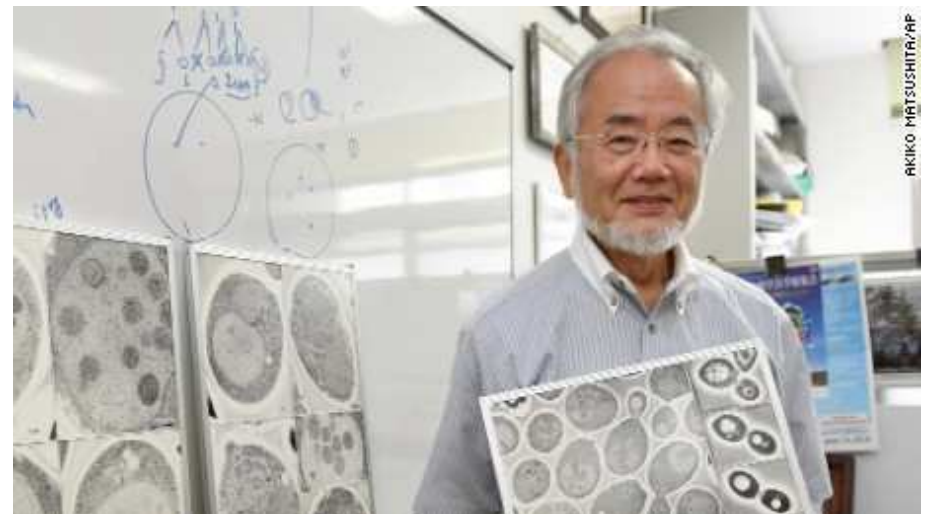


21.09.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Úvod – historie, význam
28.09.2017				volno
05.10.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Základní charakteristiky kvasinek
12.10.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Diagnostické a molekulárně biologické metody
19.10.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Genetika kvasinkových organismů
26.10.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Morfologie a buněčný cyklus, párovací proces,
02.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Protoplasty kvasinek jako modelový objekt
09.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Struktura kvasinkové buňky, sekreční dráhy a endocytóza
16.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	prof. Svoboda	Patogenní kvasinky, morfologická charakteristika, medicínské aspekty
23.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Regulace transkripce, 1-2-3 hybridní systémy, reporter systémy
30.11.2017	10-11.30hod	A2-2.11	Doc. Paleček	Organizace kvasinkového chromatinu a evoluce
07.12.2017	9-12hod	A2-2.11	Doc. Paleček	test + předtermín zkoušky
14.12.2017	8-12hod	A7-2.17	Svoboda+Paleček	Cvičení k přednáškám

# Osnova přednášky

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



# Bakterie x kvasinka

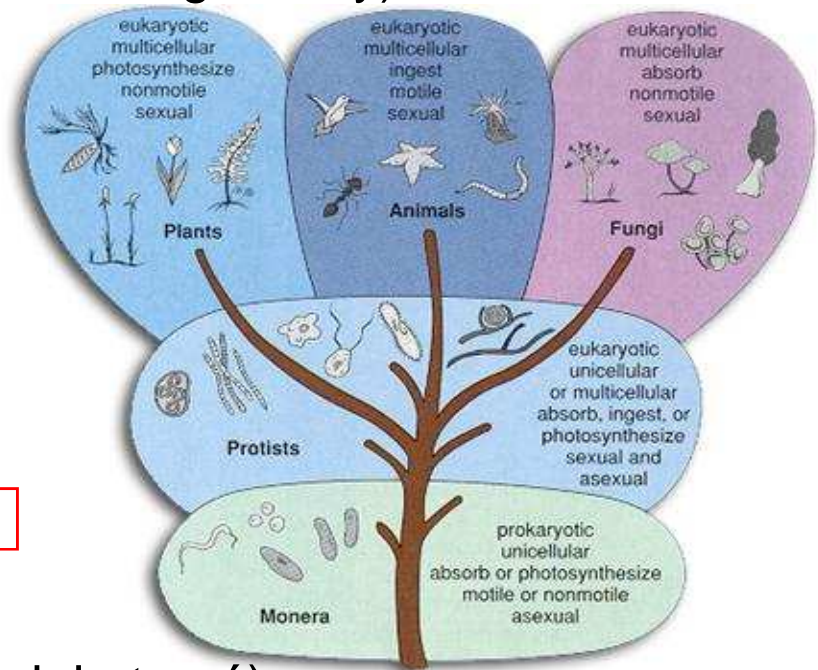
	<b>Bakterie</b>	<b>Kvasinka</b>
<b>Četnost v lidské mikrofloře</b>	99%	<1%
<b>Velikost buňky</b>	1um	10um
<b>Buněčná stěna</b>	peptidoglykan, LPS, LTA	chitin, mannan PPM, PLM, glukan
<b>pH</b>	6,5-7,5	4,5-6,5
<b>Teplota</b>	10-80	20-30
<b>Rezistence na antibiotika</b>	Ne	Ano
<b>Přenos genetického materiálu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

- 1500 identifikovaných (odhad o několik řádů vyšší)



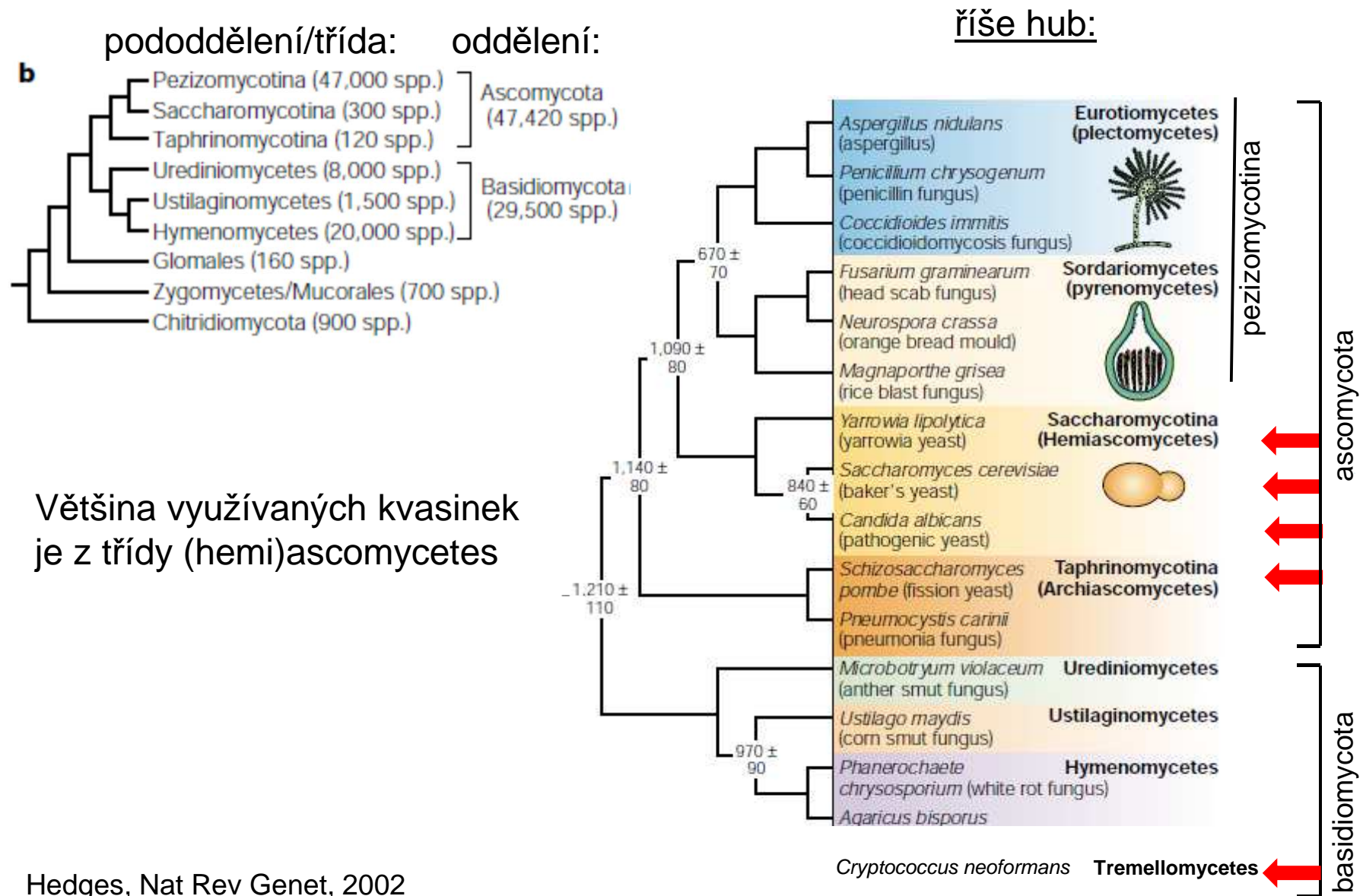
## **Saccharomyces cerevisiae:**

- 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

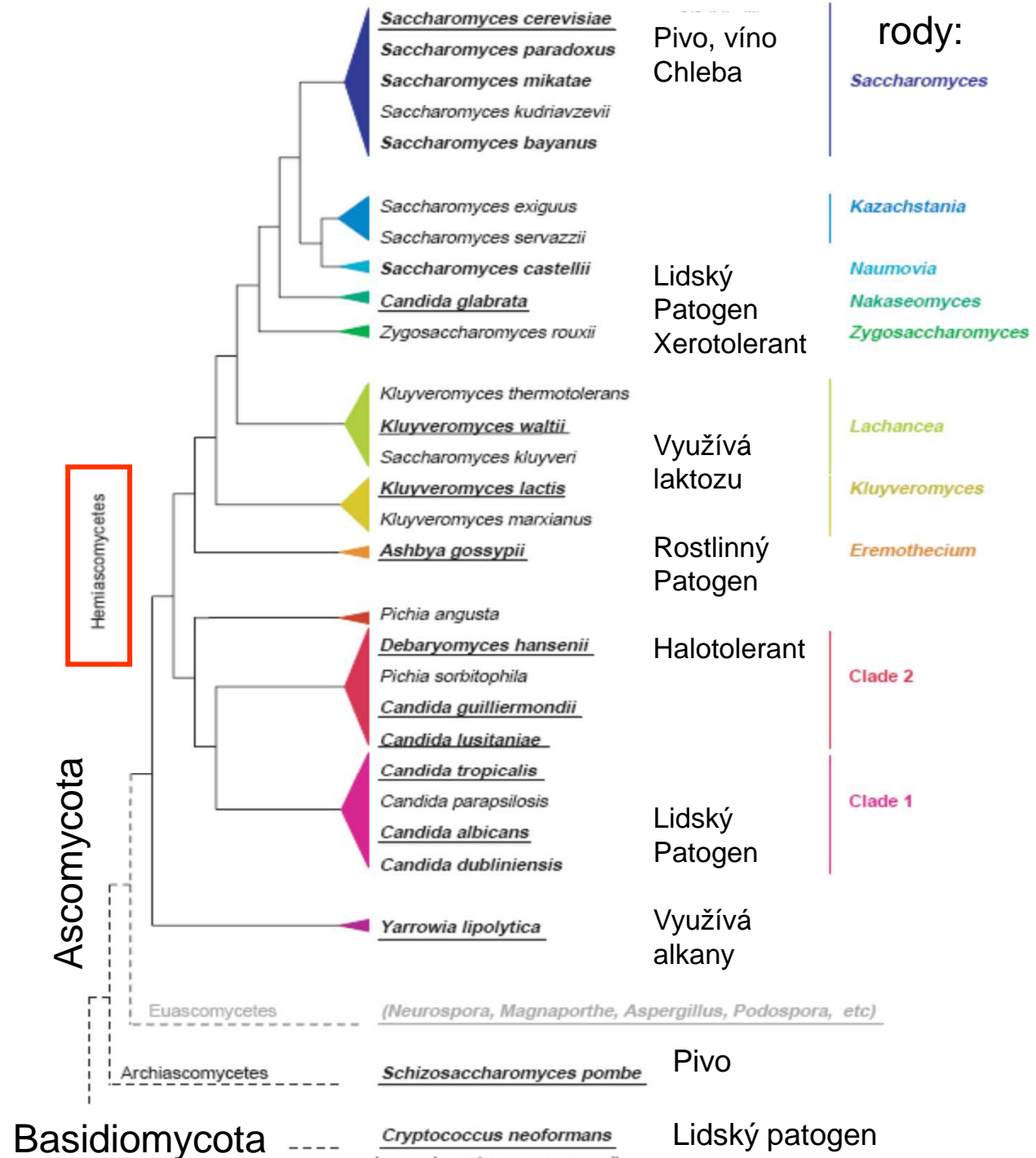
Kvasinky netvoří žádnou přirozenou taxonomickou skupinu - jsou roztroušeny ve dvou odděleních hub, buď jako houby vřeckovýtrusné nebo stopkovýtrusné



# Taxonomie kvasinek

Většina využívaných kvasinek je z třídy (hemi)ascomycetes

mezidruhová vzdálenost

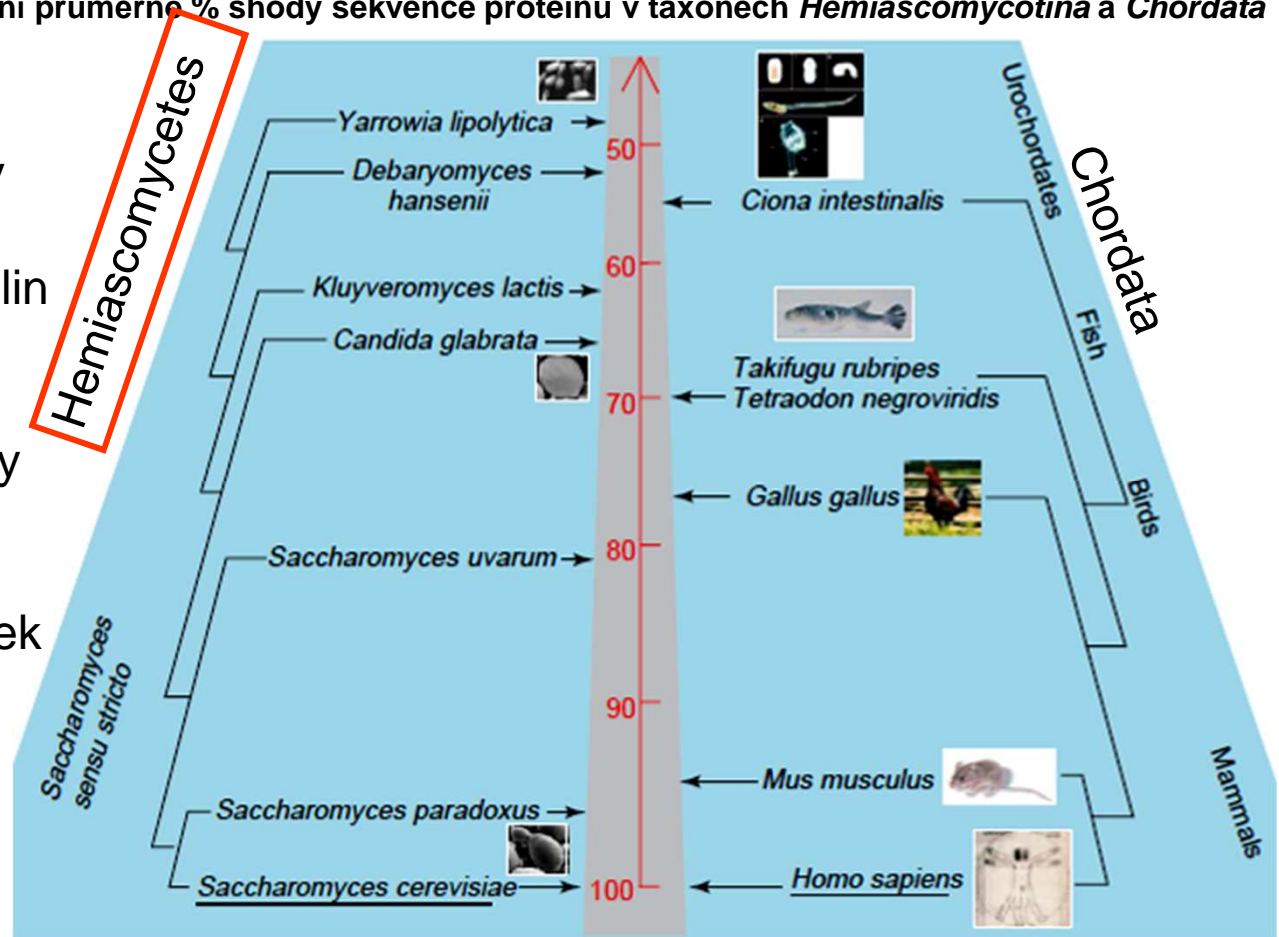


TRENDS in Genetics 22 (2006)

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 (*Saccharomces 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 - neprodukuje 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*)
  - **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 S.c. je glukóza (**represe ostatních**)
- Zdrojem dusíku jsou amonné ionty a aminokyseliny

Laboratorní podmínky:

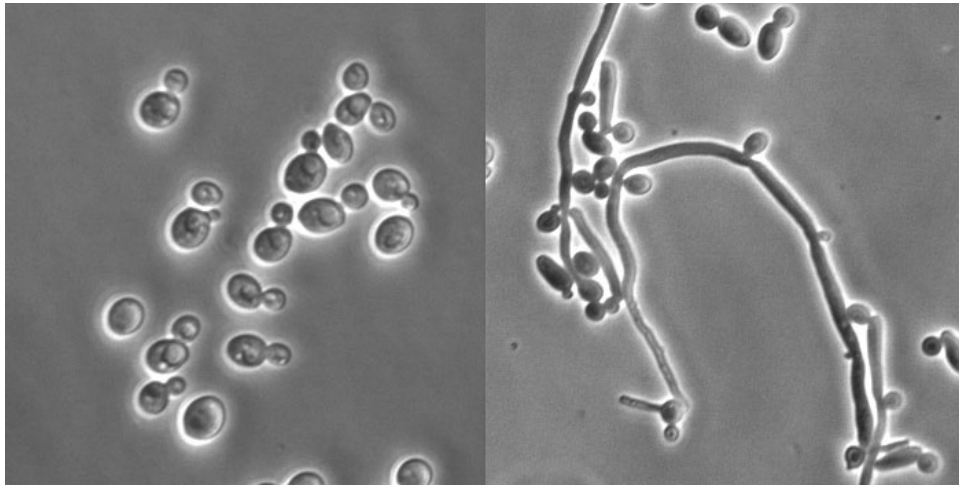
YPD/YES – bohaté médium = 10g/l yeast extract, 20g/l pepton, 20g/l dextrose (2%glukosa)/u *S.pombe* supplements: A, U, H, L, K

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

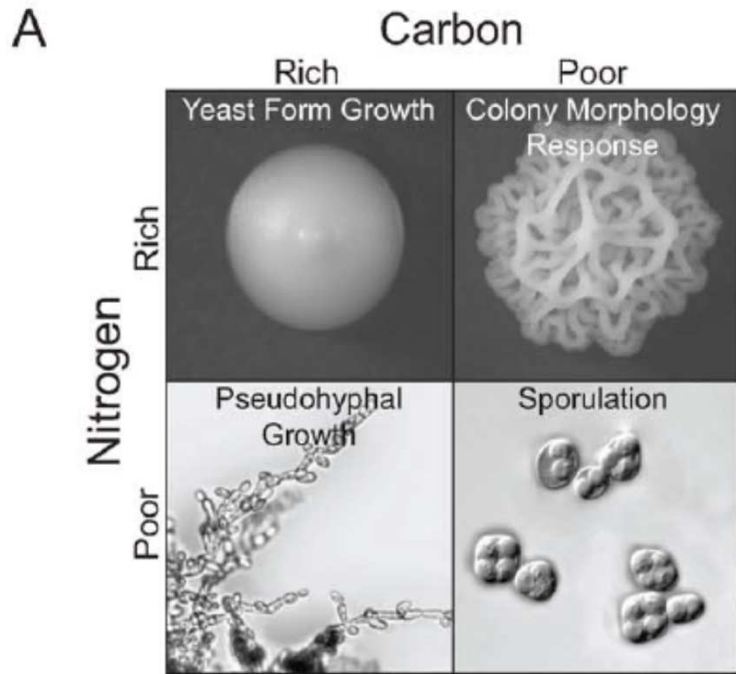
Syntetické SD médium = 6.7g/l yeast nitrogen base w/o amino acids (aminokyseliny se přidávají dle potřeby), 20g/l dextrose (2% glukosa) – např. SD-L,T pro Y2H systém

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

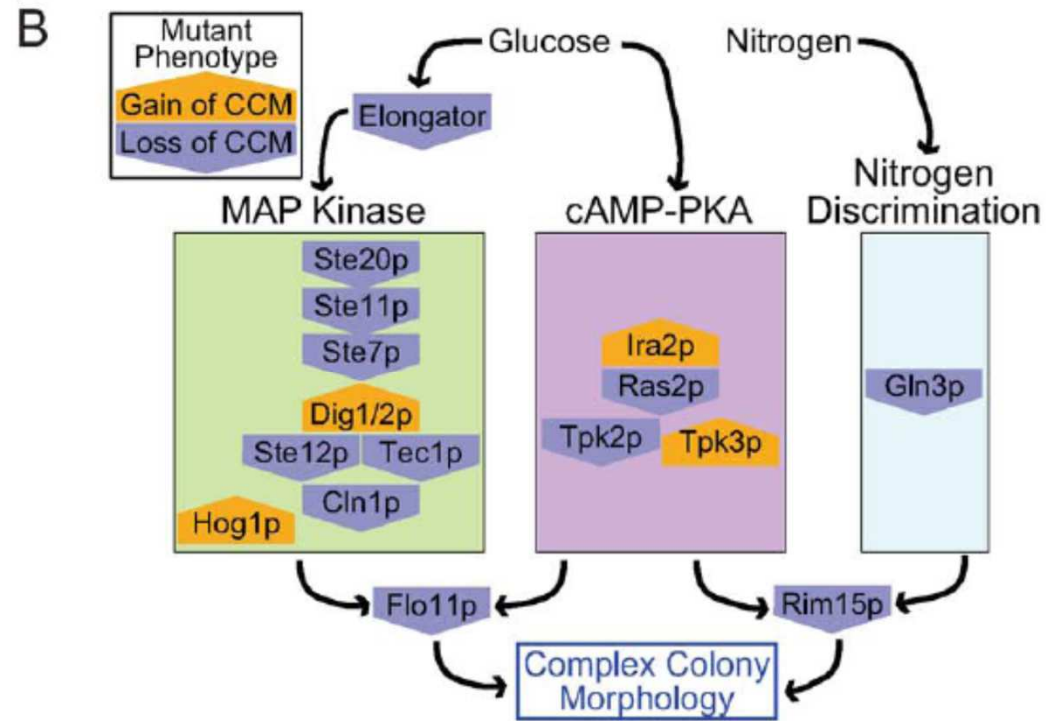
Wickerhamův roztok: 0.2mg biotin, 200mg inositol, 20mg riboflavin, 40mg thiamin, 40mg pyridoxin, 20mg kyselina p-aminobenzoová, 40mg kyselina nikotinová, 0,2mg kyselina listová (na 100ml vody)



- 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 drahami



Sporulace/meiosa



Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

# Kvasinková forma - morfologie

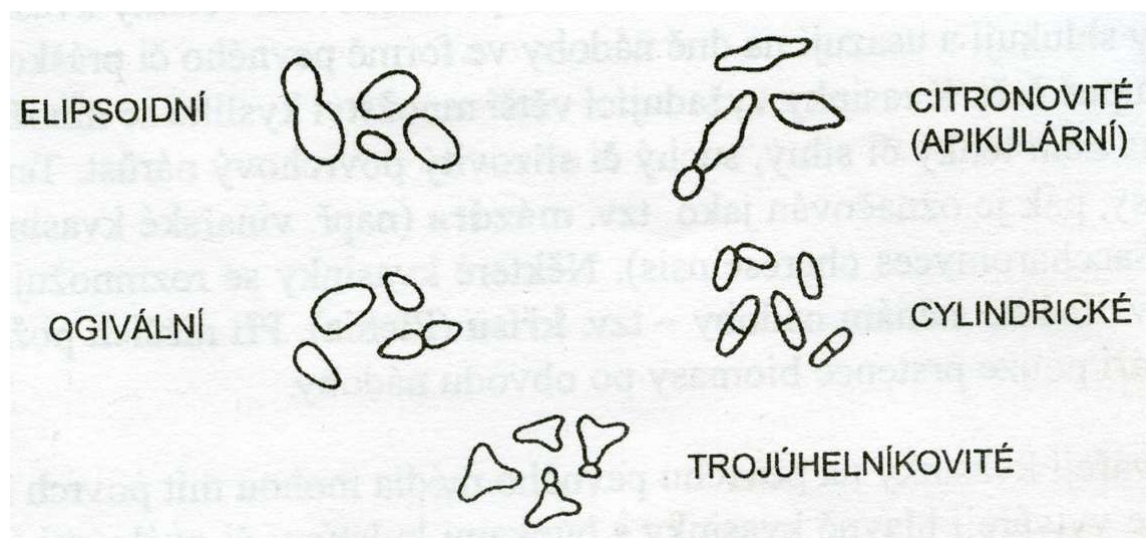
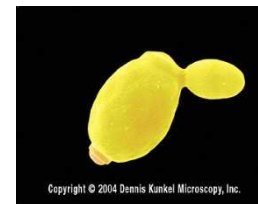
- za běžných podmínek (bohaté C i N zdroje) převládá kvasinková f.
- rotační elipsoid, kulaté, protáhlé – rod *Dipodascus* až 130 mikrometrů
- 3-15 mikrometrů (bakterie < kvasinky < savčí buňky)
- u jednoho druhu (haploidní < diploidní < polyploidní)

<https://vimeo.com/14316828>



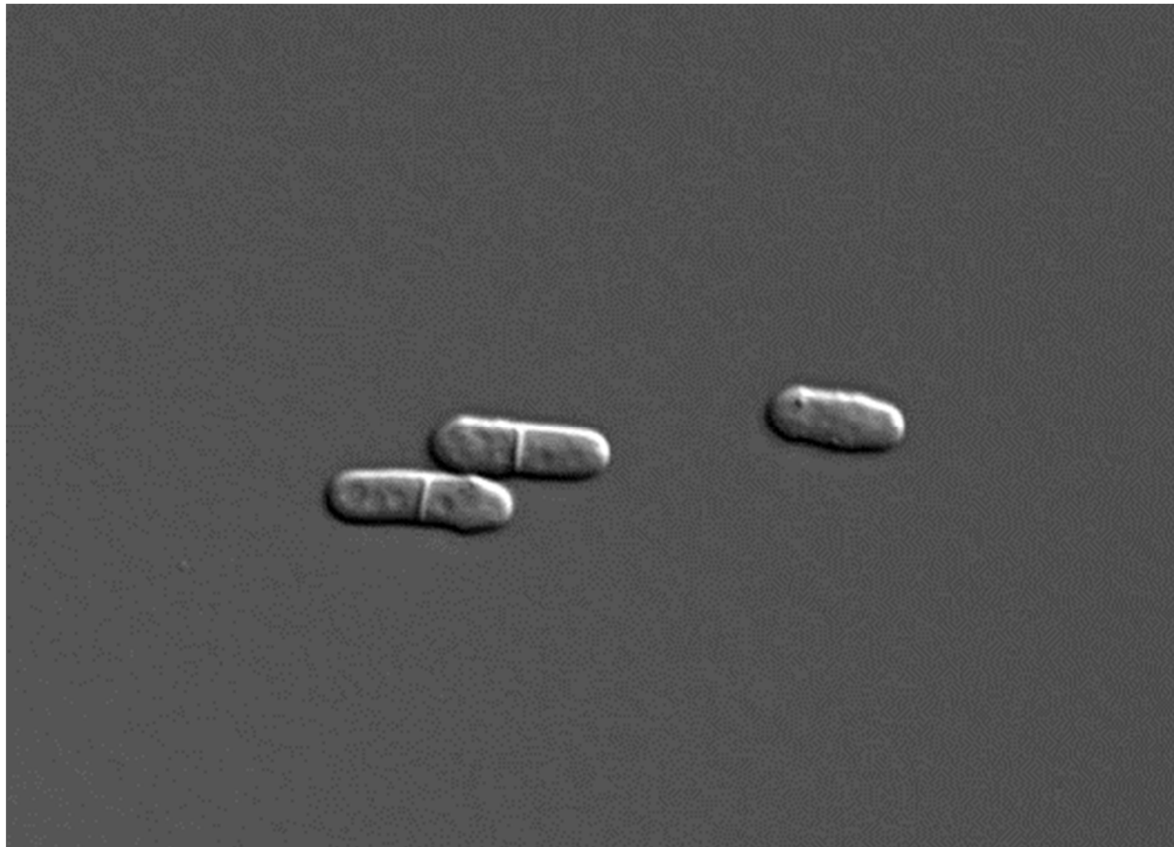
# Kvasinková forma - morfologie

- 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), zvláštní tvar má za některých kultivačních podmínek rod *Trigonopsis*
  - *Schizosaccharomces* přehrádečné dělení



# Kvasinková forma - morfologie

- *Schizosaccharomces* přehrádečné dělení

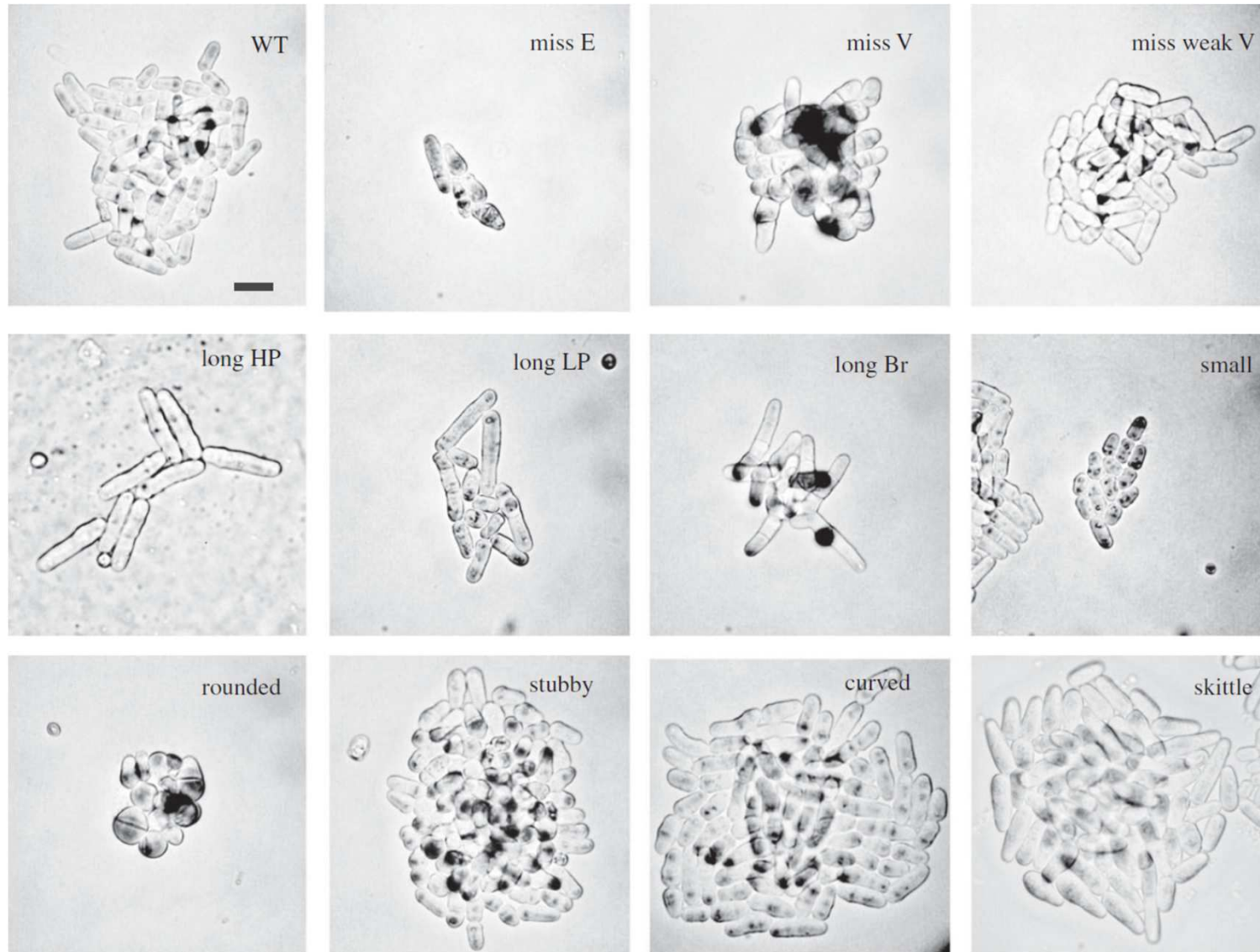


Hoffmann a spol, Genetics, 2015

<http://www.genetics.org/content/suppl/2015/10/02/201.2.403.DC1>

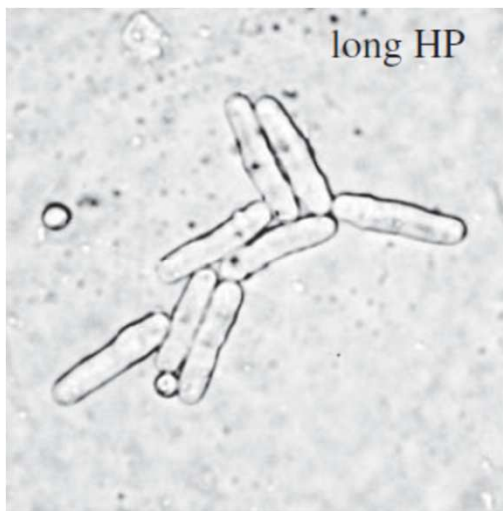
# Kvasinková forma - morfologie

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

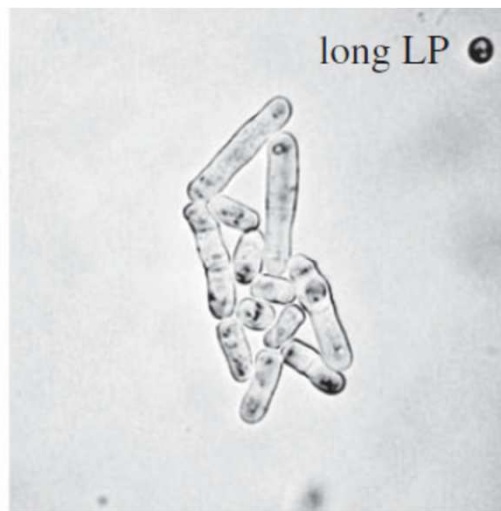


# Kvasinková forma - morfologie

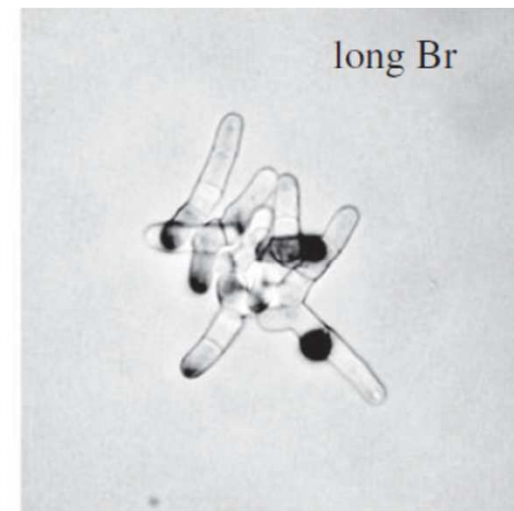
visuální analýza kvasinek deleční knihovny ~3500 kmenů (1. genome-wide)  
- např. delece genů regulujících buněčný cyklus *S. pombe* způsobovaly protažený tvar buněk (buňky pokračovaly v růstu, přestože byl buněčný cyklus/mitoza defektní – v důsledku delece genu x)



replikace & transkripce  
(spliceing, MCM,  
biogenese nukleotidů)



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



cytokinese & transkripce  
(RNA pol, mediator, SAGA)

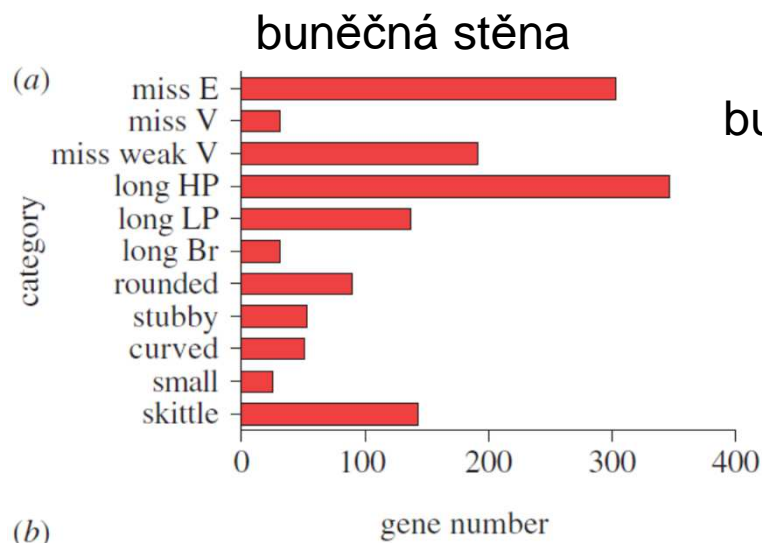
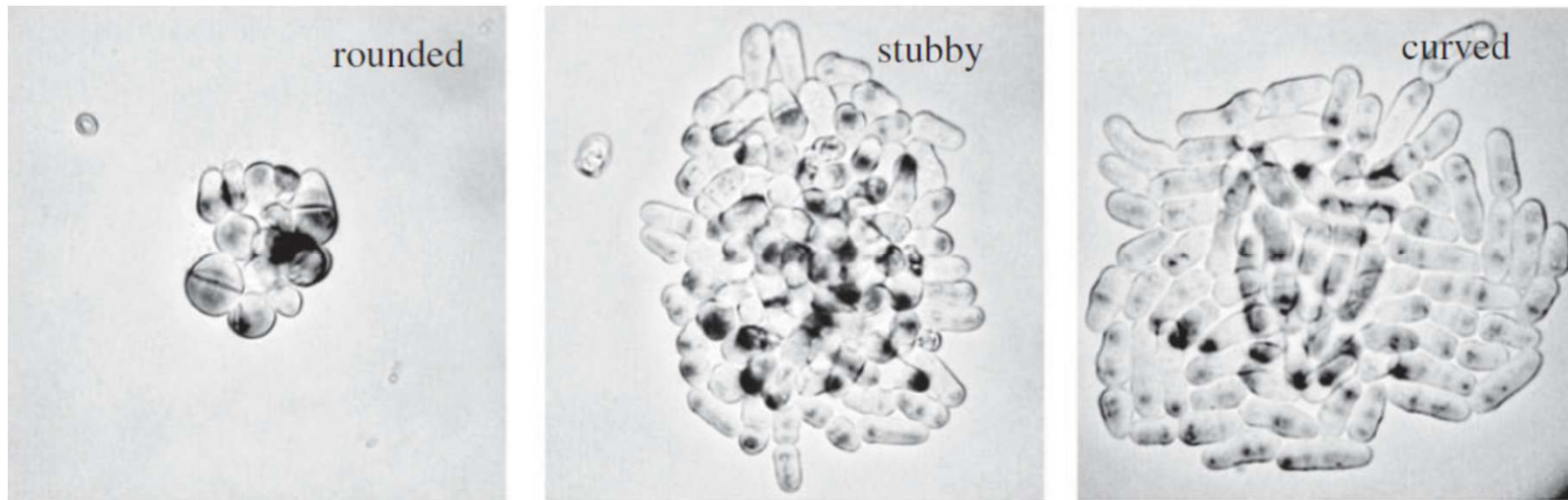
HP = high penetrance (>30% buněk v populaci)

LP = low penetrance (<30% buněk v populaci)



# 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

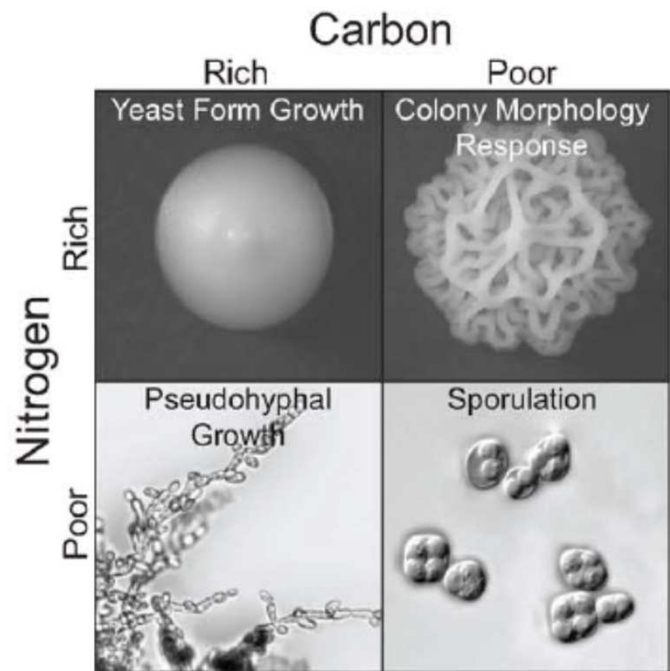


buněčná stěna a aktin  
 krátké/tlusté

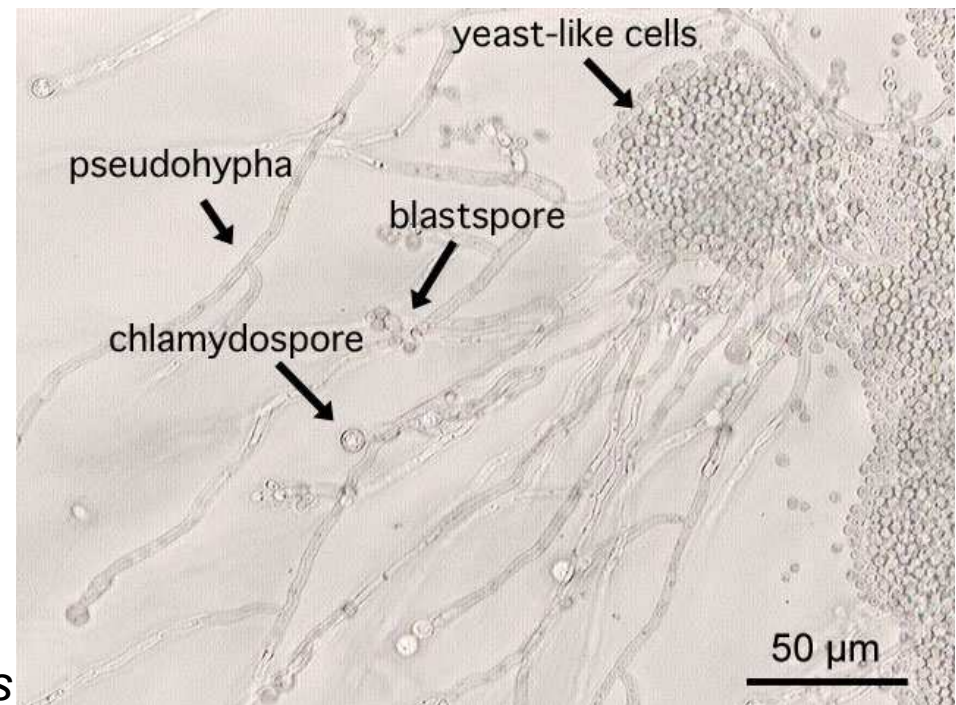
mikrotubuly

# Pseudohyfy ...

- při nedostatku dusíku se diploidní buňky protahují a vytváří **pseudohyfy/hyfy** – vrůstají do agaru
- unipolární pučení, mateřské a dceřiné buňky zůstávají spojené (úplná přepážka, neoddělí se dceřiné buňky x pravé hyfy mají přepážky průtočné)
- **chlamydo-spory** – kulaté, silnostěnné, na koncích nebo po stranách hyf – spory nevykazují tak vysokou odolnost jako u bakterií
- na koncích (i mezi buňkami) mohou vznikat **spory** (blastospory), které se dále množí pučením (odlišení *C. albicans* od *C. dubliniensis*)



*Candida albicans*



# Spory

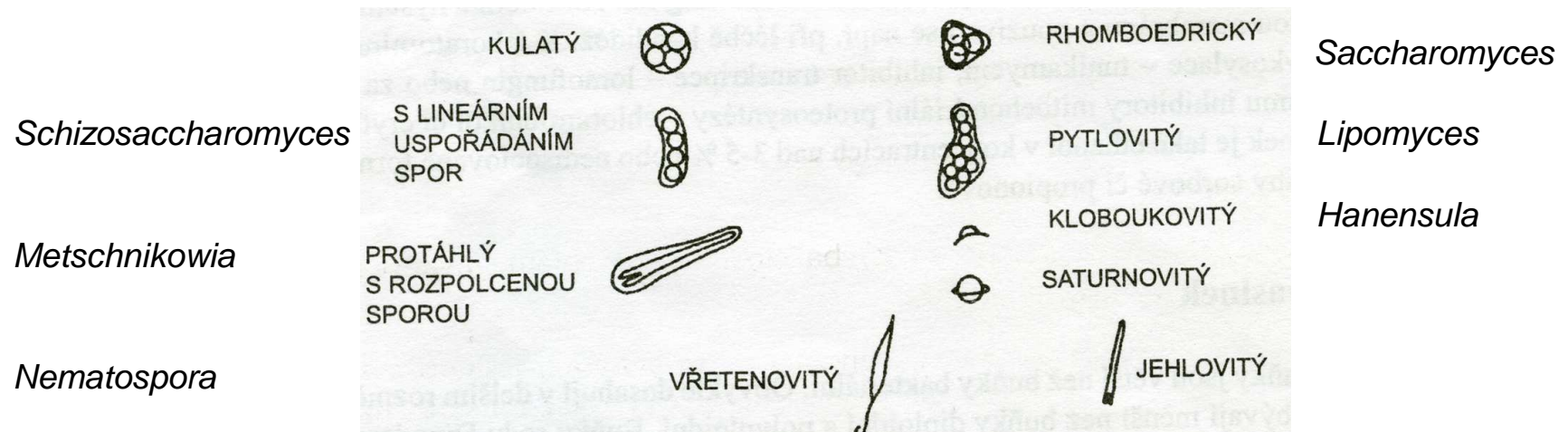
- při nedostatku dusíku v kombinaci s ne-fermentovatelným uhlíkatým zdrojem dochází k indukci meiosis a sporulace

*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)



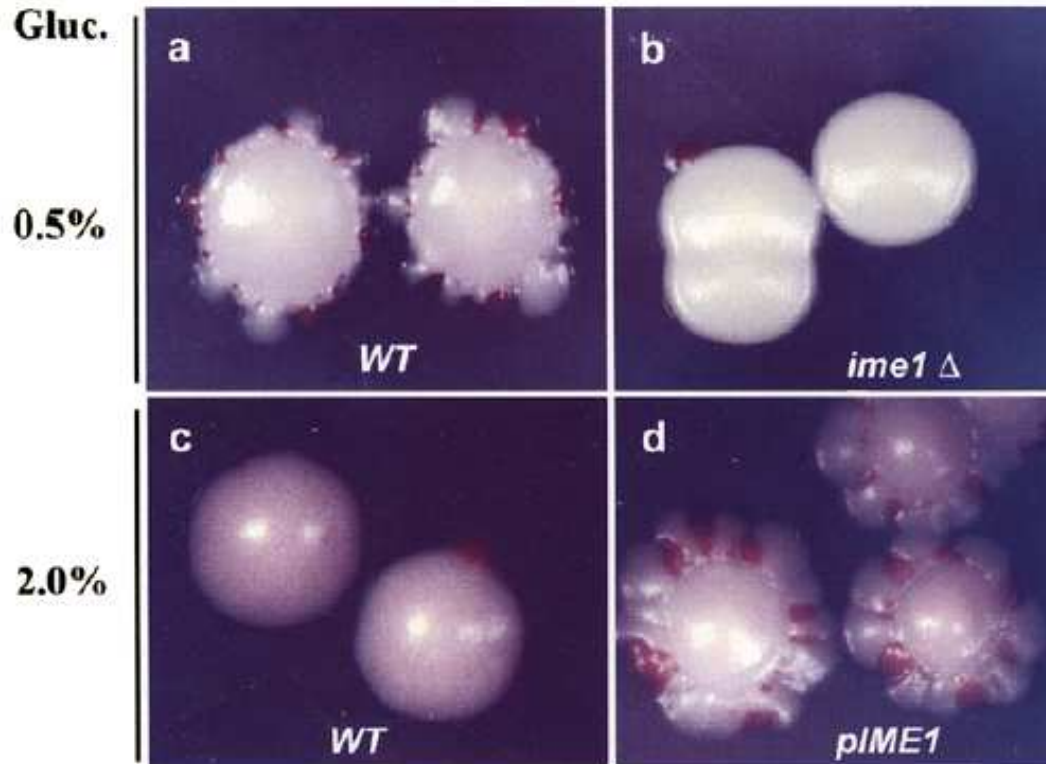
# Spory

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

<http://www.genetics.org/content/suppl/2015/10/02/201.2.403.DC1>



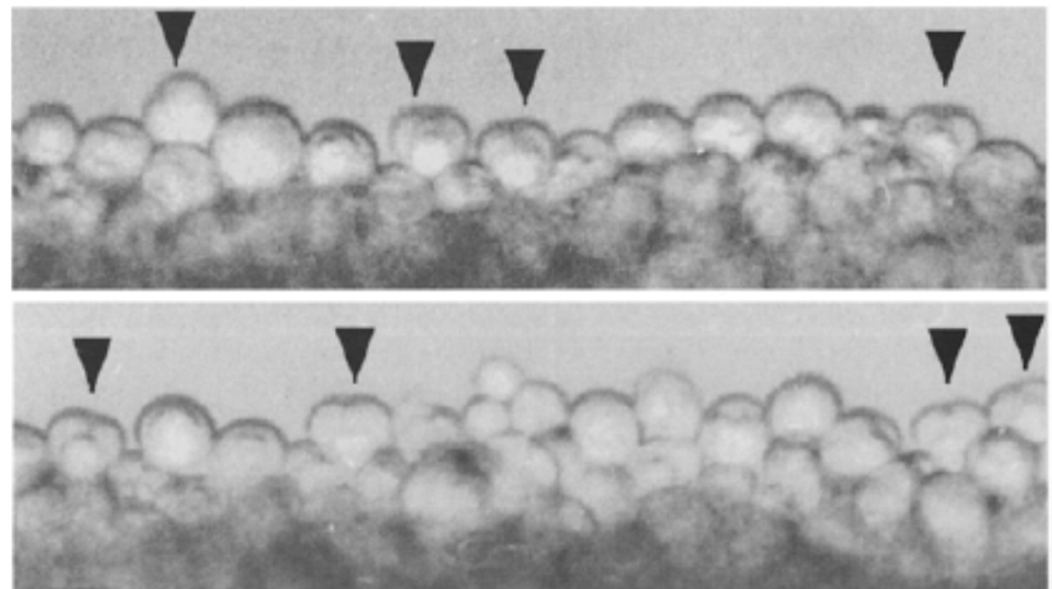
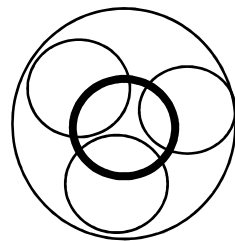
# Spory - kolonie



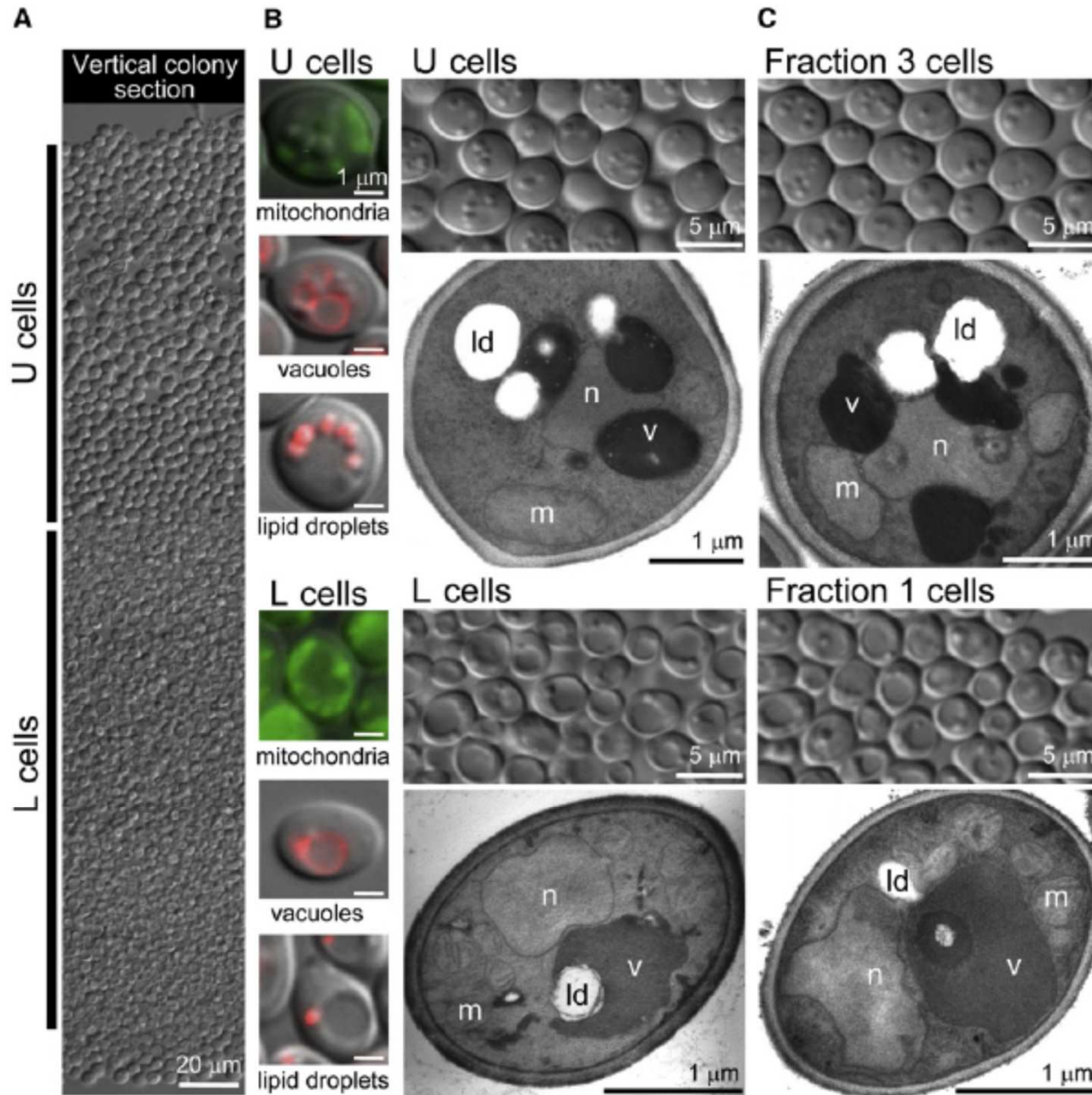
- při vyčerpání živin na misce mohou (krajní) buňky začít meiotické dělení (diploidní *S. cerevisiae*)
- meiosa je indukovaná *IME1* transkripčním faktorem (v *ime1Δ* se meiosa neindukuje vs. v *pIME1* overexprimovaných buňkách je indukována meiosa i bez vyčerpání živin tj. 2% glukosa)

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

šipky ukazují vřecka se čtyřmi sporama



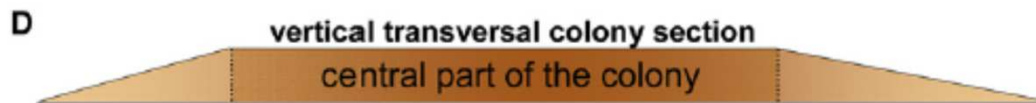
# kolonie



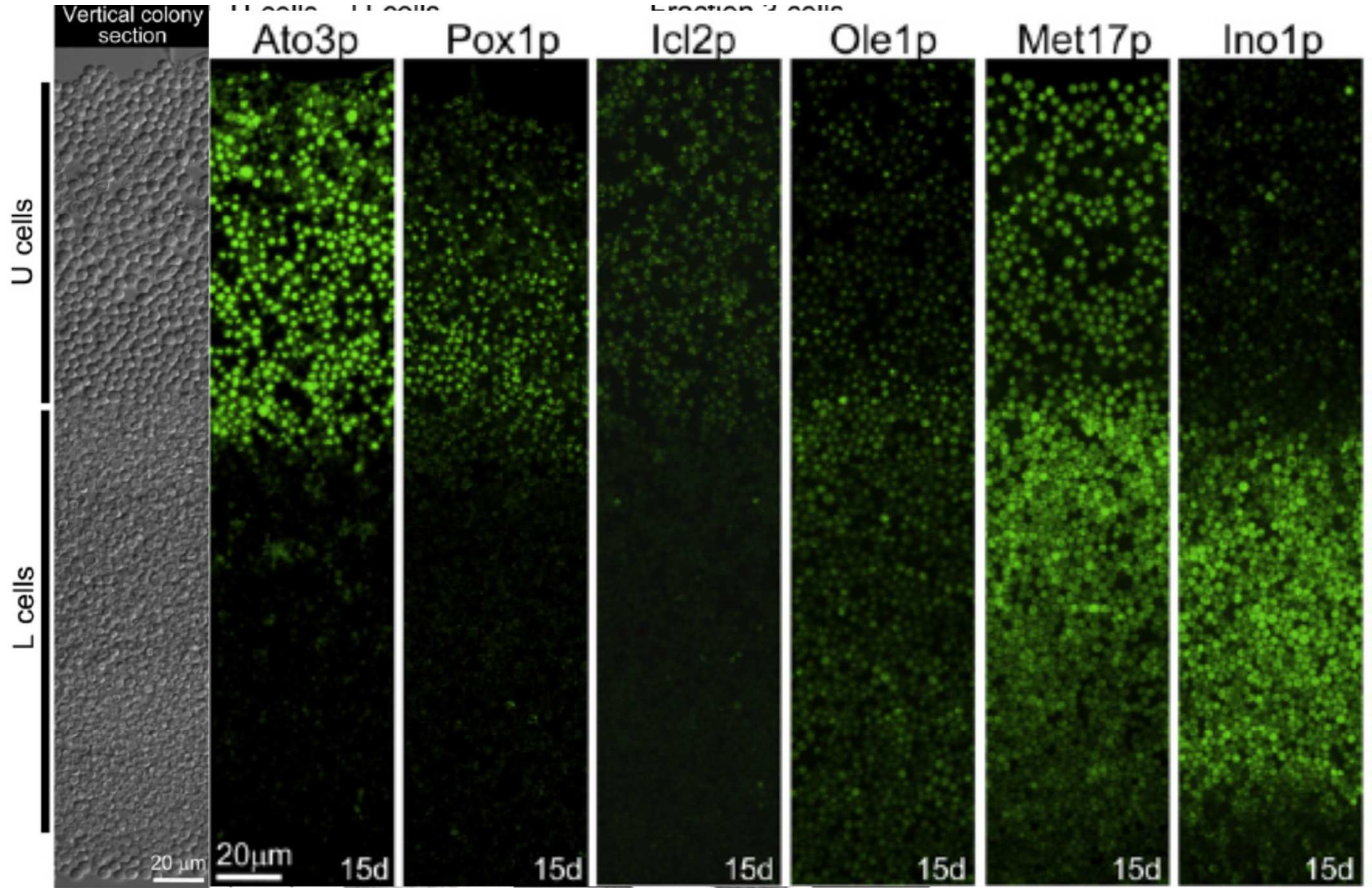
- větší buňky (4 $\mu\text{m}$ )
- malé mitochondrie a vakuoly
- více lipidových váčků

rozdíly jsou patrné i na expresní úrovni proteinů

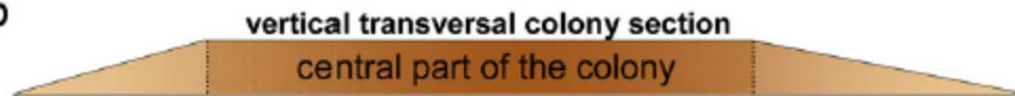
- menší buňky (3 $\mu\text{m}$ )
- velké mitochondrie i vakuoly (aktivnější respirace a více ROS)



rozdíly jsou patrné i na expresní úrovni proteinů

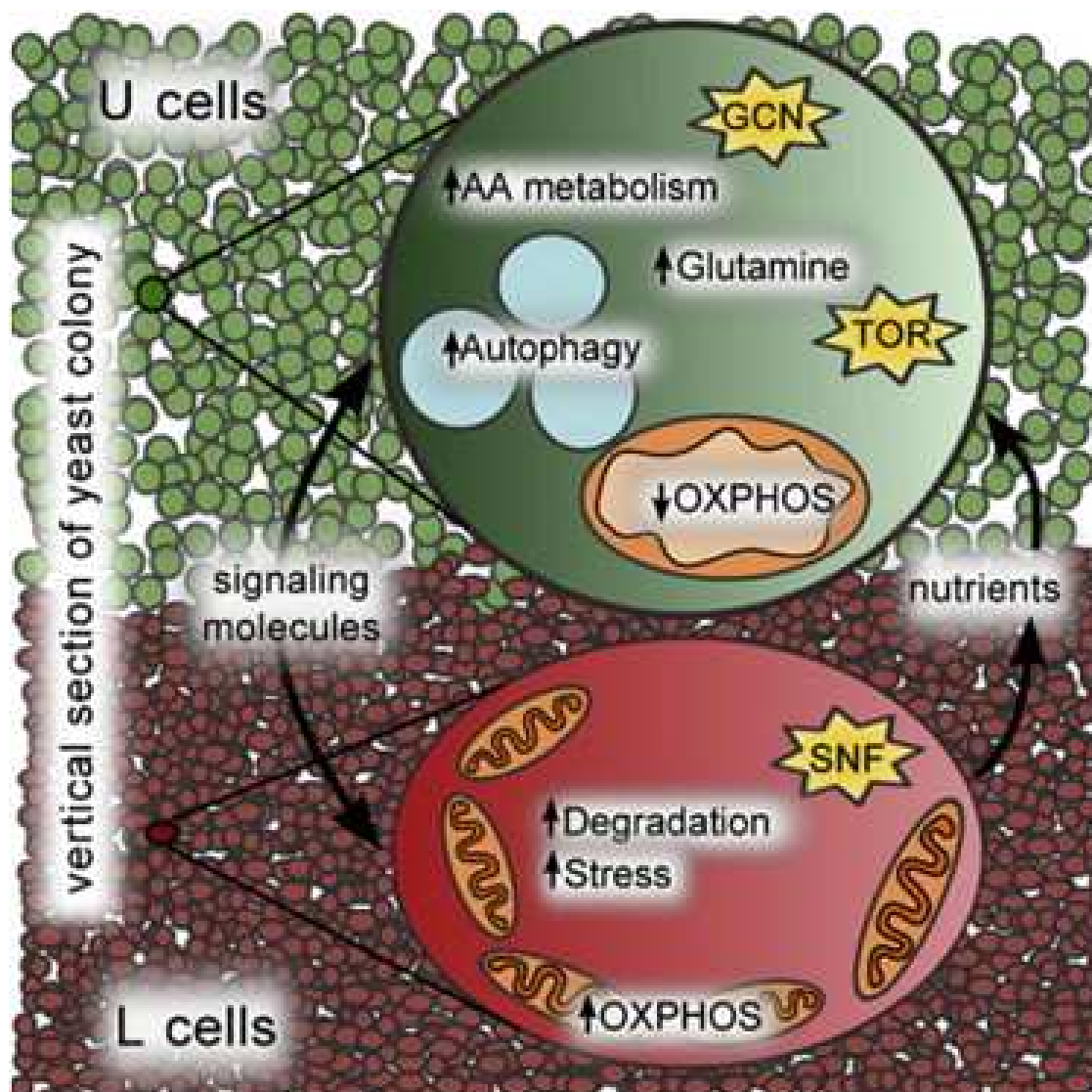


D



Čáp et al., Mol Cell, 2012

# Diferenciace *S.cerevisiae* v kolonii



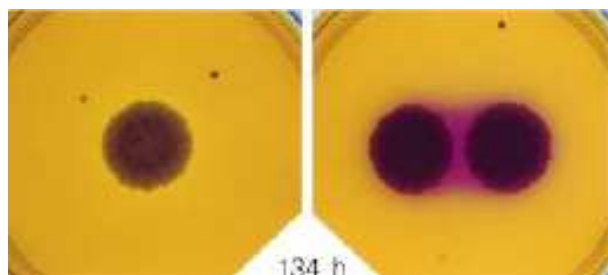
U (upper) buňky - aktivní glutaminem-indukovanou TOR dráhu, sníženou respiraci (málo mitochondrii), AMK-sensing systém (Gcn4) a vyšší „turnover“ AMK (souvisí s produkcí amoniaku), produkují amoniak pro komunikaci kolonii - využívají živiny uvolněné z L buněk (autofagie) - jsou odolnější vůči stresu –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

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

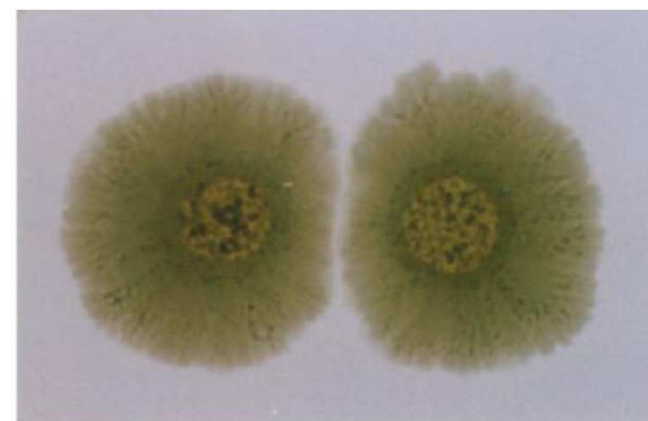
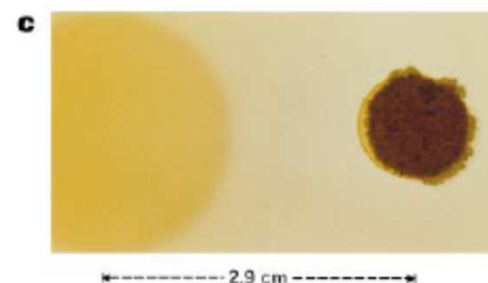
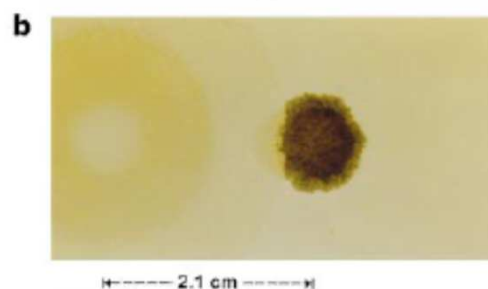
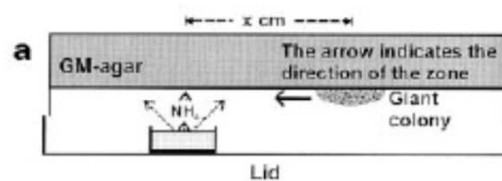


# Komunikace kolonií

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

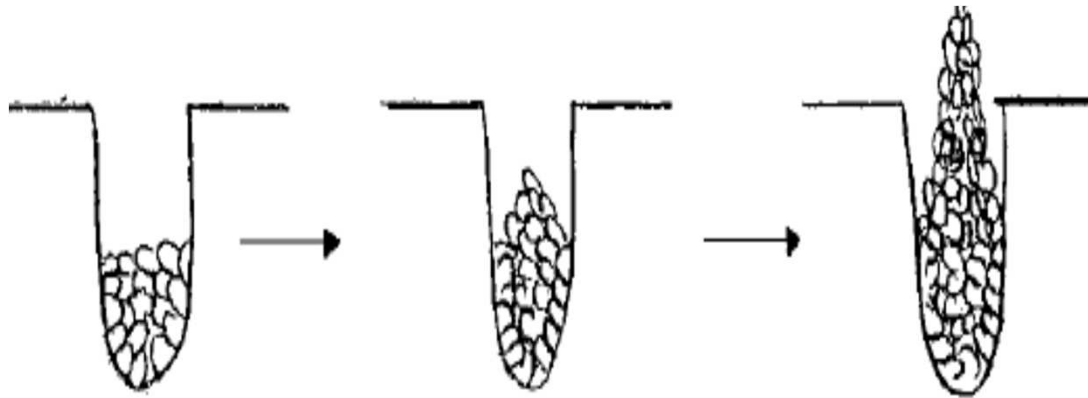


Aktivní inhibice růstu  
sousední kolonie nikoli  
(pasivní) důsledek  
spotřebování živiny



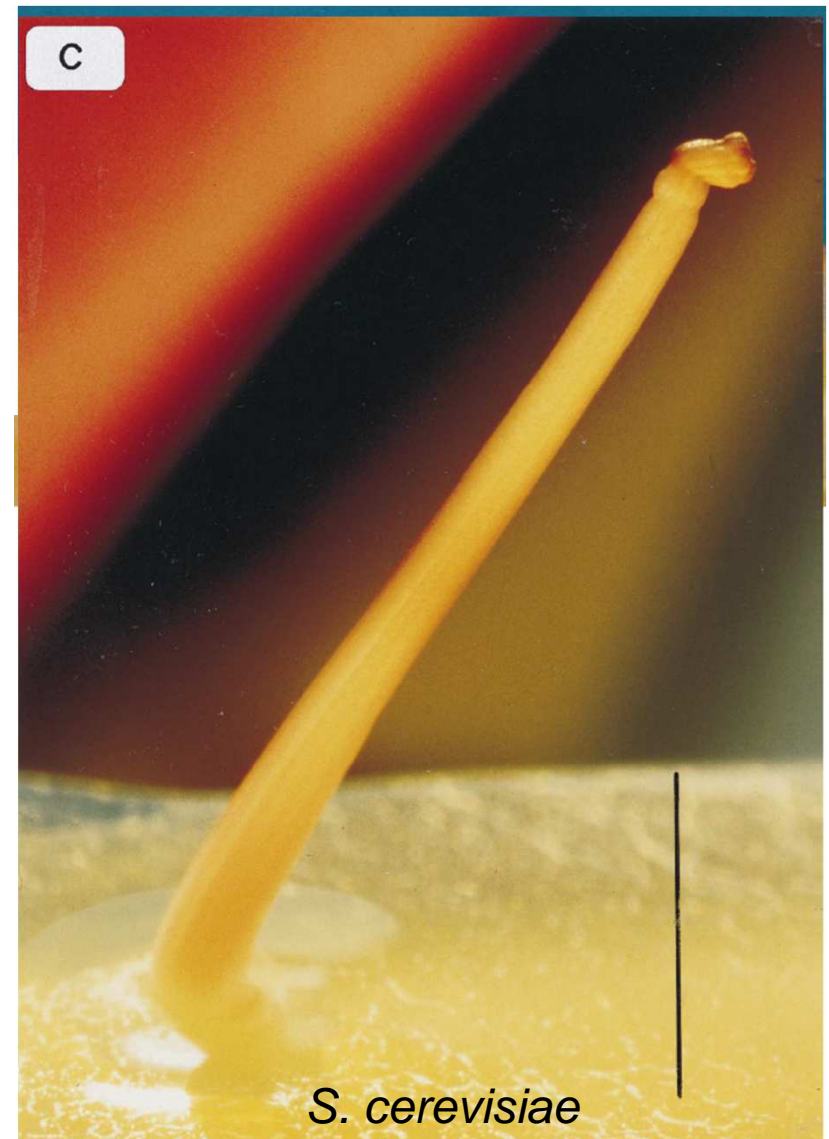
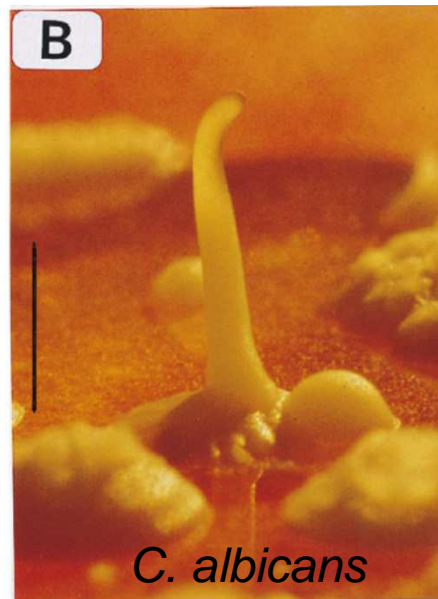
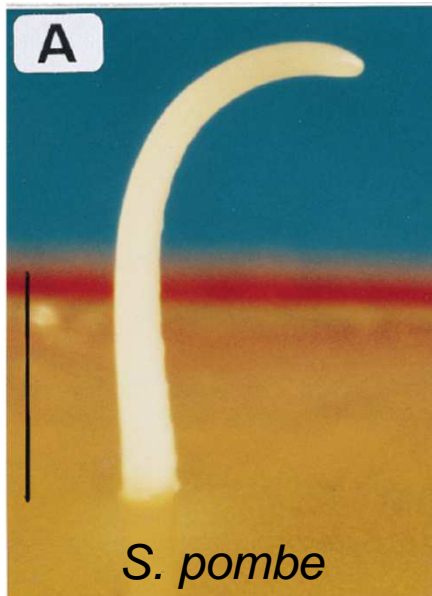
kolonie přesměrovává růst  
sousední kolonie –  
nekompetují o živiny -

- různé vývojové programy (formy) vedou k mnoho-buněčným strukturám (...**hyfy**)
- 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



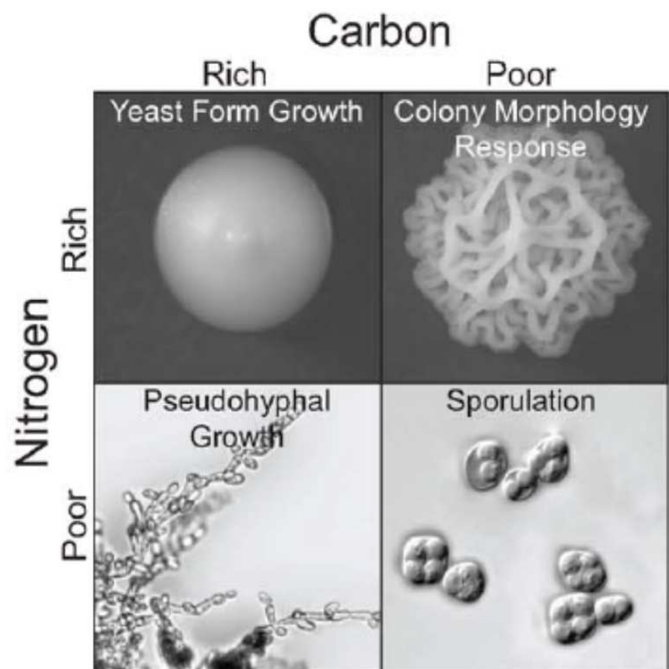
- buňky v jamkách jsou chráněny před UV, zatímco ty na povrchu jsou zabity

Engelberg a spol., J Bacter, 1998

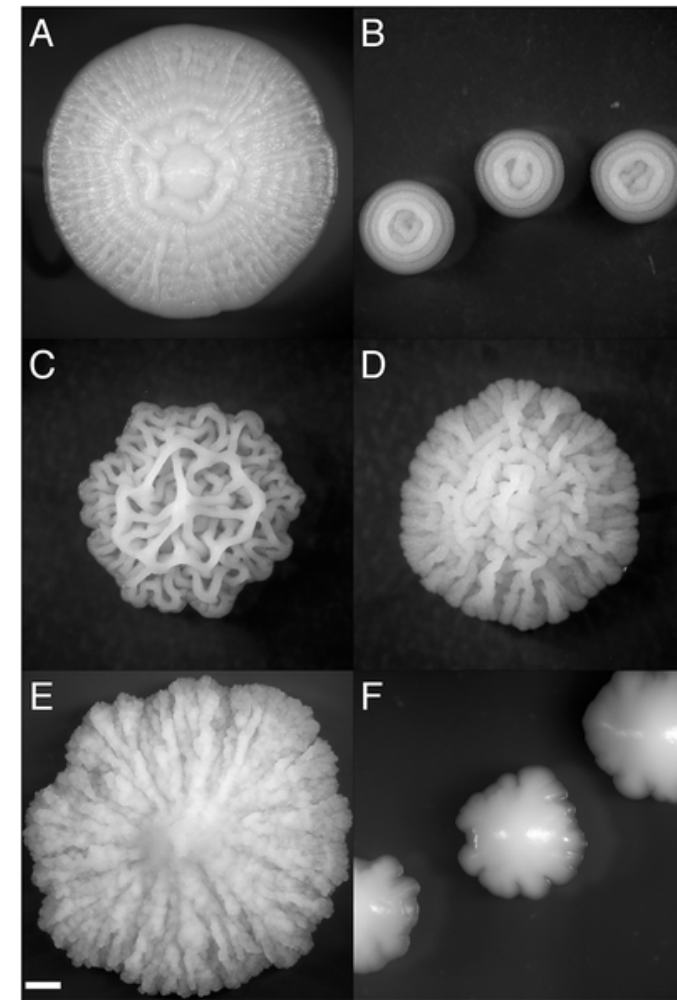


# Kolonie

- 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*)



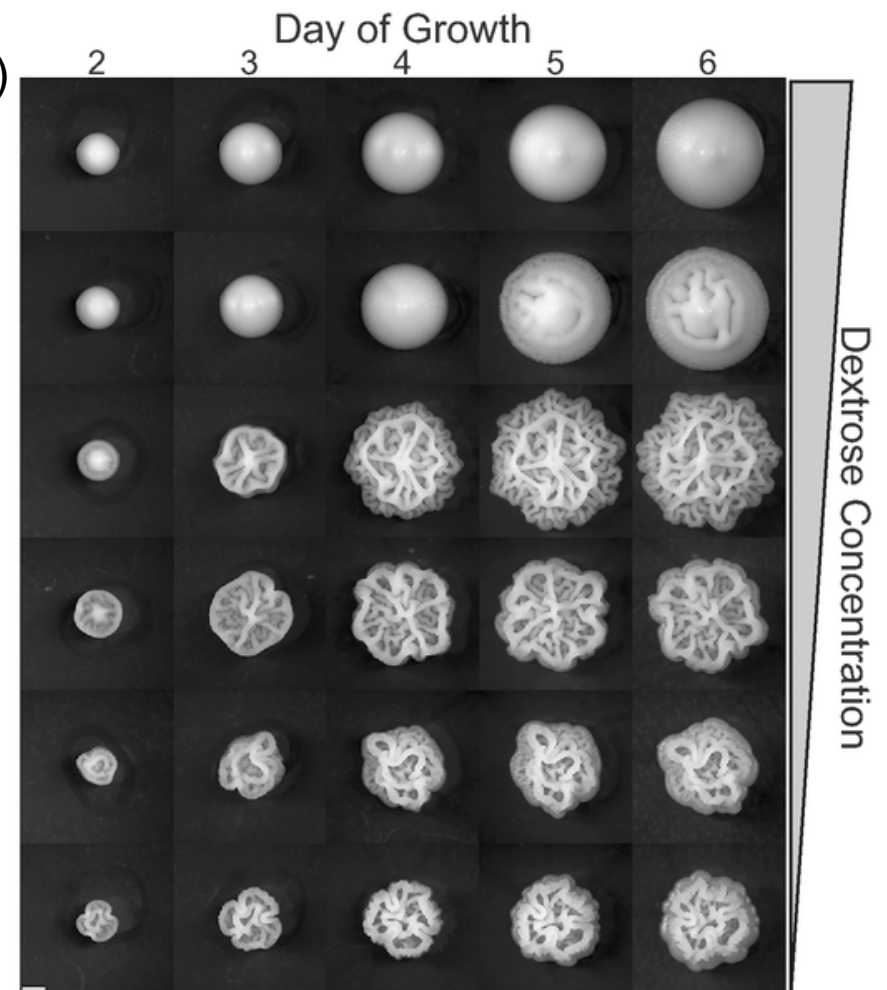
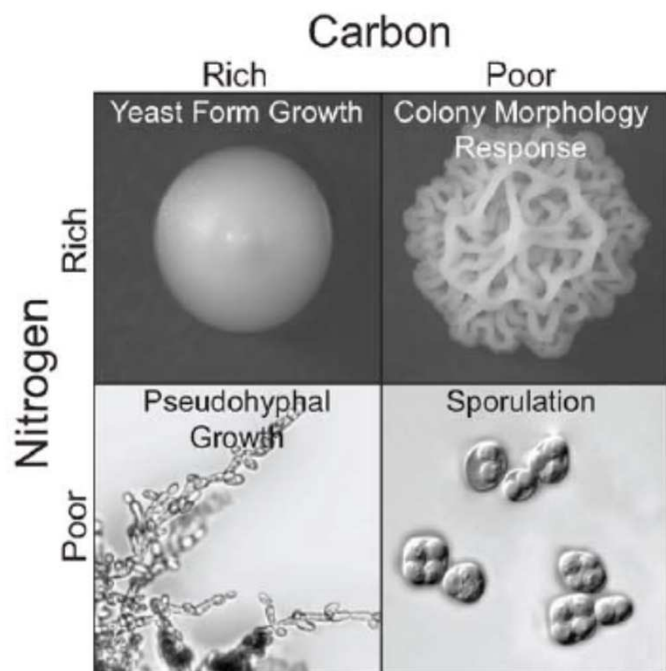
cvičení



Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

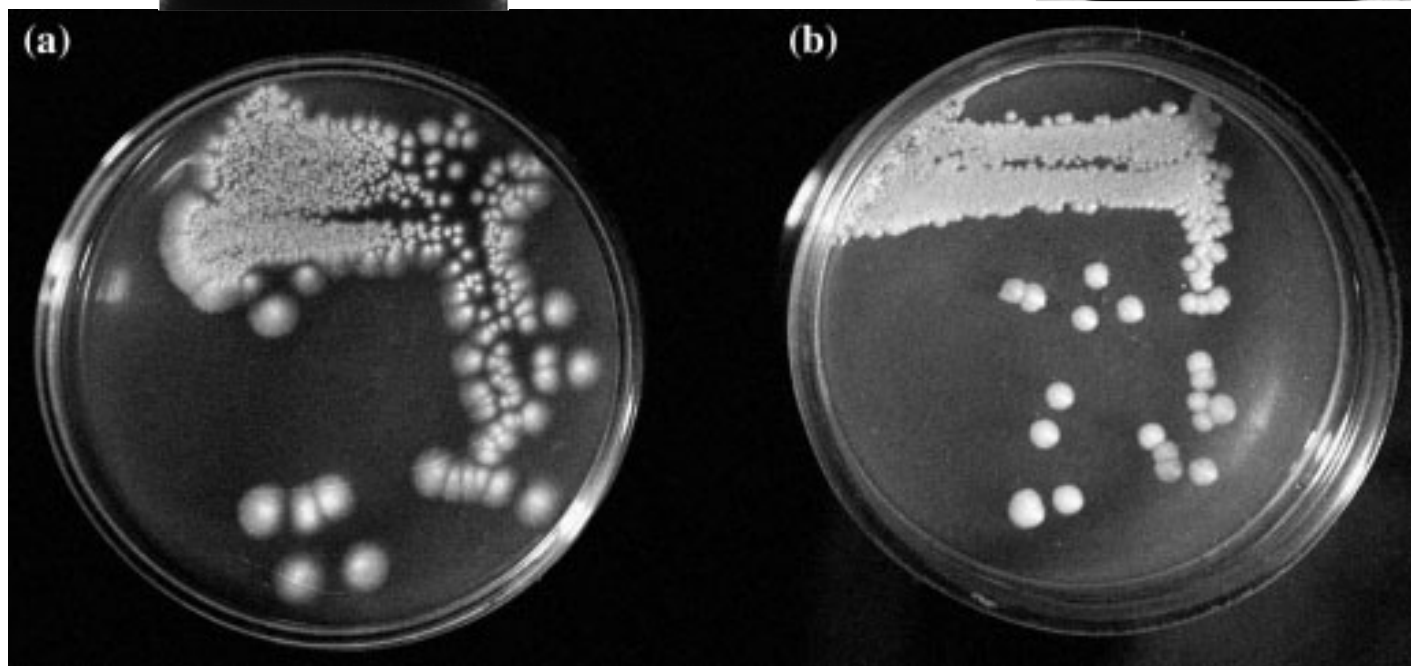
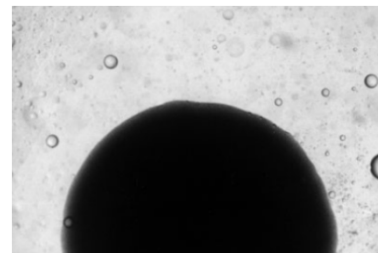
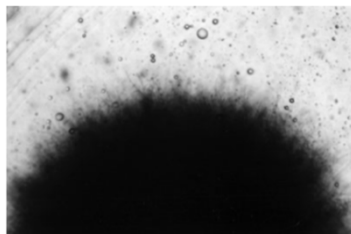
# Kolonie

- 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*)
  
- využívá se např. pro odlišení *C.d.* od *C.a.*  
(kultivace na Staibově agaru při teplotě 37°C)



Granek and Magwene, PLoS Genet (2010)

# Morfologie kolonie - Candida

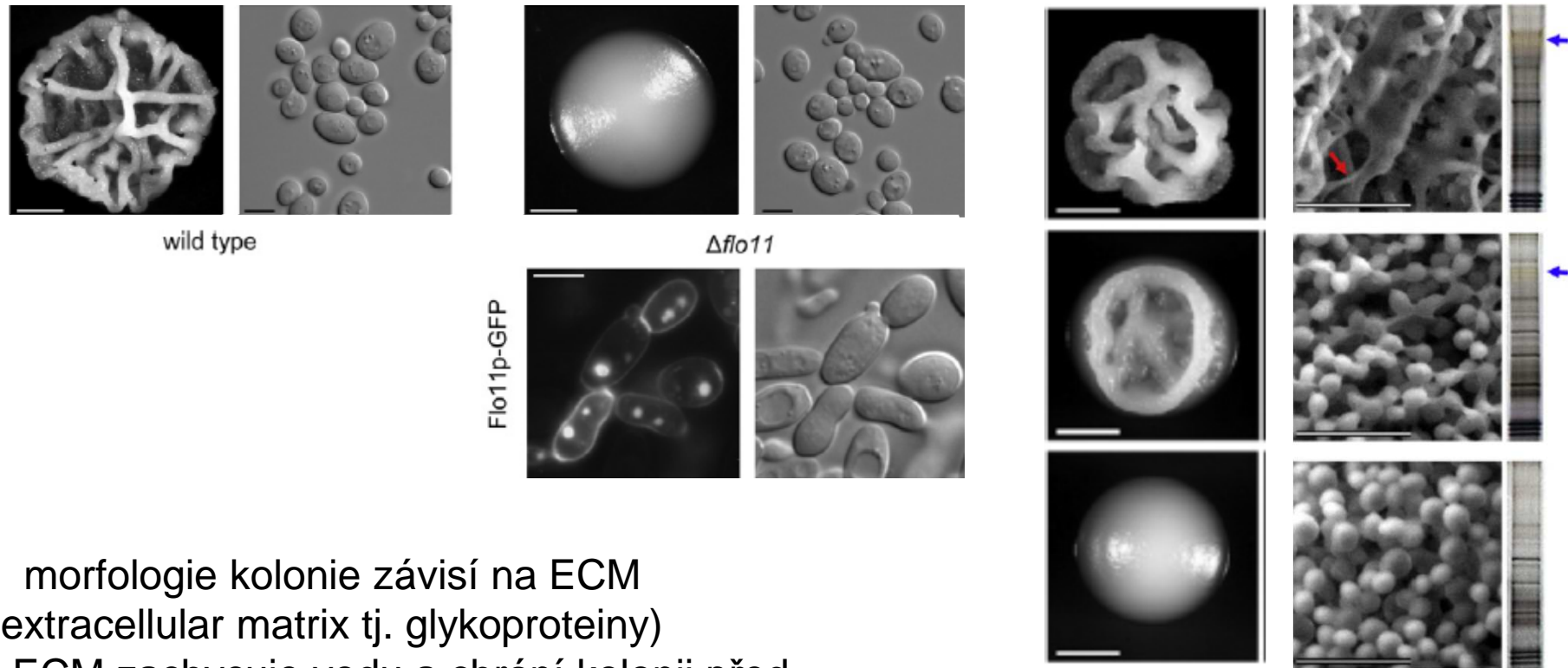


Např. odlišení *C.d.* od *C.a.*: 24h kultivace na Staibově agaru při teplotě 37°C

(a) *C. dubliniensis*

(b) *C. albicans*

# Extracelulární matrix

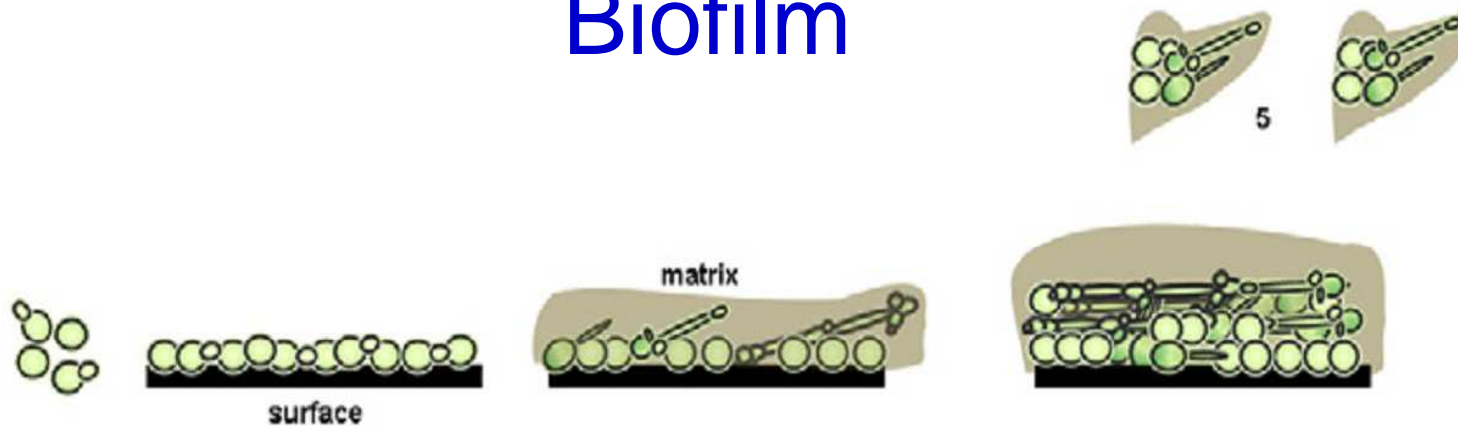


- morfologie kolonie závisí na ECM (extracellular matrix tj. glykoproteiny)
- ECM zachycuje vodu a chrání kolonii před vyschnutím
- buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (... biofilm, flokulace)
- závisí na **FLO11** (adhesin – glykoprotein – faktor důležitý pro flokulaci, biofilm,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

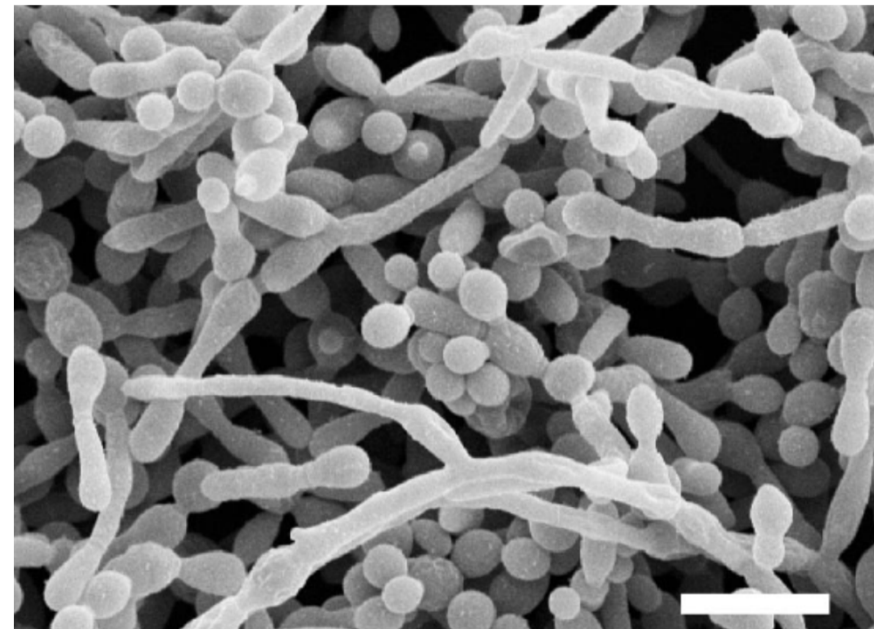
Stovicek et al, Fungal Gen Biol (2010)

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

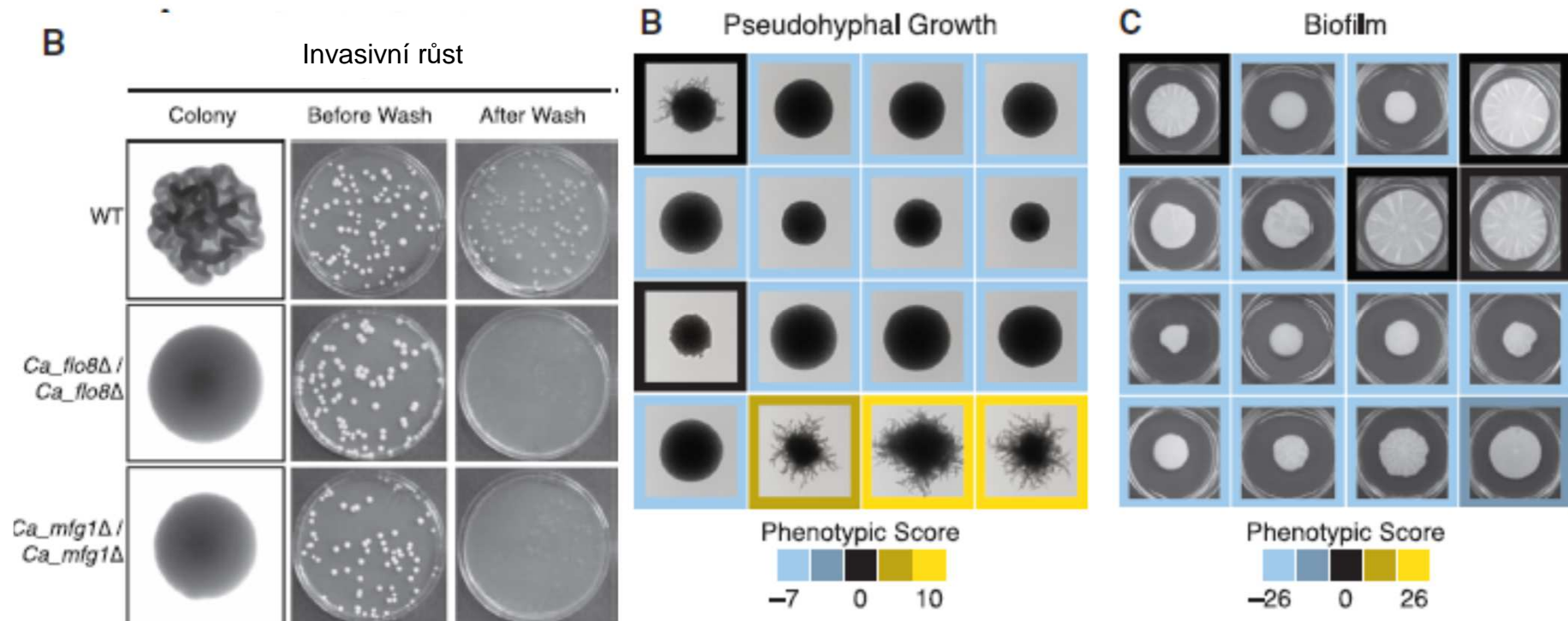
# Biofilm



- tvořen EC 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)

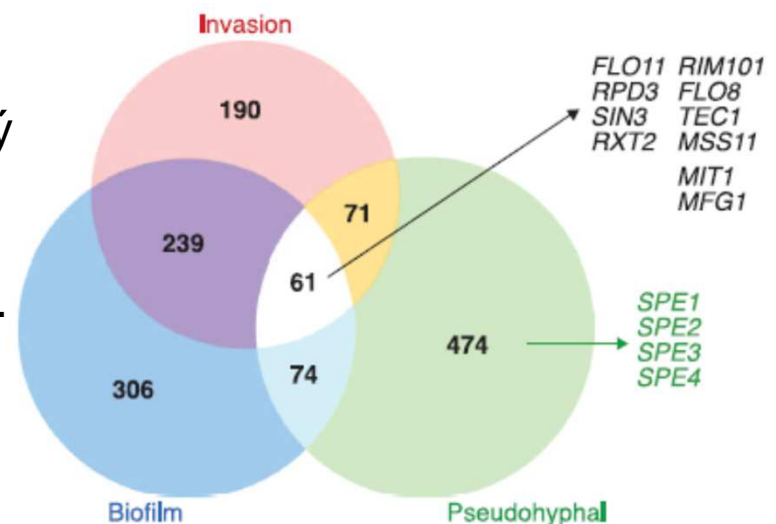


# S.c. kmen Σ1278b

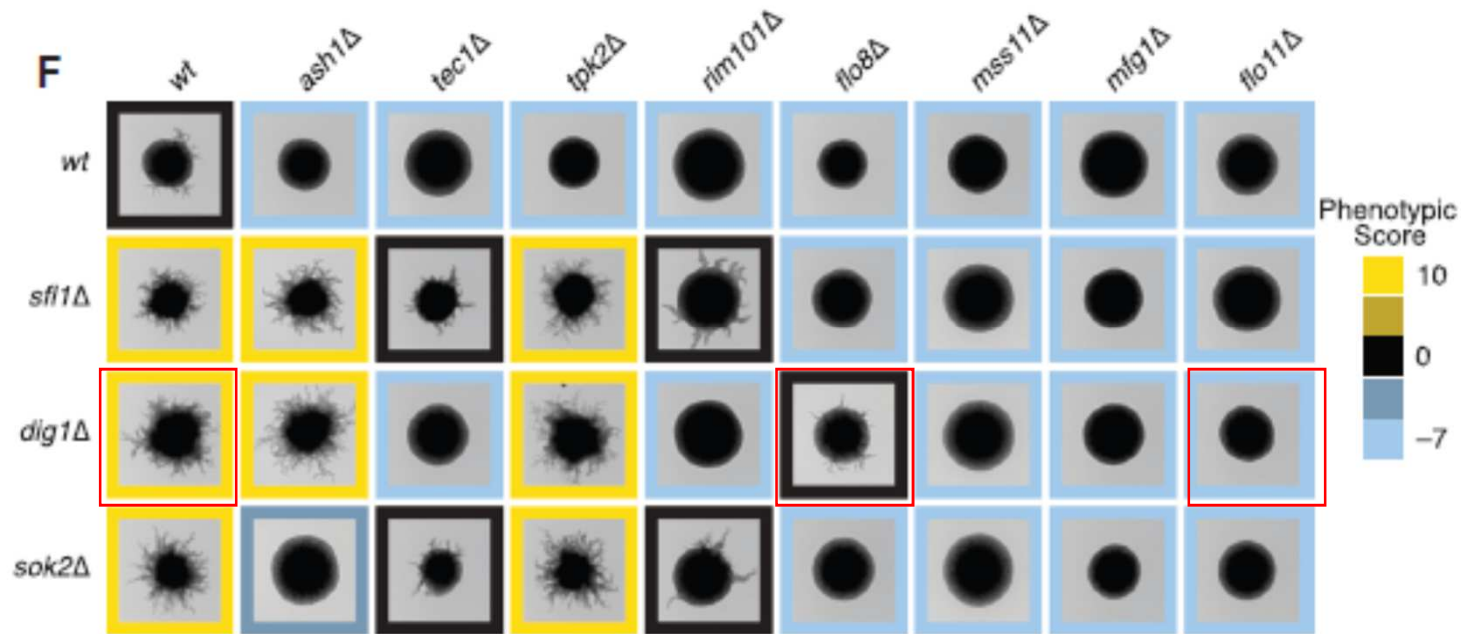


- buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (invasivní růst, pseudohyfy, biofilm, flokulace)
- FLO11 = adhesin (glykoprotein – faktor důležitý pro uchycení)
- Flo8, Mfg1 jsou TF aktivující transkripci Flo11
- Flo11, Flo8, Mfg1 faktory jsou konzervovány ... a podílí se na invazivních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

Ryan et al, Science (2012)



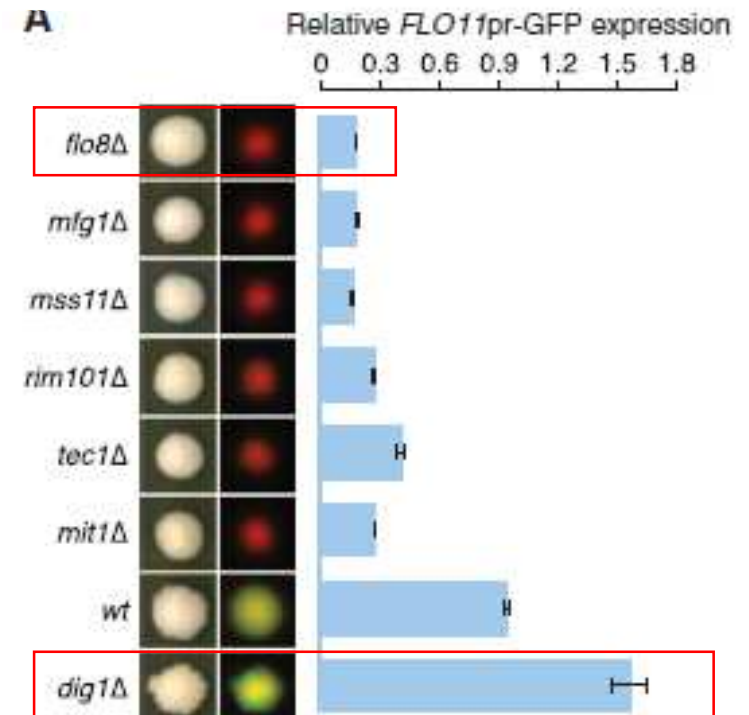




## adhesin

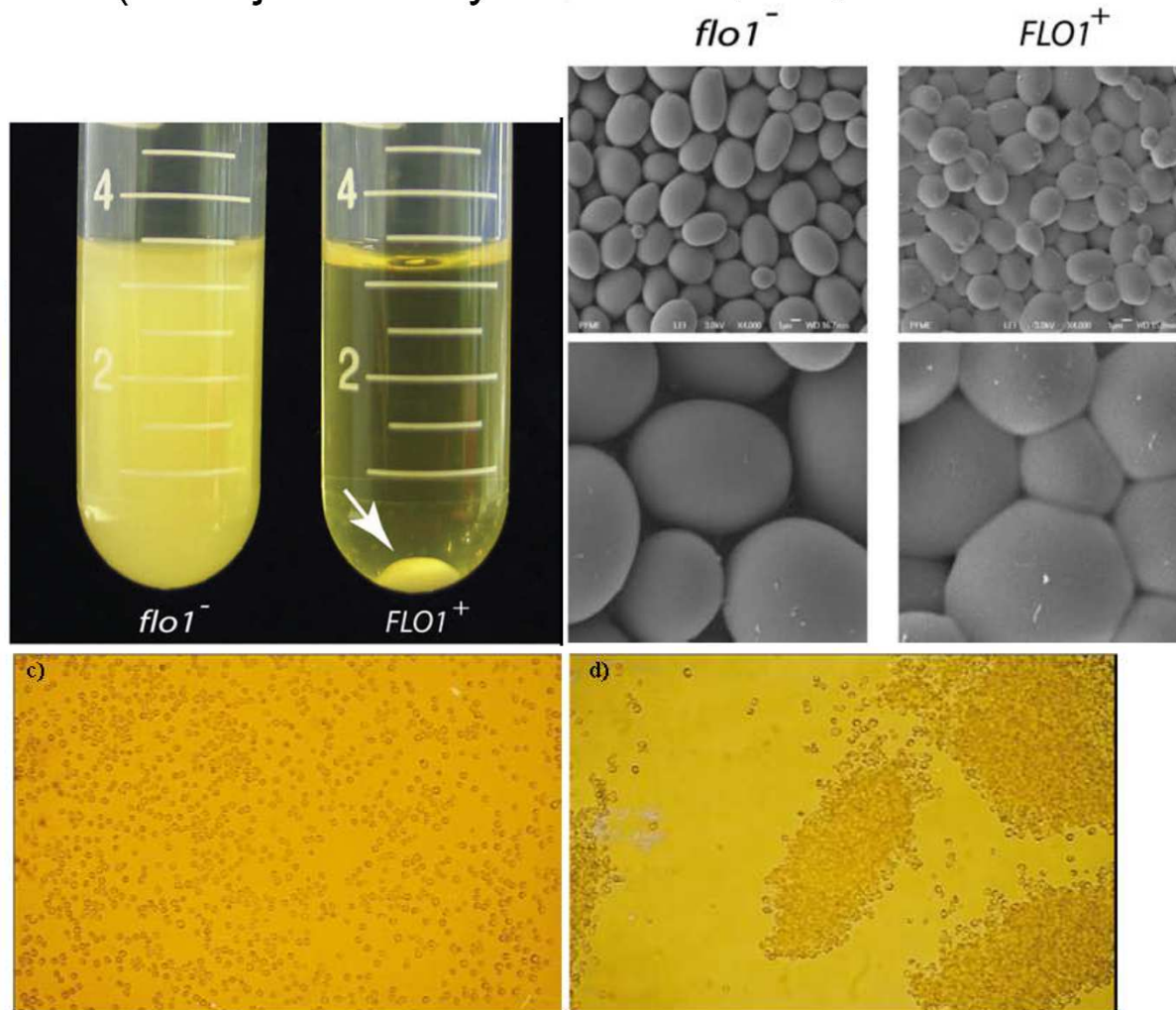
- Flo8, Mfg1 jsou TF aktivující transkripci Flo11
- Dig1 je represor transkripce Flo11
- FLO11 = adhesin (glykoprotein – faktor důležitý pro uchycení - buněčná adheze je důležitá pro všechny specifické morfologie (... biofilm, flokulace)

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)



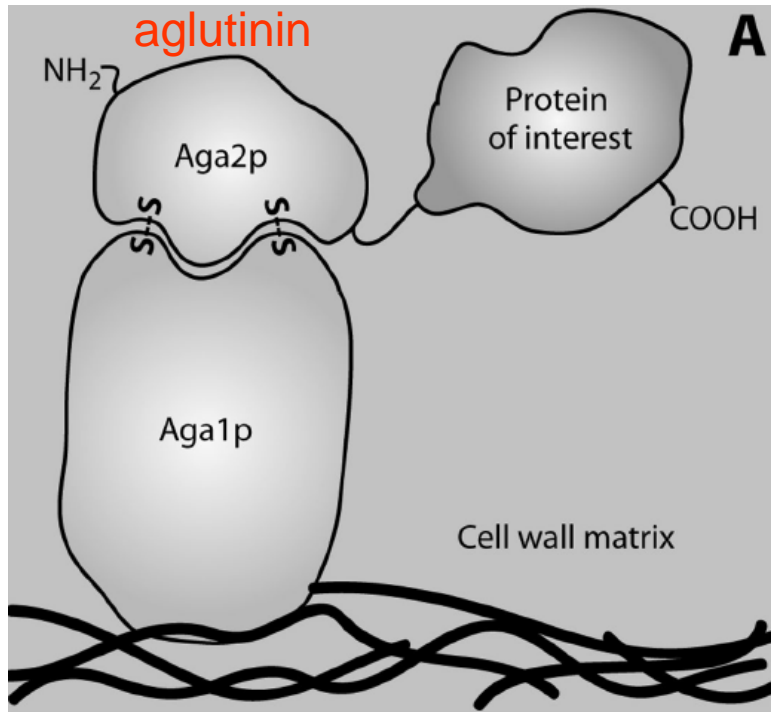
- ovlivněno složením média, genetickou výbavou kmene (skupina *FLO* genů), teplotou, stavbou a morfologií buňky ...

- 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)

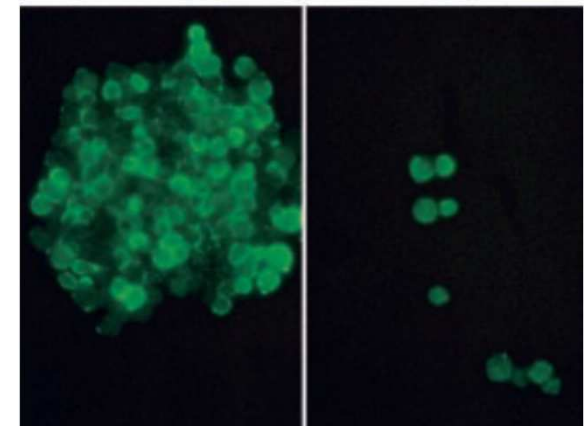
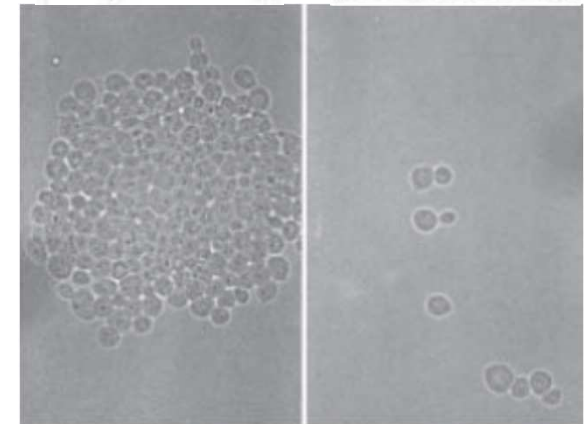
- *GTS1* transkripční faktor  
spouštějící aglutinaci pod  
*CUP1* promotorem  
(další přednášky)

- biosorbce &  
sedimentace



GPMH6/pMCG1  
(100  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>)

GPMH6/pMCG1  
(without CuSO<sub>4</sub>)



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

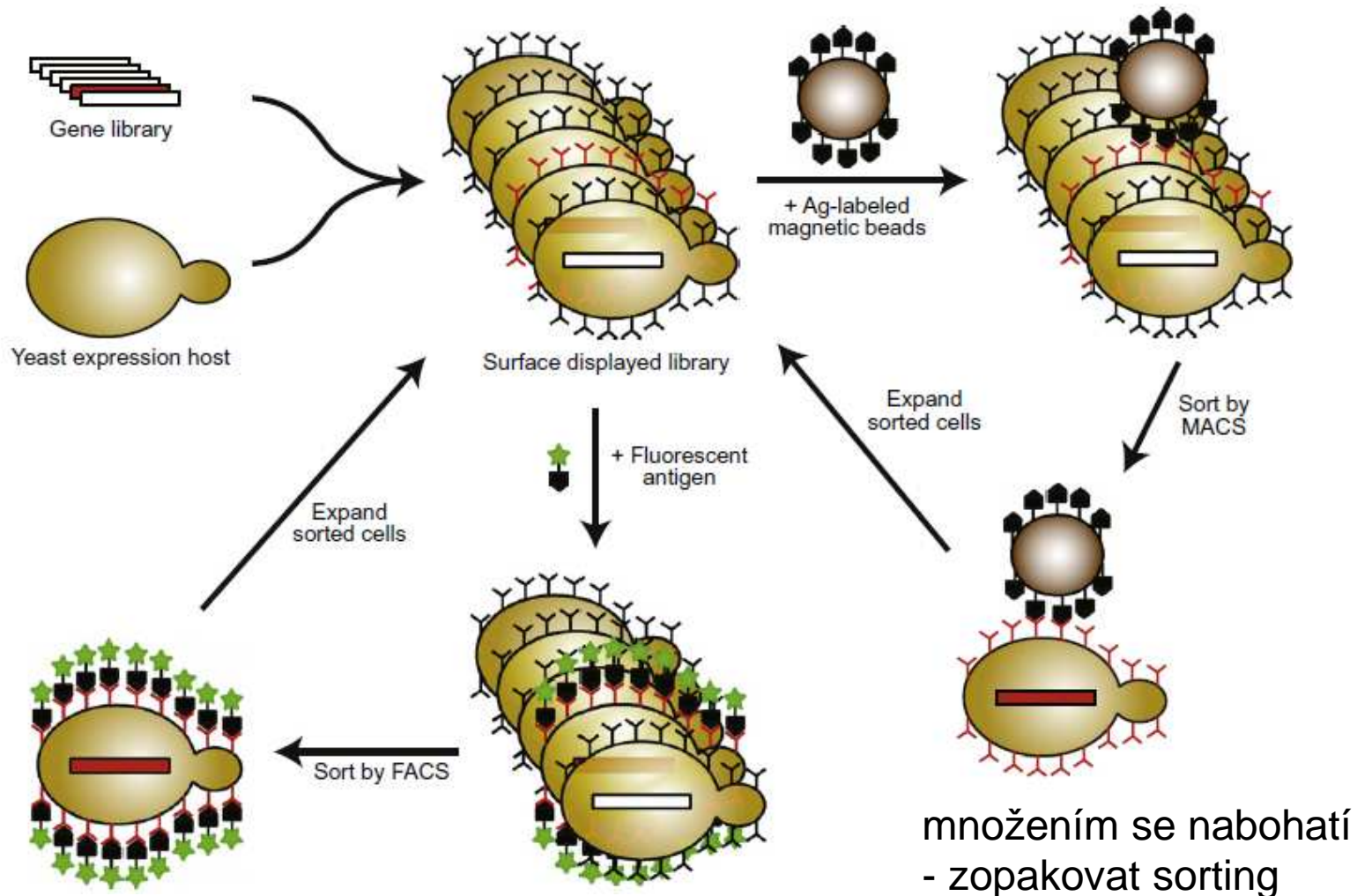
- exprese eukaryotních proteinů v kvasince (podobné  
mechanismy ... posttranslační modifikace) – knihovny  
lidských cDNA (i protilátek z pacientů)

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

Kuroda et al, Appl Microbiol Biotechnol (2002)

Pepper et al, CCHTS (2008)

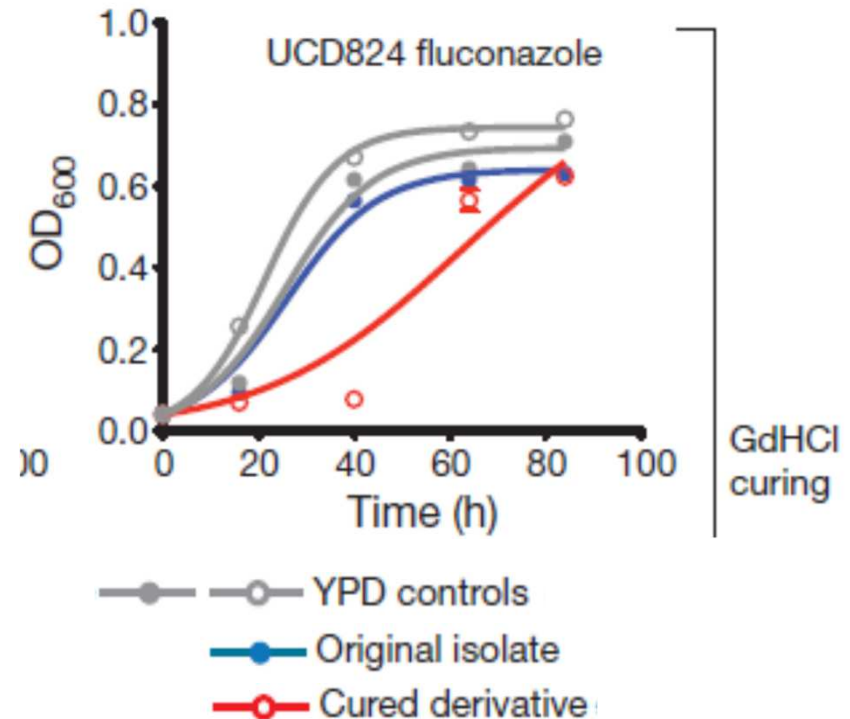
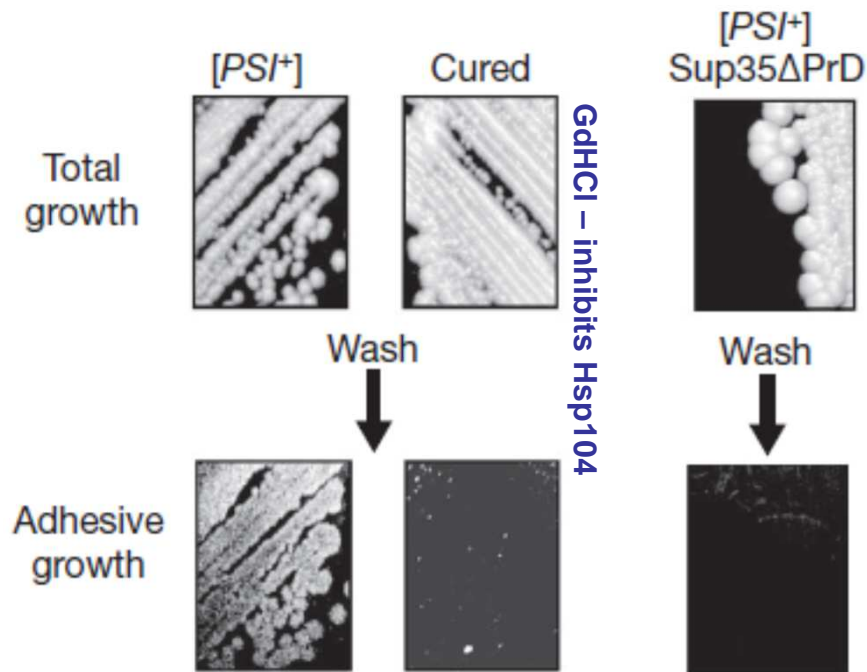
# YSD - testy antigen/protilátka



- 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

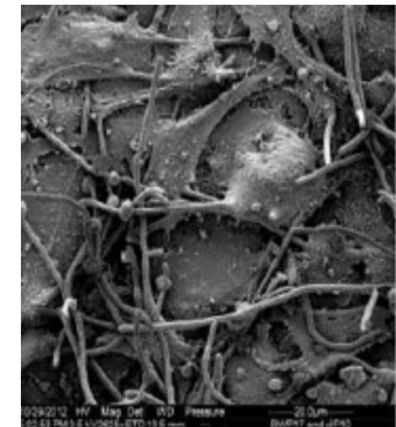
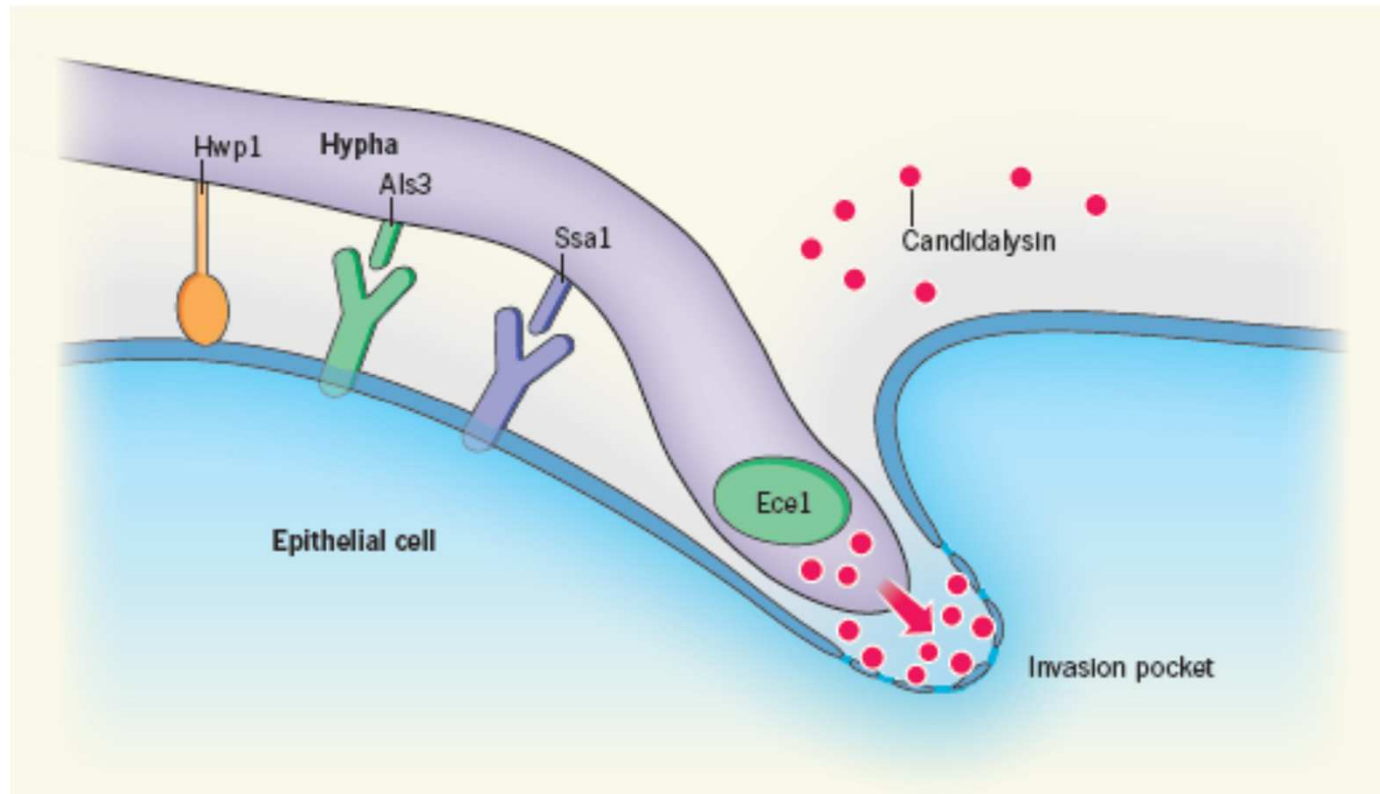
Adhesivní vlastnosti mohou být ovlivněny přítomností prionů [PSI<sup>+</sup>] kódovaných Sup35 genem - jeho PrD doména spouští tvorbu amyloidových agregátů



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)



# 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 ( $\beta$ -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  $\beta$ -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 <sup>T</sup>	–	–
<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