

Protoplasty jako modelový objekt studia biologie kvasinek

Metody přípravy protoplastů

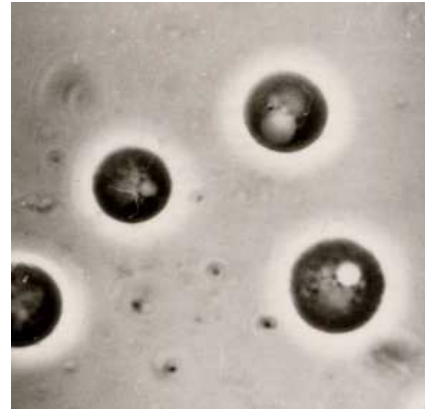
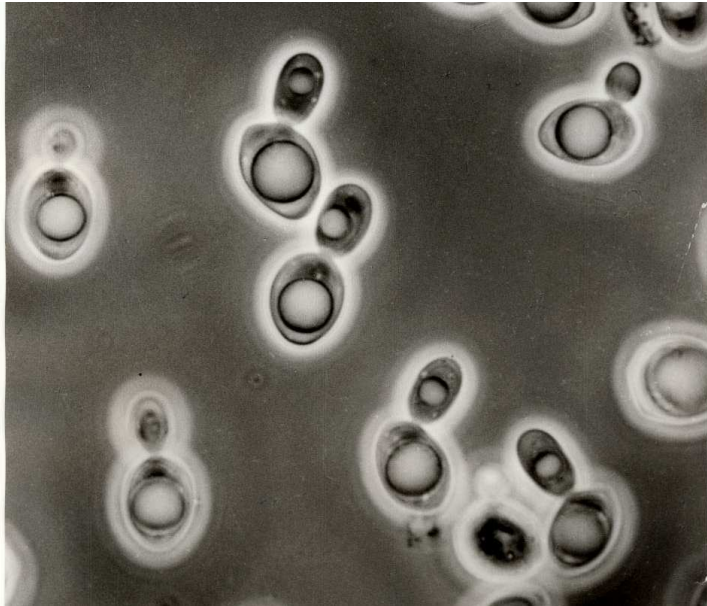
Regenerace buněčné stěny u protoplastů

Fuze protoplastů jako metoda hybridizace
kvasinek

Další aplikace protoplastové formy
kvasinkových buněk.

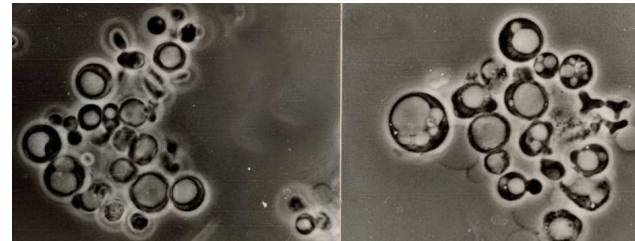
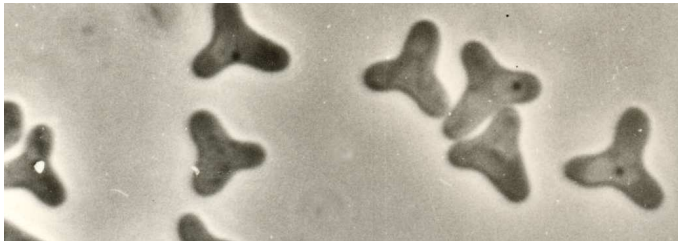
Metody přípravy protoplastů

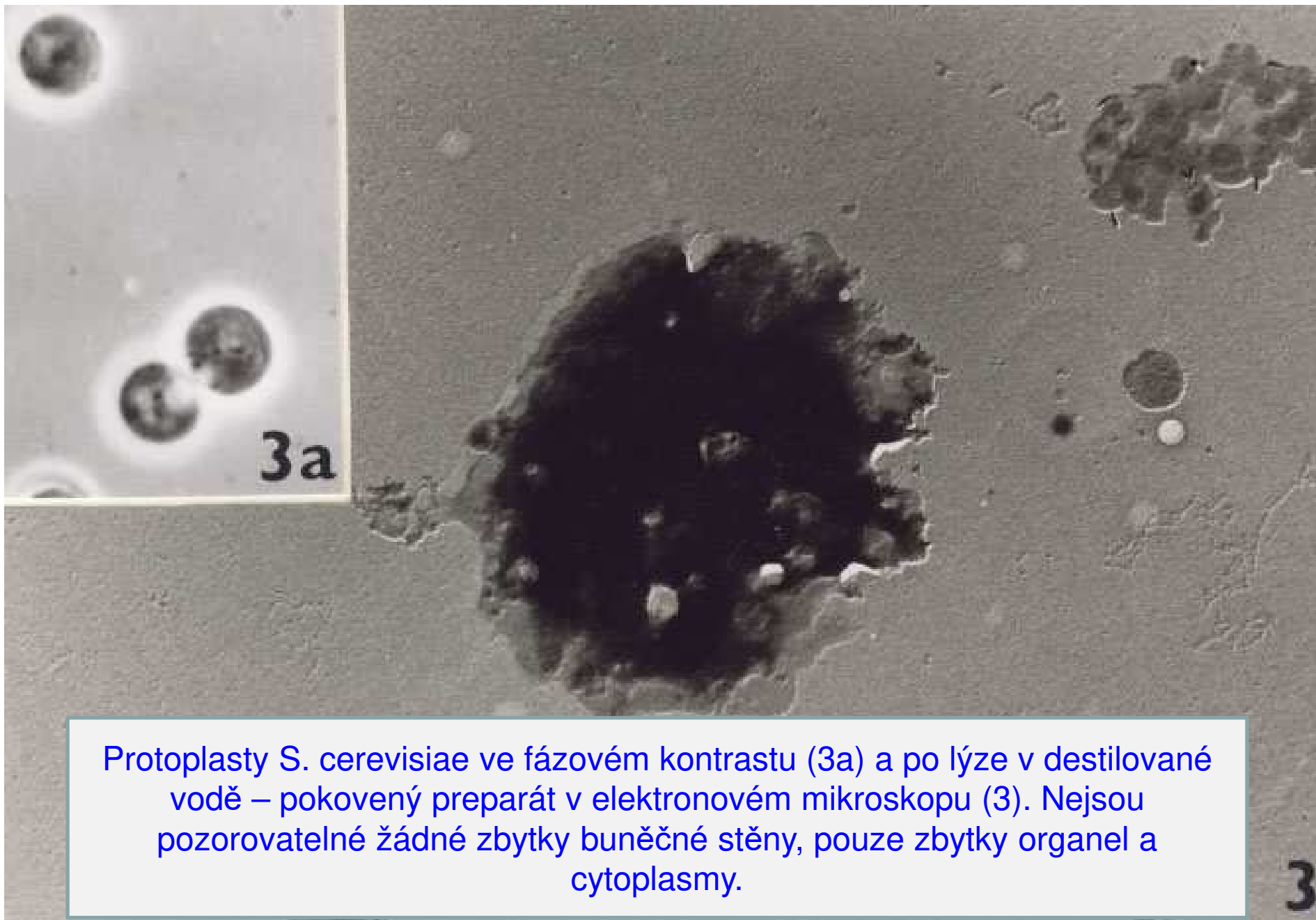
- Mechanické rozbití kvasinkových buněk v hypertonickém roztoku
- Autolýza buněčné stěny
- Aplikace enzymů lyzujících buněčnou stěnu
 - Výběr osmotika - sorbitol, mannitol, KCl, MgSO₄ a koncentrace
 - Aplikace látek rušících S-S vazby v buněčné stěně – merkaptoetanol, dithiothreitol aj



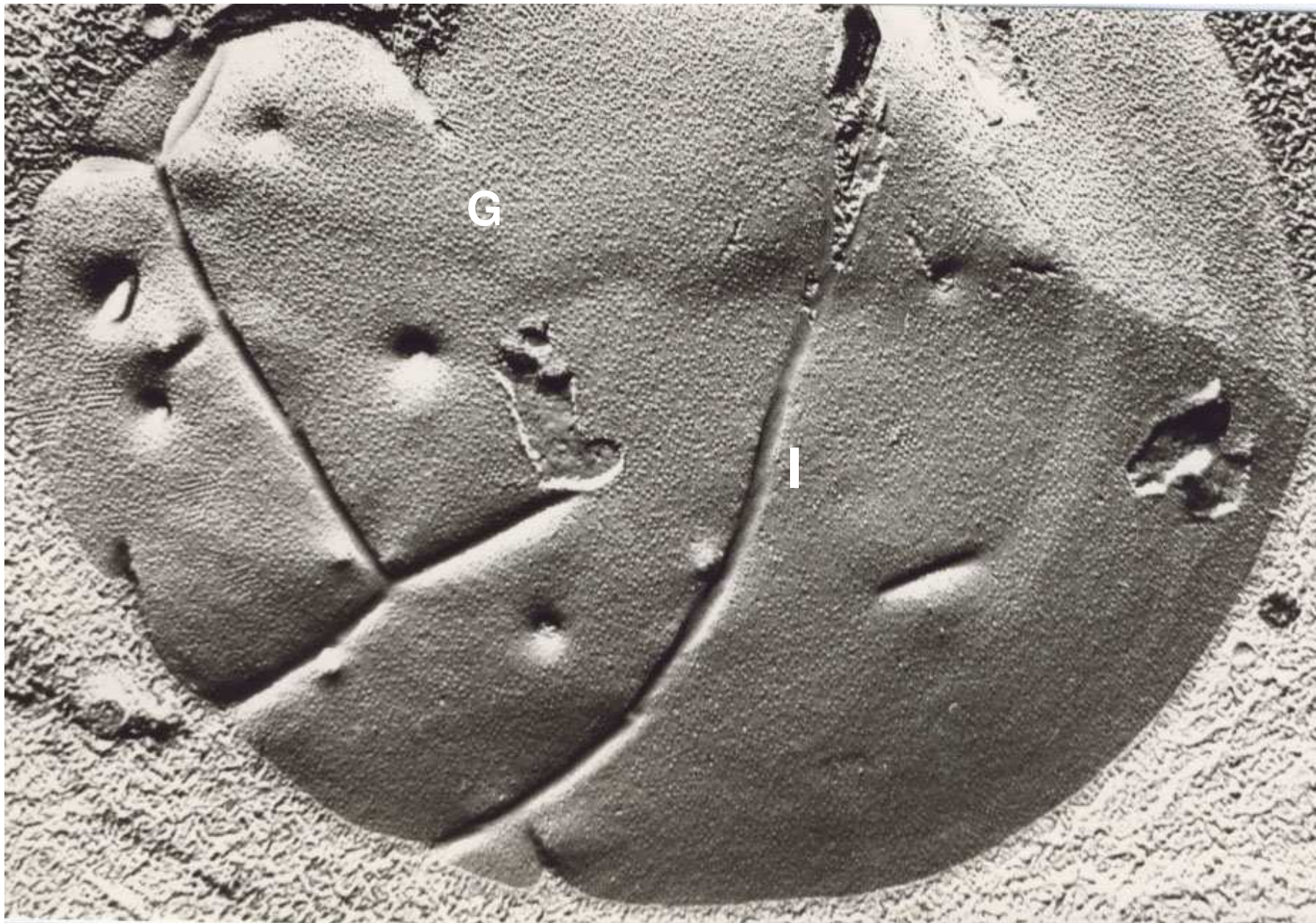
Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a čerstvě vytvořené protoplasty

Trigonopsis variabilis





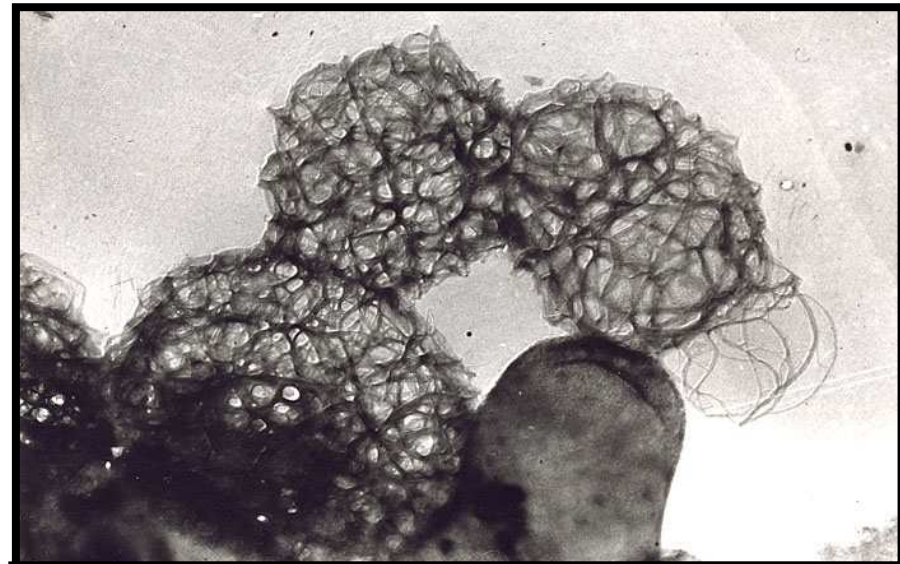
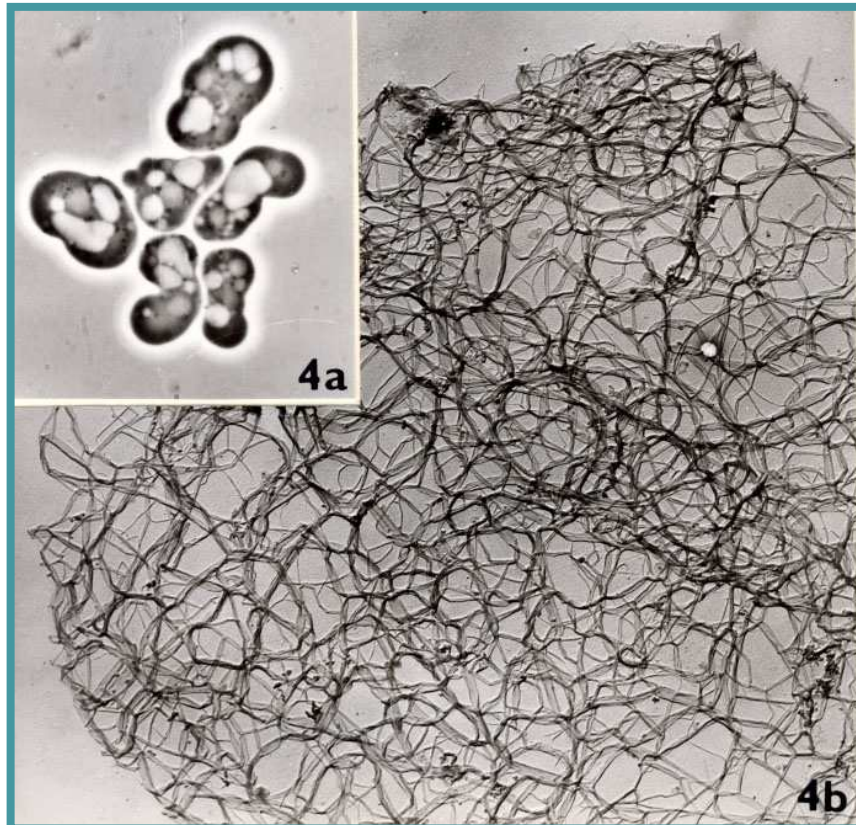
Protoplasty *S. cerevisiae* ve fázovém kontrastu (3a) a po lýze v destilované vodě – pokovený preparát v elektronovém mikroskopu (3). Nejsou pozorovatelné žádné zbytky buněčné stěny, pouze zbytky organel a cytoplasmy.



Povrch čerstvě připraveného protoplastu *S. cerevisiae*. Drobná granula (G) plasmatické membrány jsou vlastně intramembránové proteiny. Invaginace (I) jsou aktuální rezervou povrchu při zvětšování či zmenšování objemu protoplastu.

Regenerace protoplastů *S. cerevisiae* v tekutém mediu.

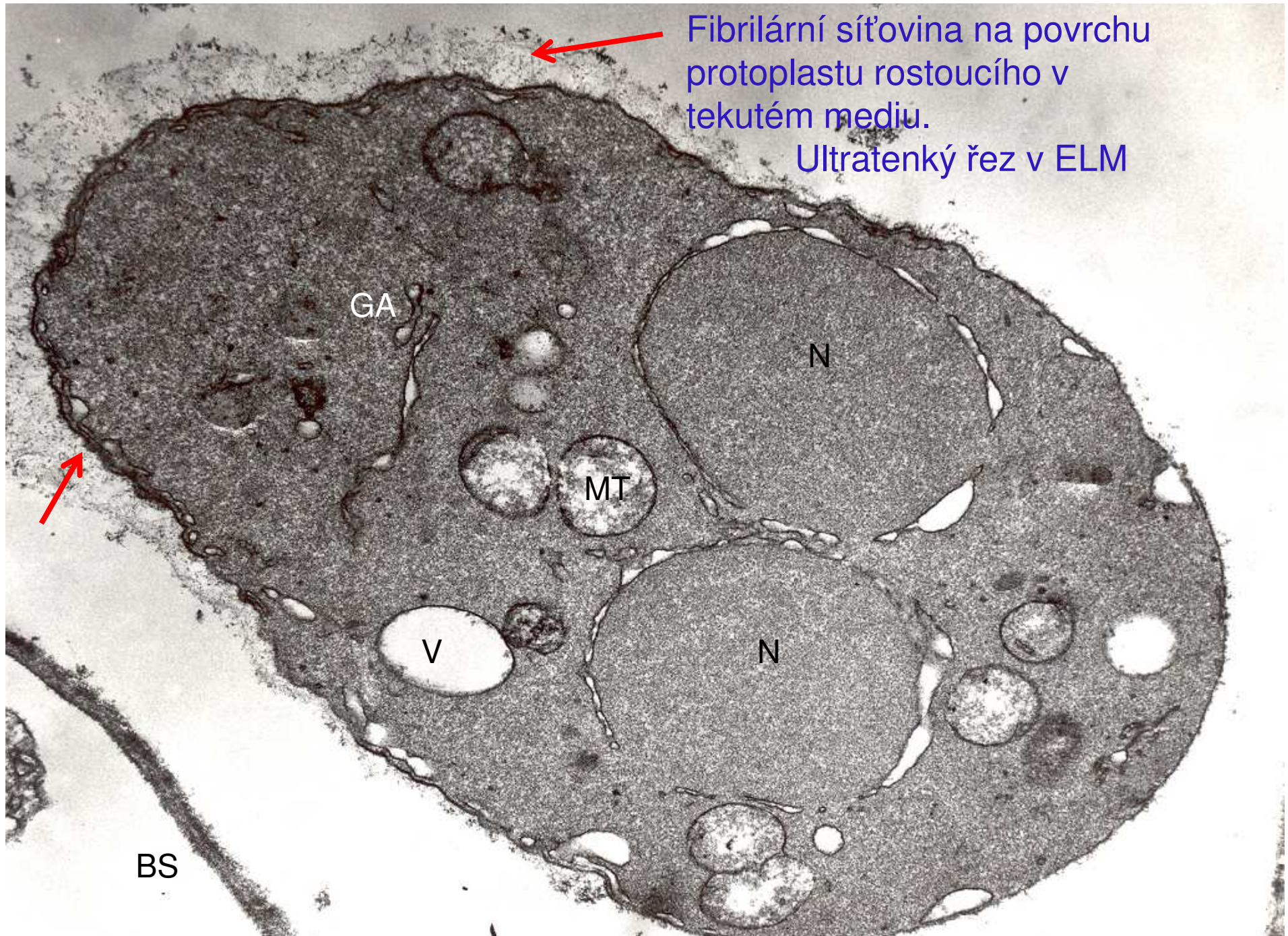
Protoplasty rostou polárně nebo multipolárně, vakuolizují (Obr. 4a), probíhá karyokineze, cytokineze je však zablokována. Na povrchu rostoucích protoplastů se tvoří fibrilární síťovina (Obr. 4b), tvořená β -1,3 glukánem Mannan-proteiny, další stěnová komponenta, jsou uvolňovány do media.



Tvar rostoucího protoplastu není určován regenerující buněčnou stěnou, ta jen modifikuje morfologii rozpínající se cytoplasmy

Fibrilární síťovina na povrchu
protoplastu rostoucího v
tekutém mediu.

Ultratenký řez v ELM



GA

N

MT

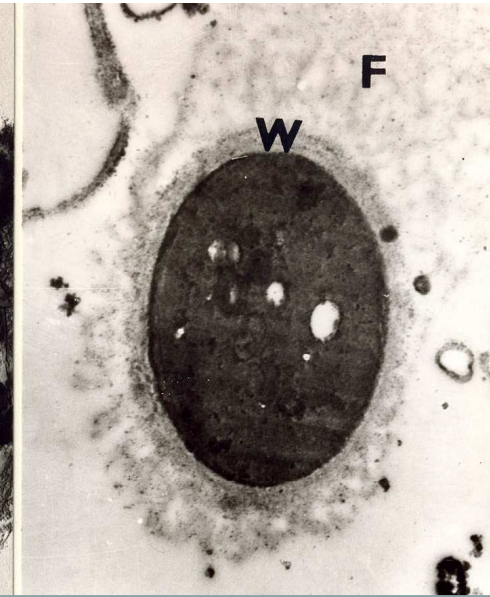
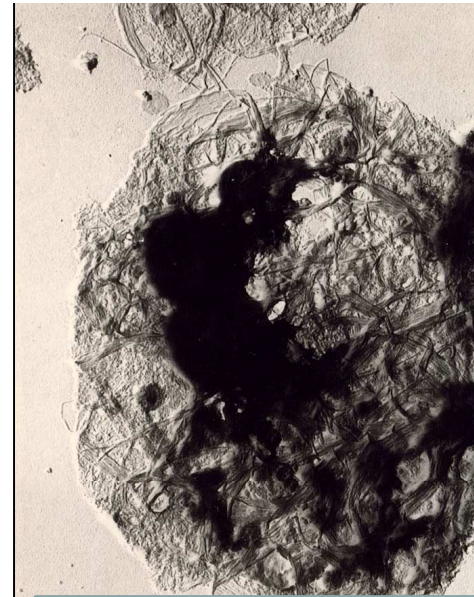
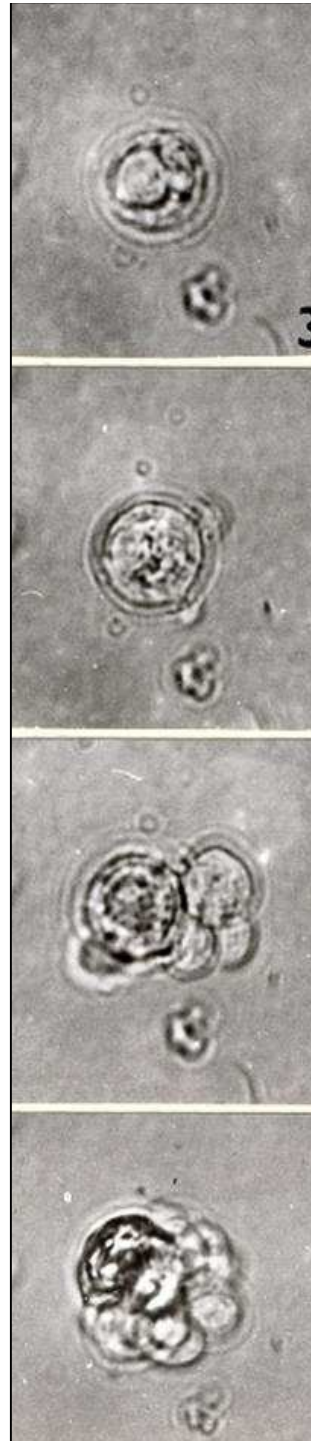
V

N

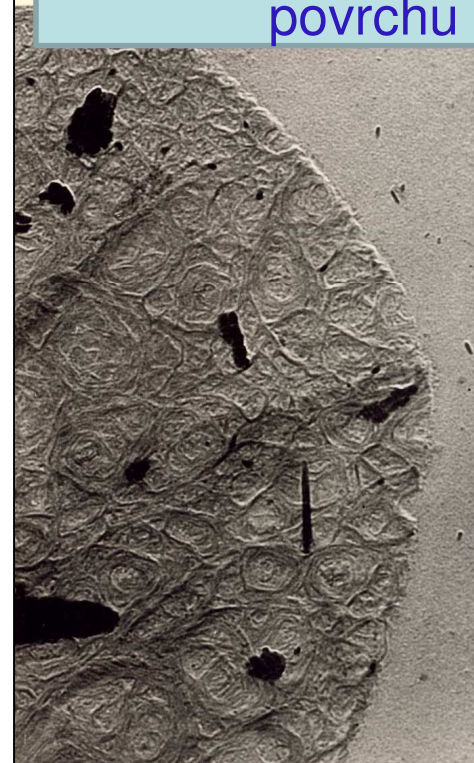
BS

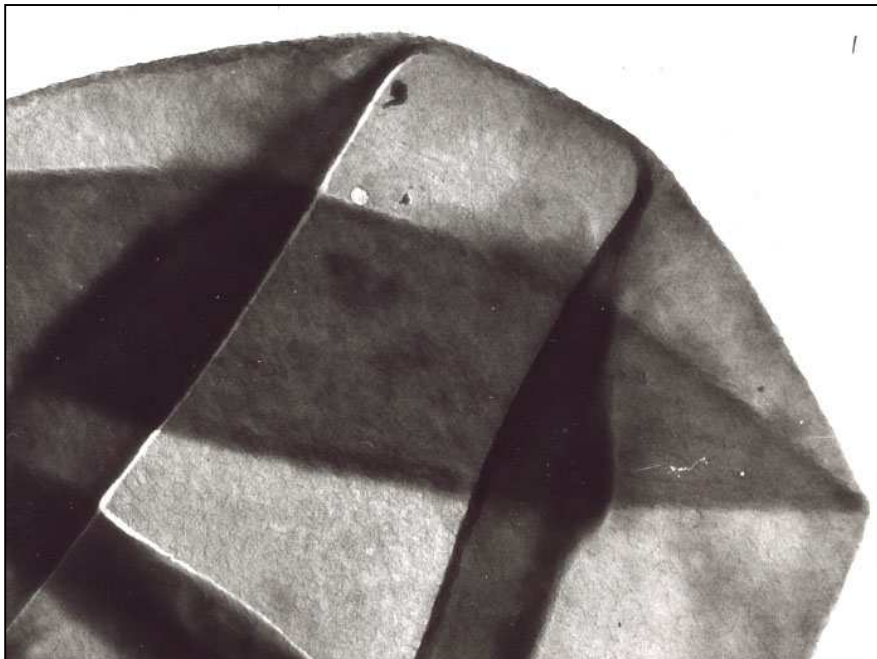
Regenerace protoplastů v želatinovém gelu:

Protoplasty zůstávají sférické, zvětšují svůj průměr, jádra se dělí a na povrchu je zřetelná pevná stěna. Po 8 – 12 hod. kultivace se objevují pupeny a vytváří se mikrokolonie buněk. Želatina a další gely (agar, alginát) patrně „dočasně“ nahrazují buněčnou stěnu – zabraňují difuzi stěnového materiálu z povrchu protoplastu, a tak umožňují jeho organizaci do pevné buněčné stěny

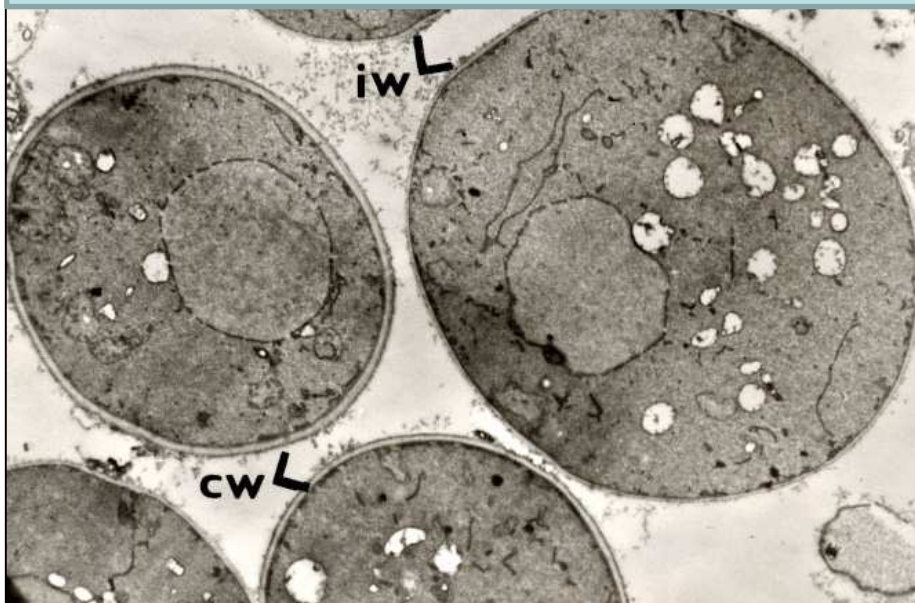
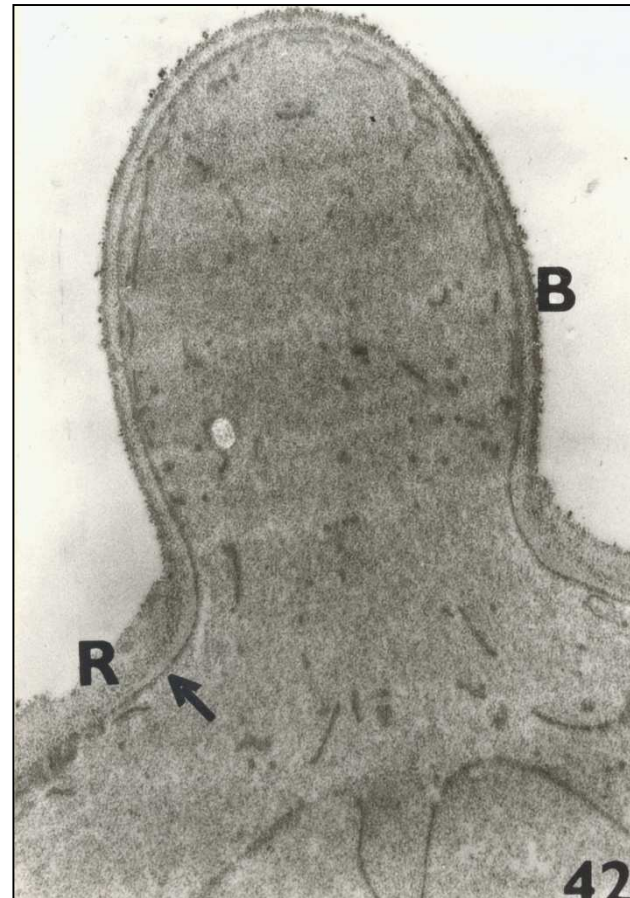


Tvorba kompaktní buněčné stěny na povrchu protoplastů

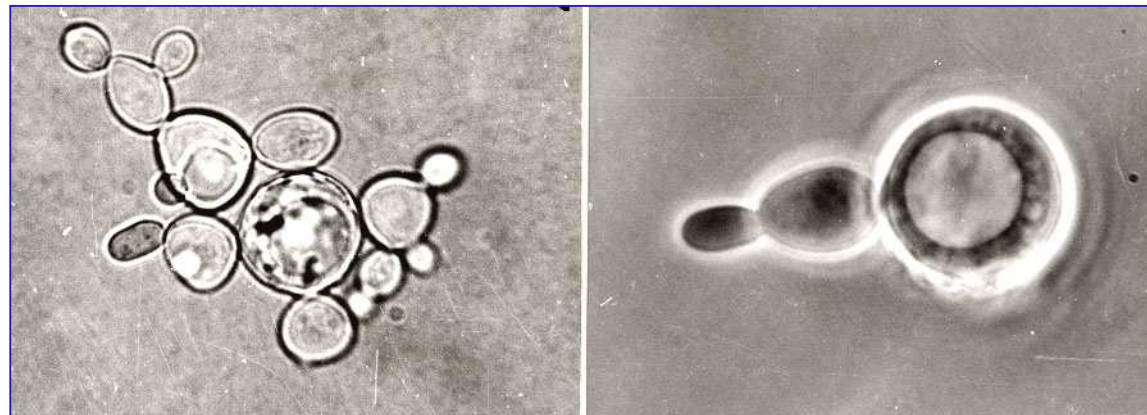
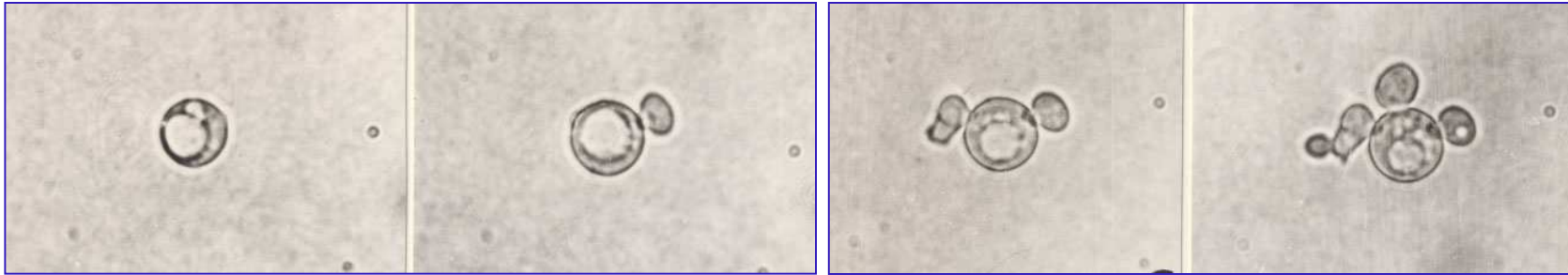




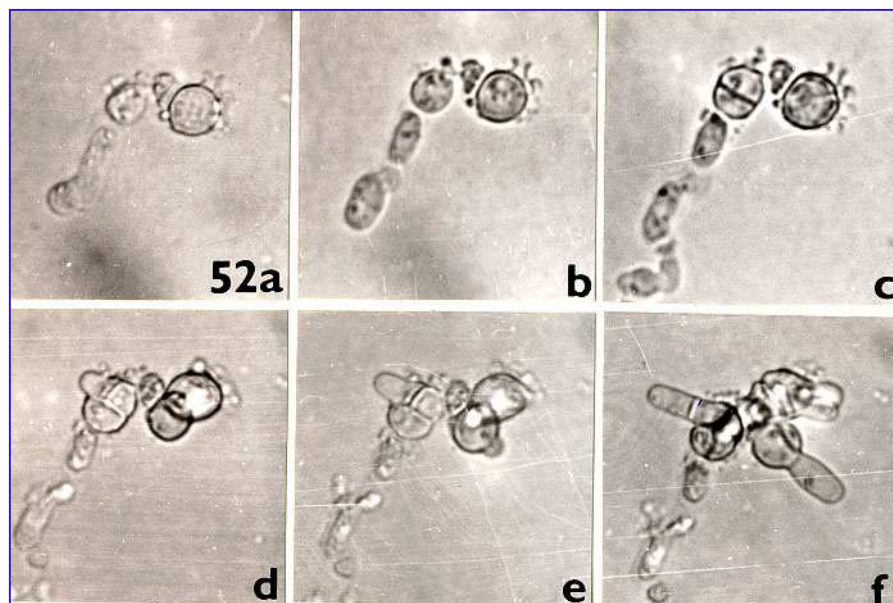
Povrch a řez kompaktní buněčnou stěnou



Morfologie regenerace protoplastů v agarovém gelu

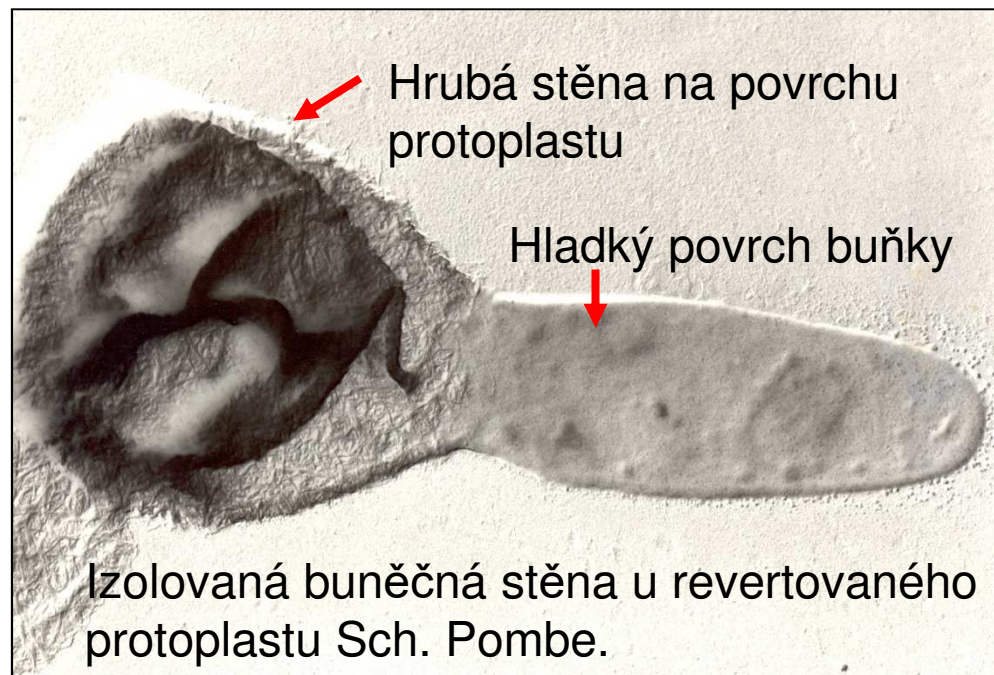


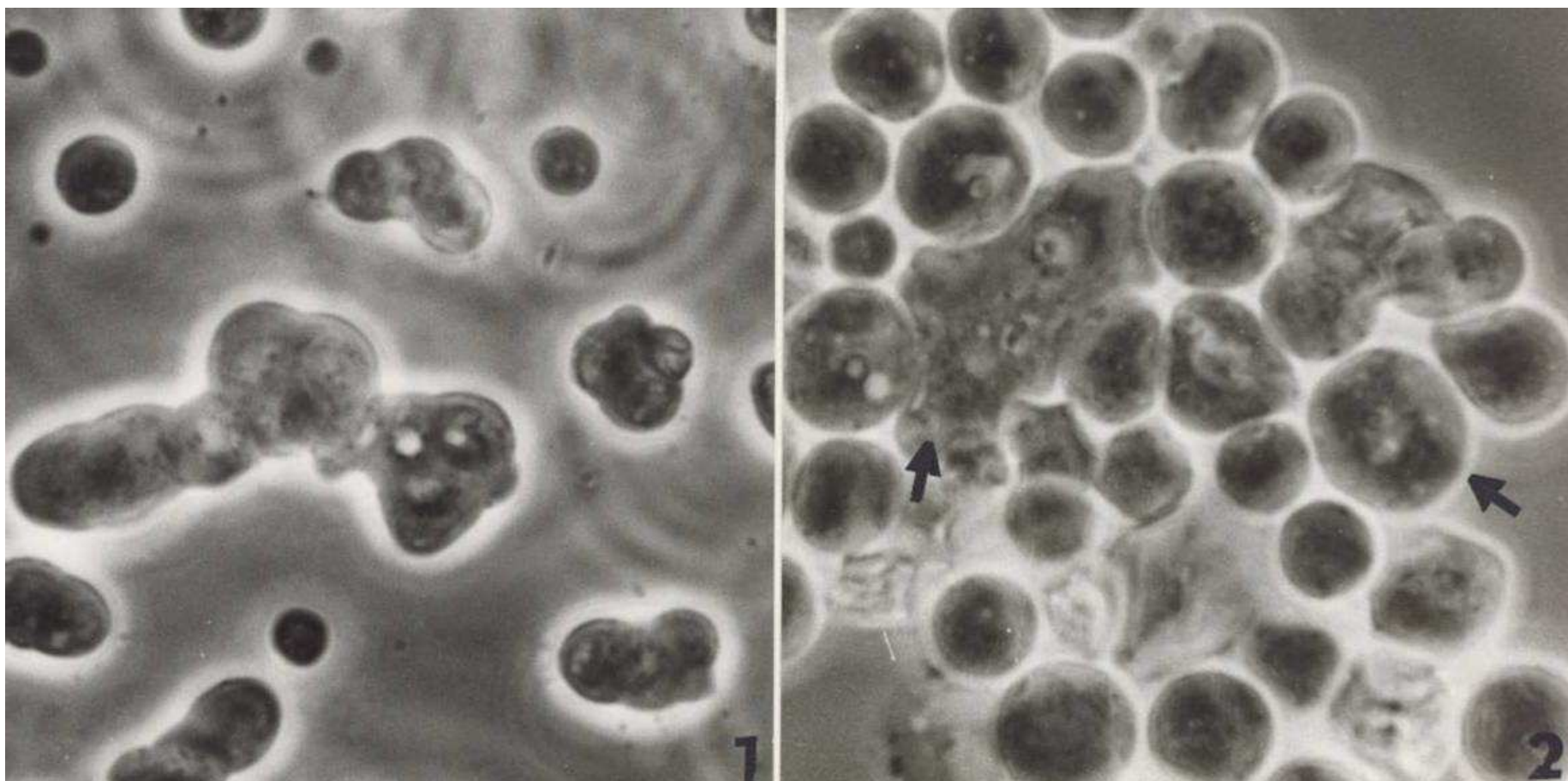
První generace revertovaných buněk mají abnormální morfologii, která se u dalších generací postupně vrací k typické elipsoidní formě



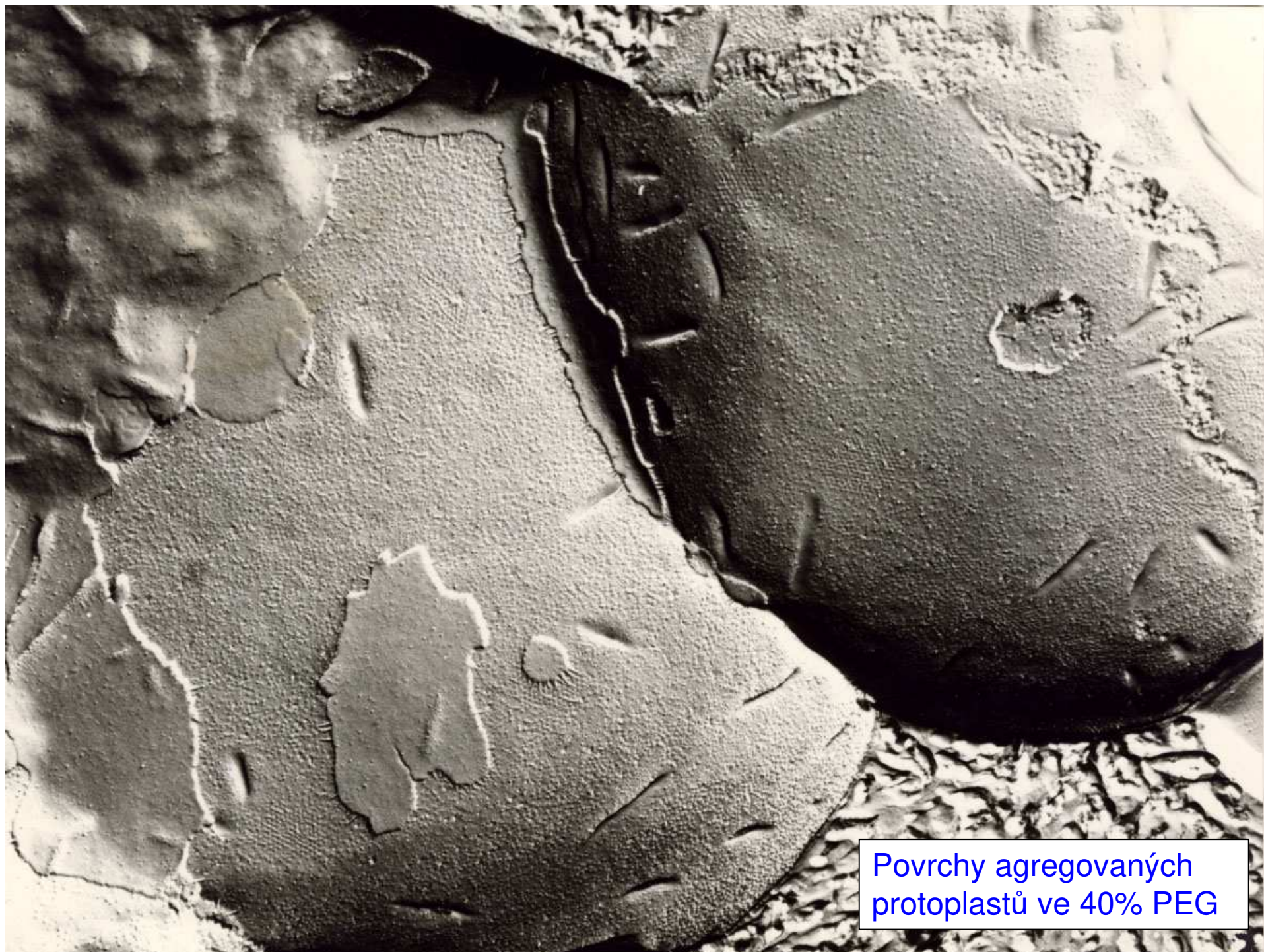
Vývoj protoplastu *Sch. pombe* na povrchu agarového media. Protoplast roste polárně, nejstarší části se zakulacují a mají zřetelnou pevnou stěnu. Pak vzniká septum a v další generaci se již objevují cylindrické buňky typické pro *Sch. pombe*.

Na povrchu polárně rostoucích protoplastů pokračuje tvorba fibrilární stěny, která po dosažení určité hustoty nahradí gelové prostředí. Revertovaná buňka má již povrch hladký, podobně jako kontrolní buňky





Aglutinace protoplastů ve 40% polyethylenglykolu (PEG) a vytváření polyprotoplastů s více jádry po zředění PEG živným médiem



Povrchy agregovaných
protoplastů ve 40% PEG

Lokální poruchy struktury plasmatické membrány po inkubaci protoplastů ve 40% PEG 30 min při 37⁰ C. Je pravděpodobné, že v těchto místech začíná fuze cytoplasmy adherovaných protoplastů



Adherující plochy aglutinovaných
protoplastů v 40% PEG



Příklad mezidruhové hybridizace kvasinek *S. cerevisiae his⁻* x *S. pombe trp⁻*
cestou fuze protoplastů

Tyto druhy jsou fylogeneticky vzdálené, *S. cerevisiae* má 16 chromosomů, *S. pombe* pouze 3. Vhodně fuzované protoplasty v důsledku genetické komplementace mohou (selektivně) růst na minimálním agaru. ←Hybridní protoplasty však na buňky nerevertují.



Aplikace protoplastů kvasinek v buněčné biologii a genetice

1. Studium funkce buněčné stěny

- mechanická bariéra
- signální funkce – receptce stresových faktorů, feromonů aj
- receptce signálů pro start cytokineze
- syntéza komponent buněčné stěny

2. Studium struktury plasmatické membrány

3. Studium nepohlavní hybridizace kvasinek cestou fúze protoplastů

4. Transformace kvasinek izolovanou DNA

Interakce buněk a
protoplastů opačných
párovacích typů u *Sacch.
cerevisiae*

Protoplasty $\alpha + a$, pouze
neorientovaný růst (Obr. 1),
žádná fuze

Protoplasty $\alpha +$ buňky a :
párovací výběžky tvoří pouze
buňky (Obr. 2-4). Žádná fuze.

▲
Buněčná stěna je tedy nezbytným
faktorem pro realizaci sexuálního
párování kvasinek.

