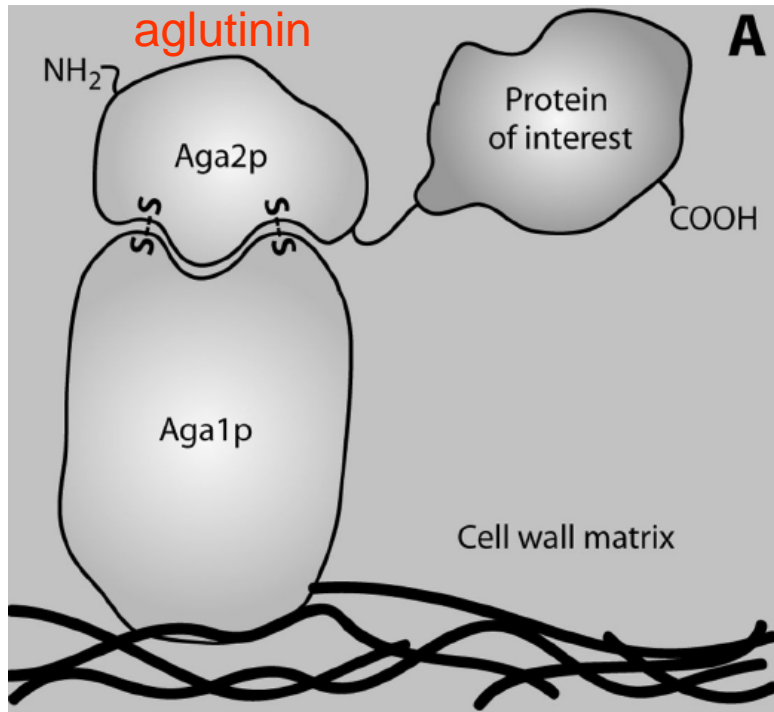


- ovlivněno složením média, genetickou výbavou kmene (skupina *FLO* genů), teplotou, stavbou a morfologií buňky ...
- Flo1p váže manany na povrchu buněk stejného druhu (*S.c.*) => agregace
- NewFlo váže manosu i glukosu => glukosa v mediu inhibuje agregaci – teprve po přeměně cukrů na etanol se váže na buněčnou stěnu ostatních buněk a dochází k vločkování

Smukalla a kol., 2008, Cell

Verstrepen, 2006, Mol. Microbiol

Yeast surface display



- His-His-His-His-His-His
(chelatuje Ni, Cu, Co kovy)

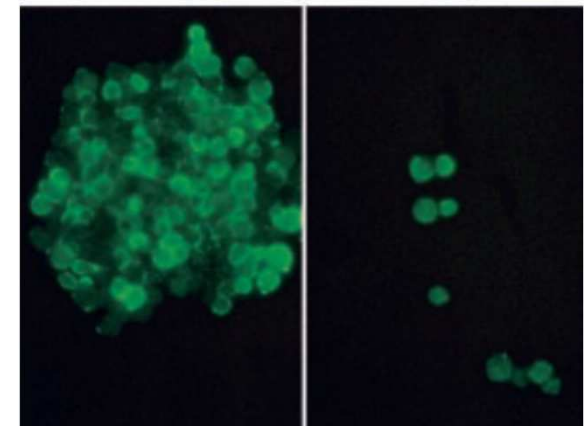
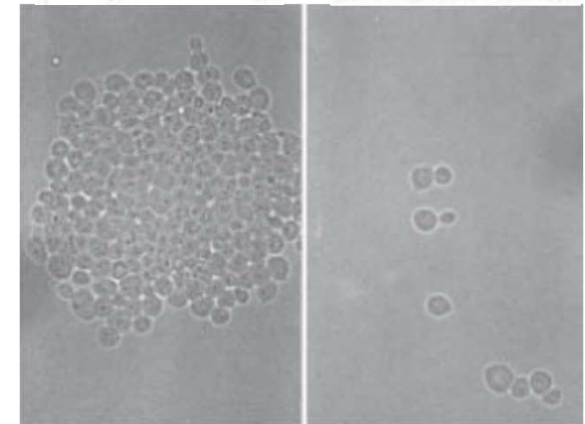
- *GTS1* transkripční faktor
spouštějící aglutinaci pod
CUP1 promotorem
(další přednášky)

- biosorbce &
sedimentace



GPMH6/pMCG1
(100 μ M CuSO₄)

GPMH6/pMCG1
(without CuSO₄)



- hybrid Aga2 (aglutininy nebo Flo1 ...) s testovaným proteinem

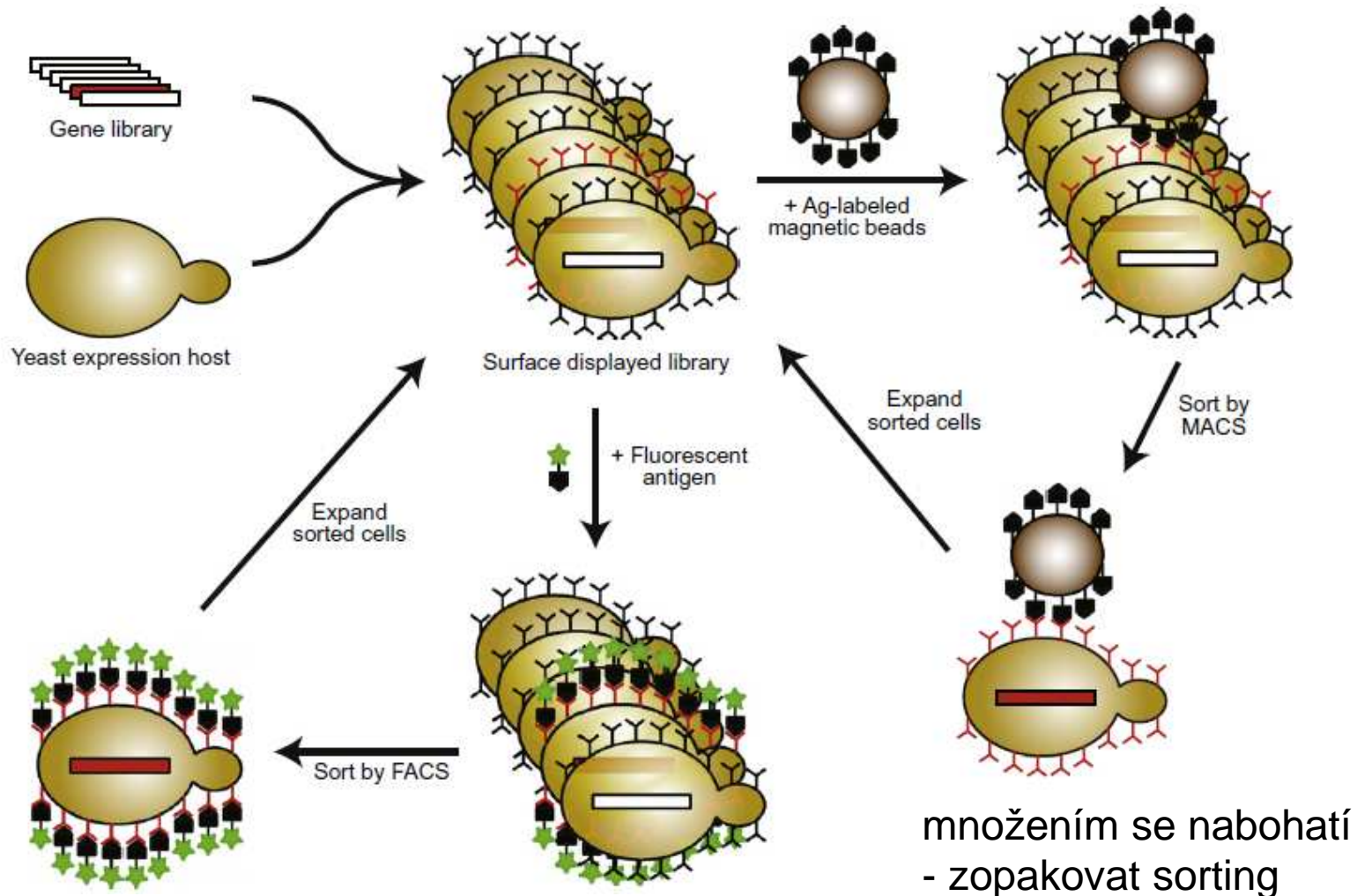
- exprese eukaryotních proteinů v kvasince (podobné mechanismy ... posttranslační modifikace) – knihovny lidských cDNA (i protilátek z pacientů)

- využití i pro biotechnologie – vylučování těžkých kovů (dekontaminace)

Kuroda et al, Appl Microbiol Biotechnol (2002)

Pepper et al, CCHTS (2008)

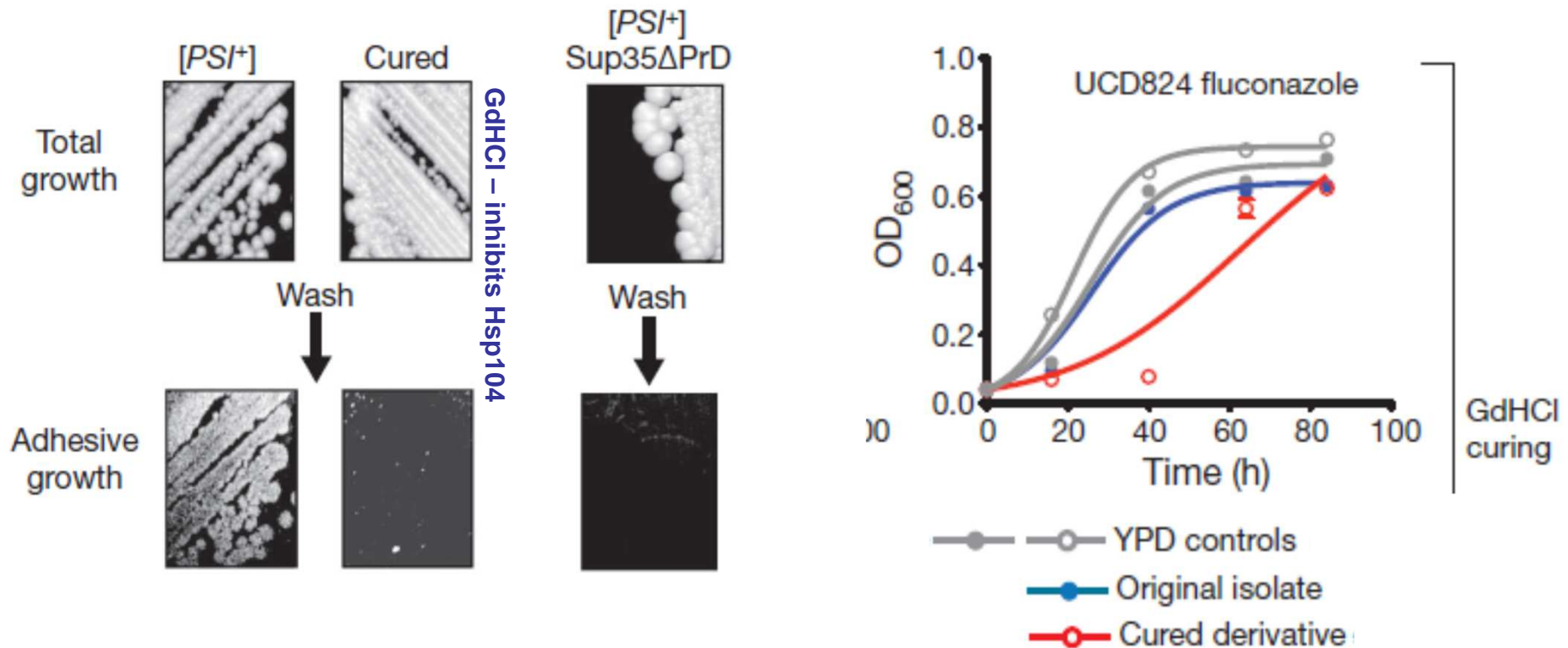
YSD - testy antigen/protilátka



- v kvasince je exprimována knihovna (např. IgG klonů) – na kuličkách je navázán antigen – opakováním vychytávání dojde k nabohacení (i slabších interakcí)

Priony – epigenetická informace kvasinek

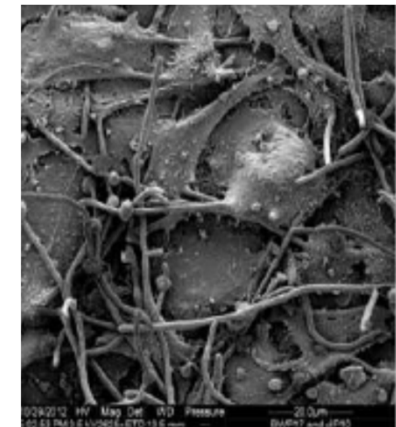
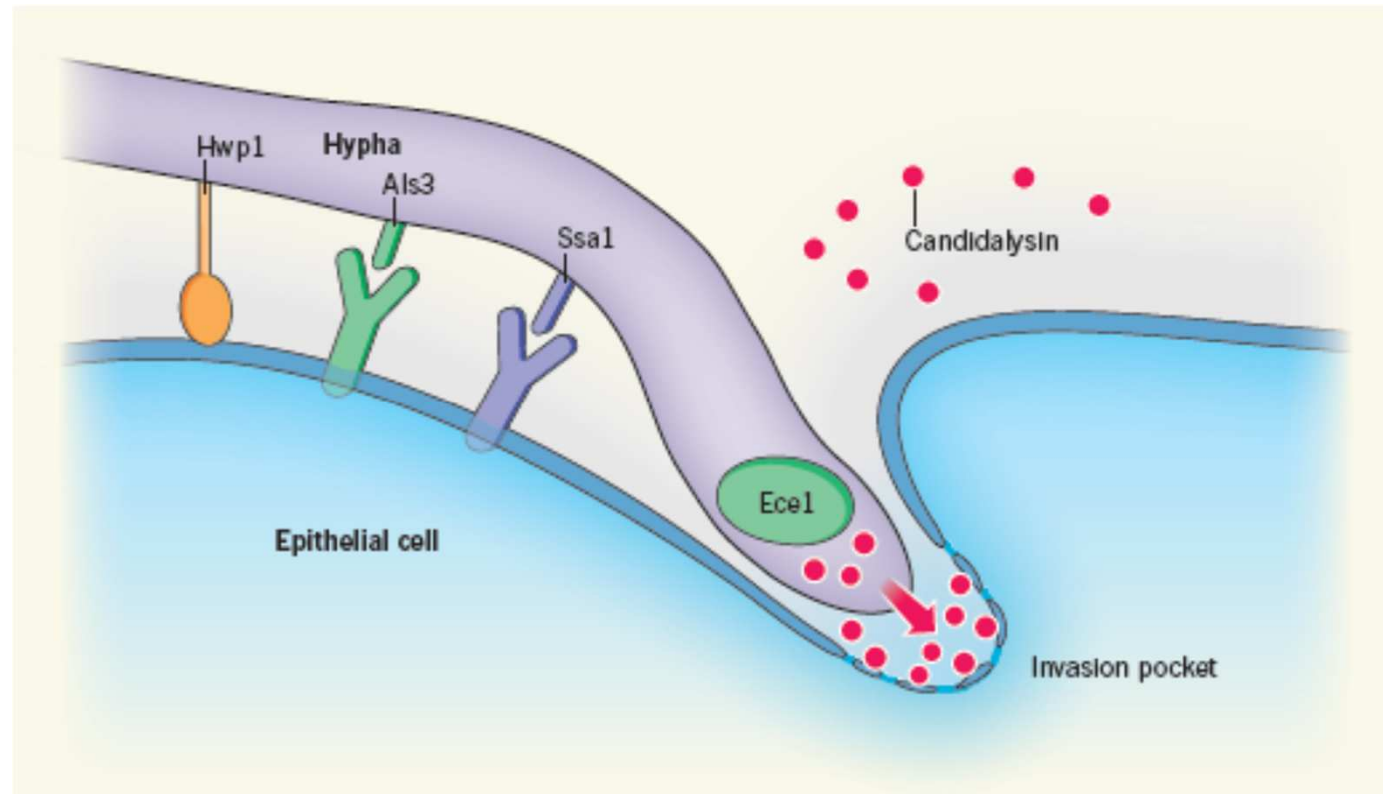
Adhesivní vlastnosti mohou být ovlivněny přítomností prionů [PSI⁺] kódovaných Sup35 genem - jeho PrD doména spouští tvorbu amyloidových agregátů



Sup35 je translační terminační faktor (zastavuje translaci na STOP kodonu) – pokud agreguje/nefunguje, dochází k read-through genů tj. vznikají proteiny s delší sekvencí a novými vlastnostmi (záleží na genomu dané kvasinky jaké) – mohou dát kvasince nové výhody (např. zvýšenou rezistenci k fluconazolu)

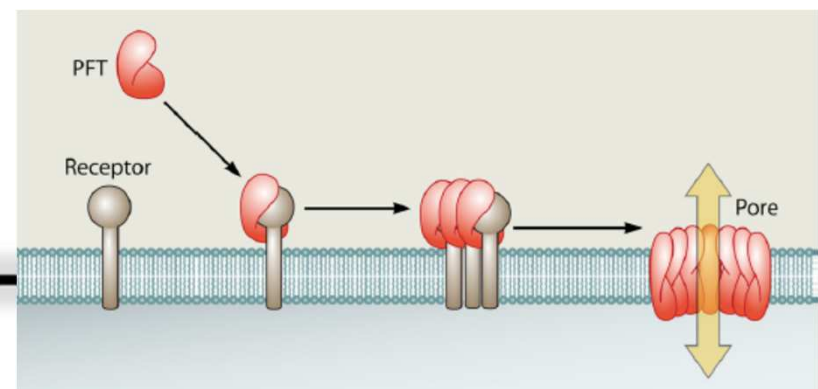
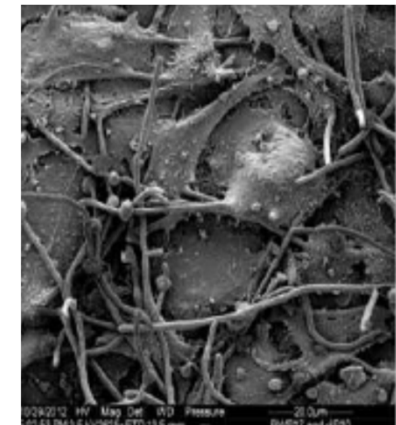
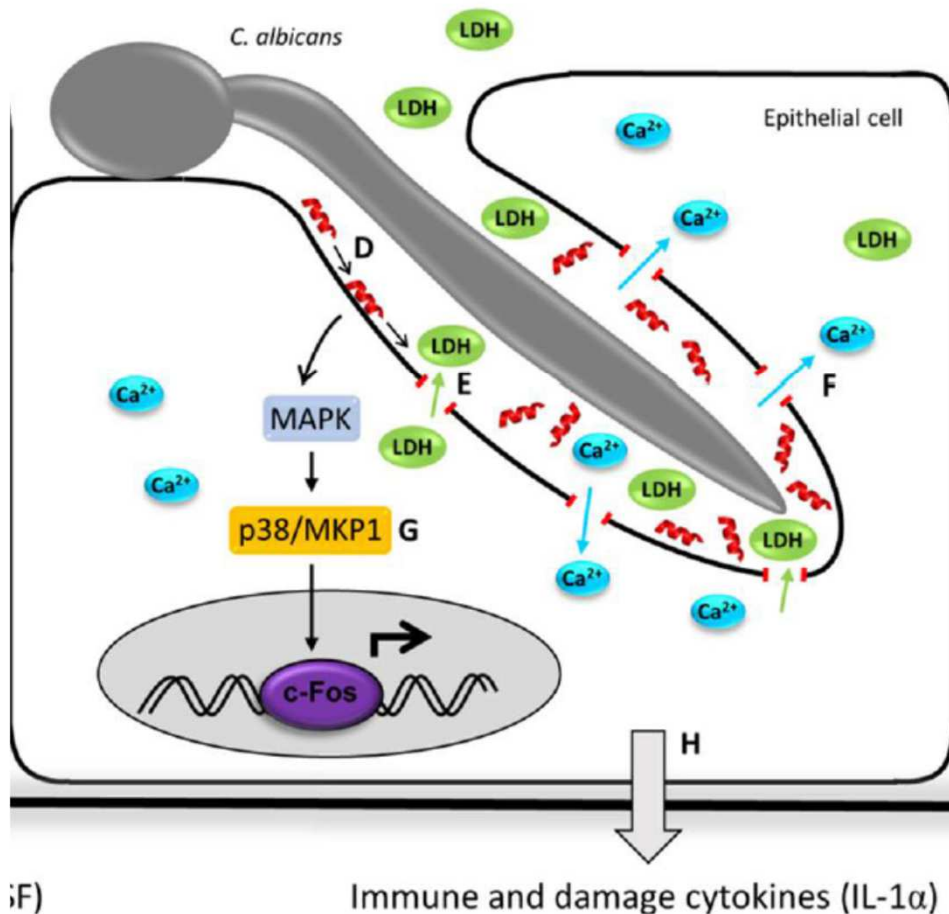
Pseudohyfy, adhesiny ... a candidalysin

Kvasinky *C. albicans* jsou schopny se přichytit k epiteliálním buňkám hostitele (pomocí adhesinů – Hwp1) – invasiny (Als3 a Ssa3 mohou interagovat s receptory) se podílí na vnoření pseudohyfy do buněčné membrány hostitele – Ece1 je rozštěpen Kex2/Kex1 proteasami na peptidy (Golgi), které jsou sekretovány a vytváří (peptid III) póry v cytoplasmatické membráně (jako bakteriální toxiny)



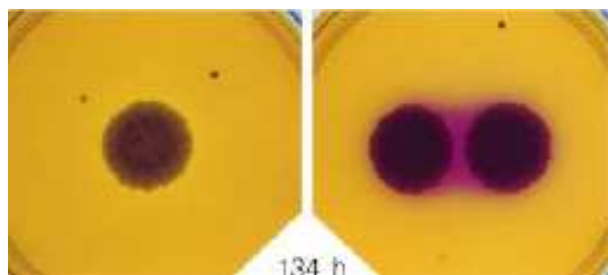
Pseudohyfy, adhesiny ... a candidalysin

Kvasinky *C. albicans* jsou schopny se přichytit k epiteliálním buňkám hostitele (pomocí adhesinů – Hwp1) – invasiny (Als3 a Ssa3 mohou interagovat s receptory) se podílí na vnoření pseudohyfy do buněčné membrány hostitele – Ece1 je rozštěpen Kex2/Kex1 proteasami na peptidy (Golgi), které jsou sekretovány a vytváří (peptid III) póry v cytoplasmatické membráně (jako bakteriální toxiny)

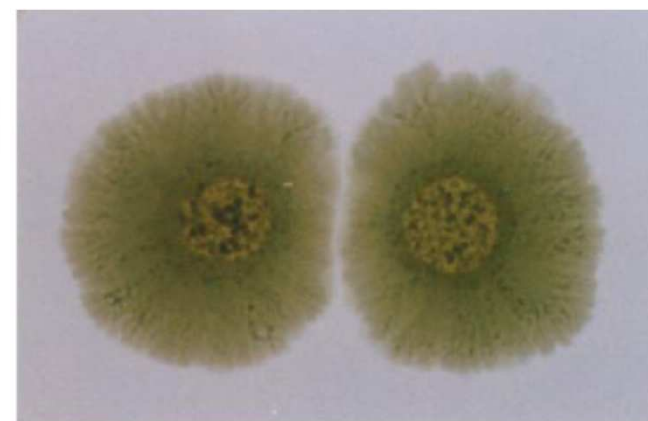
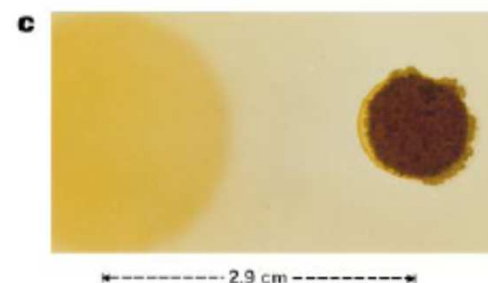
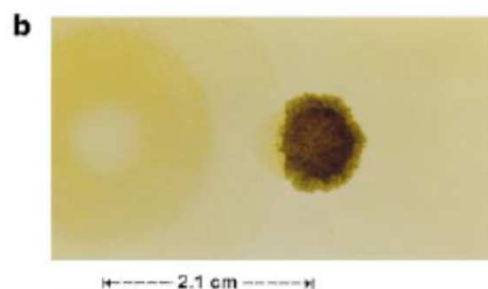
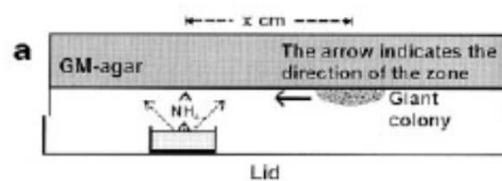


Komunikace kolonií

Kvasinkové kolonie spolu „komunikují“ (i bez dotyku) pomocí amoniaku – inhibuje růst sousední kolonie (kolonie *S. cerevisiae* produkují amoniak po 10 dnech růstu)



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



kolonie přesměrovává růst
sousední kolonie –
nekompetují o živiny -

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 (výhoda pro vinaře – nepřerostou je cizorodé kmeny)
- Poprvé analyzováno v roce 1963 (Makower a Bevan) kvasinky zabíjí podkladový kmen (K1=laboratorní, K2 a K3=vinařské kvasinky)
- Kvasinky ze stejné skupiny se navzájem nezabíjí (preprotoxin ...)
- Geny jsou kódovány na dsRNA obalené ve „virus-like particles“ (VLP, připomínají savčí dsRNA viry) – kódují obalové, replikační proteiny (ale potřebují buňku k replikaci ...), transkripční sekvence a toxin
- Samotné VLP nejsou infekční (nejsou uvolňovány z buněk - lze je přenést konjugací buněk nebo fúzí protoplastů) ani toxické (preprotoxin v původní buňce interaguje/inaktivuje maturované/sekretované toxiny)
- 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. orchraceus</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.*)

Souhrn 2. přednášky

- Kvasinky patří mezi houby (asco- a basidiomycety)
- Podmínky růstu – determinují morfologii/buněčný program
- Morfologie buněk a kolonií
- Killer ... toxiny