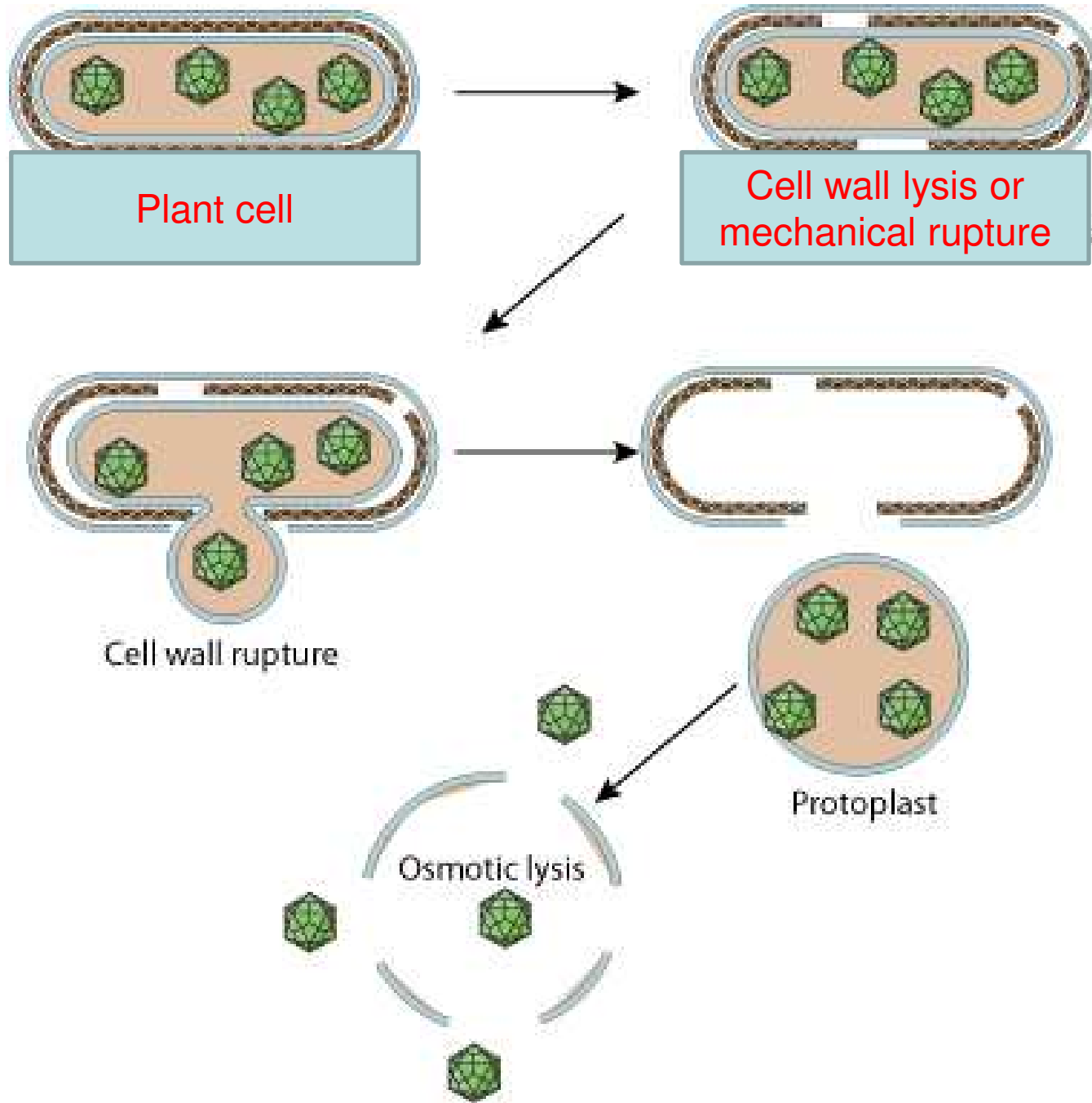


Protoplasty kvasinek jako modelový objekt

1. Historie objevu modelu protoplastů
2. Metody přípravy protoplastů
3. Metody regenerace buněčné stěny u protoplastů
4. Fuze protoplastů
5. Genetická transformace kvasinek na modelu protoplastů
6. Sexuální hybridizace u protoplastů

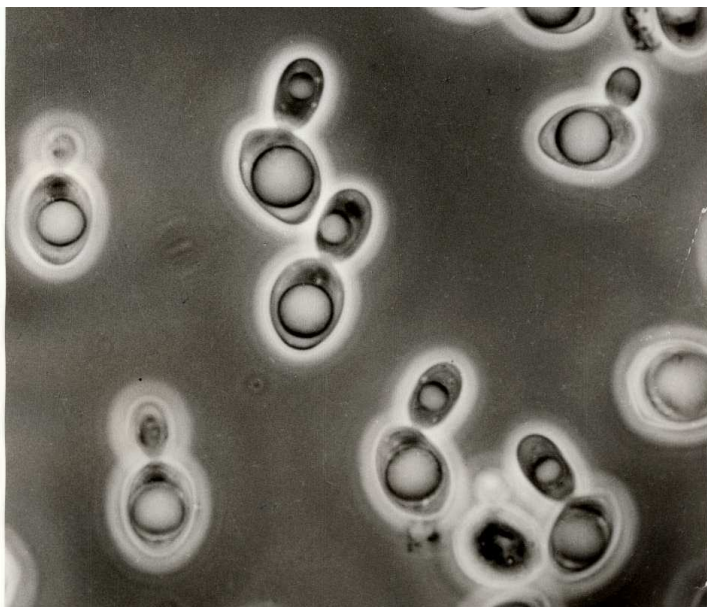


1. Historie objevu

- Protoplasty rostlinných buněk (Klebs 1887, Townsend 1897)
- Sféroplasty, L-formy a protoplasty bakterií (Weibull 1953, Dienes 1939, Kandler, 1954)
- O. Nečas a plasmatické koule kvasinek (Nečas 1954)
- Autolytické protoplasty (Nečas 1955)
- Protoplasty připravené lýzou b. stěny helikázou (Eddy a Williamson, 1959)
- Regenerace protoplastů v gelech (Nečas, 1962, Svoboda 1966)

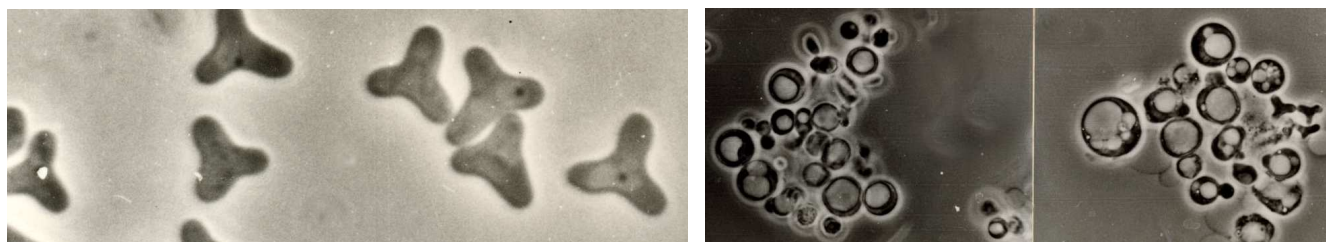
2. Metody přípravy protoplastů

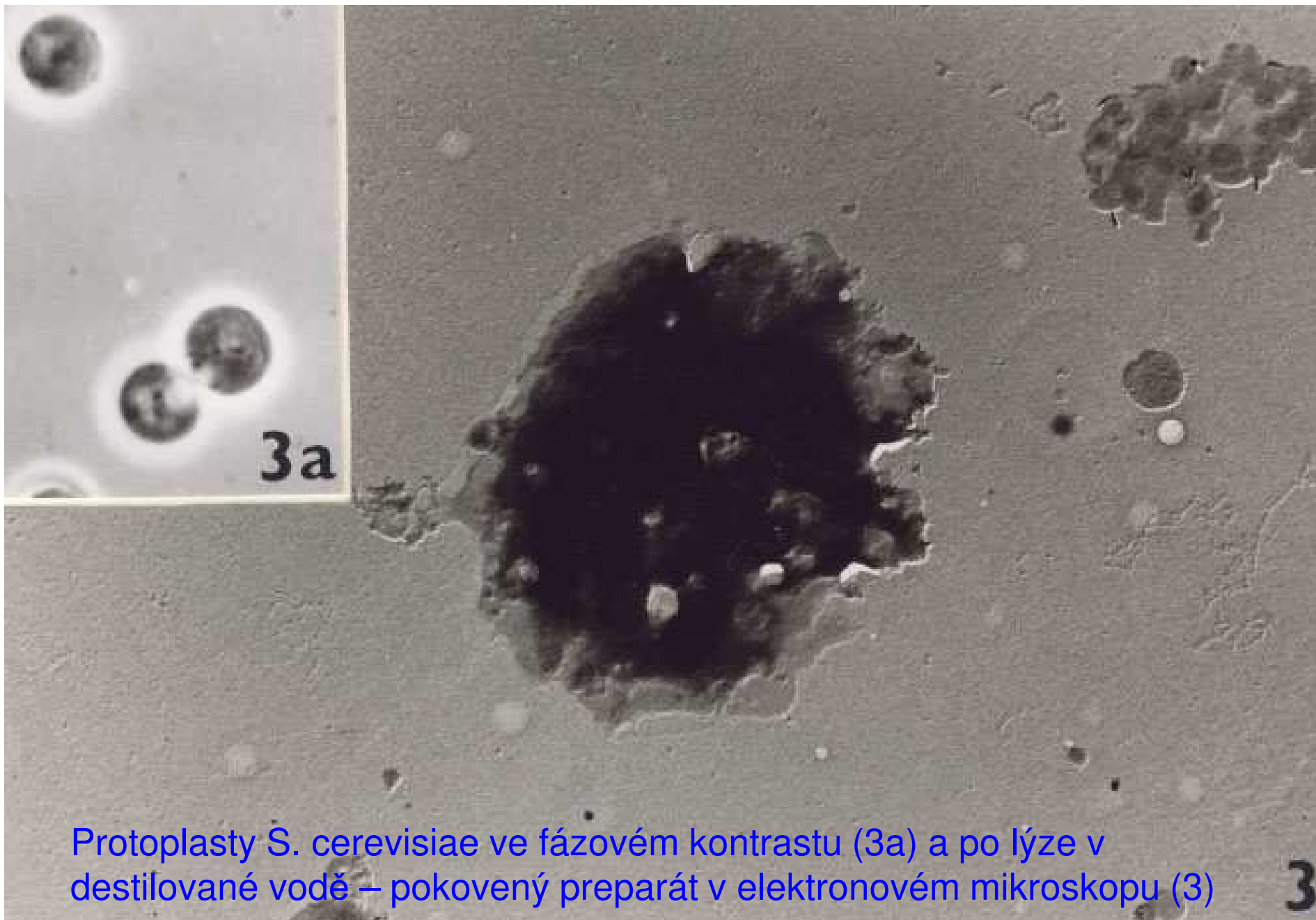
- Mechanické rozbití kvasinkových buněk v hypertonickém roztoku
- Autolýza buněčné stěny
- Aplikace enzymů lyzujících buněčnou stěnu
 - Výběr osmotika - sorbitol, mannitol, KCl, MgSO₄ a koncentrace
 - Aplikace látek rušících S-S vazby v buněčné stěně – merkaptoetanol, dithiothreitol aj



Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a čerstvě vytvořené protoplasty

Trigonopsis variabilis

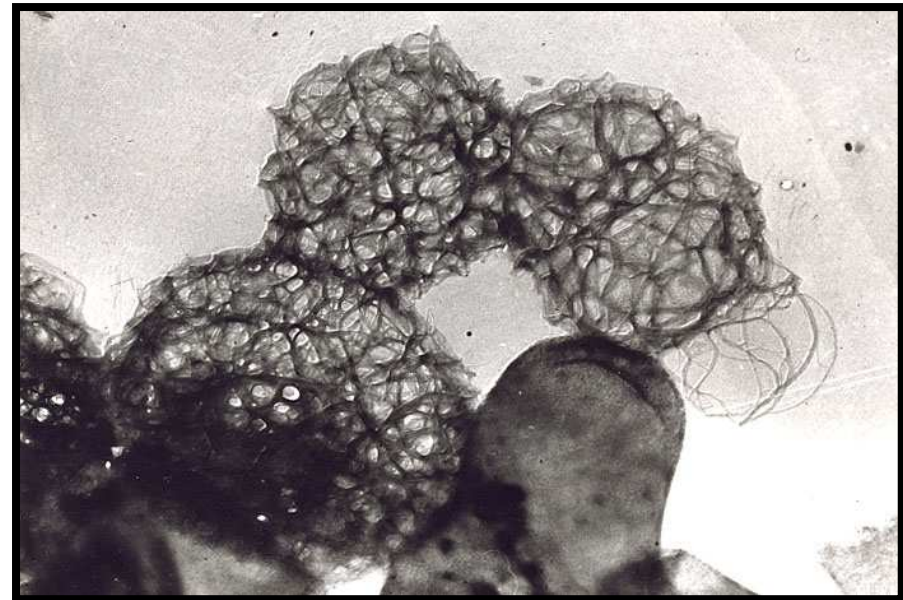
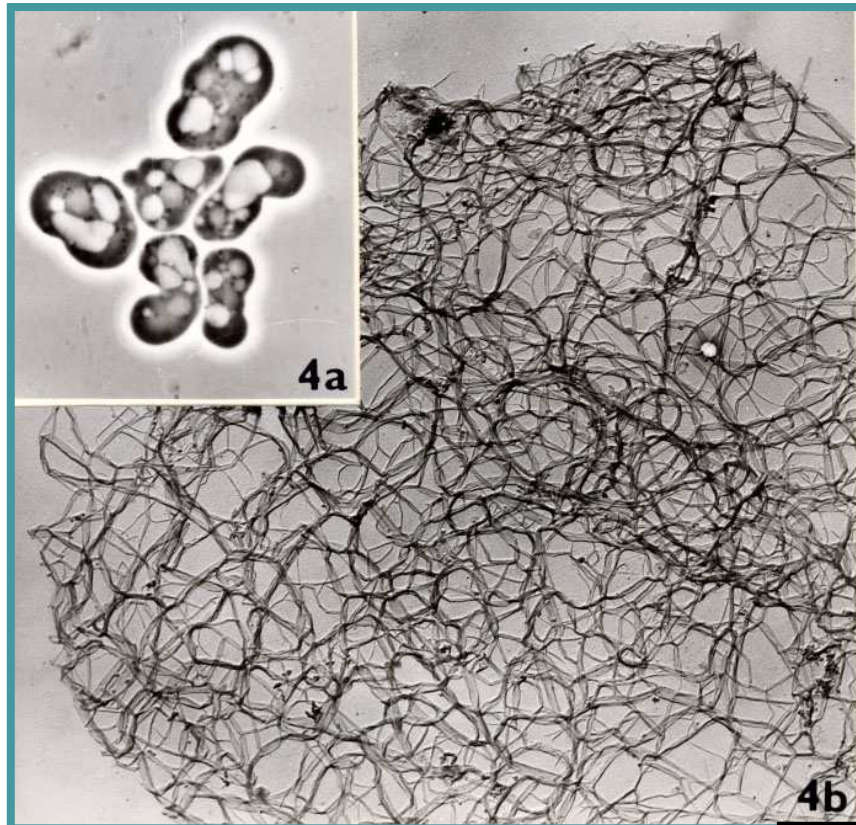




Protoplasty *S. cerevisiae* ve fázovém kontrastu (3a) a po lýze v destilované vodě – pokovený preparát v elektronovém mikroskopu (3)

Kultivace protoplastů *S. cerevisiae* v tekutém mediu.

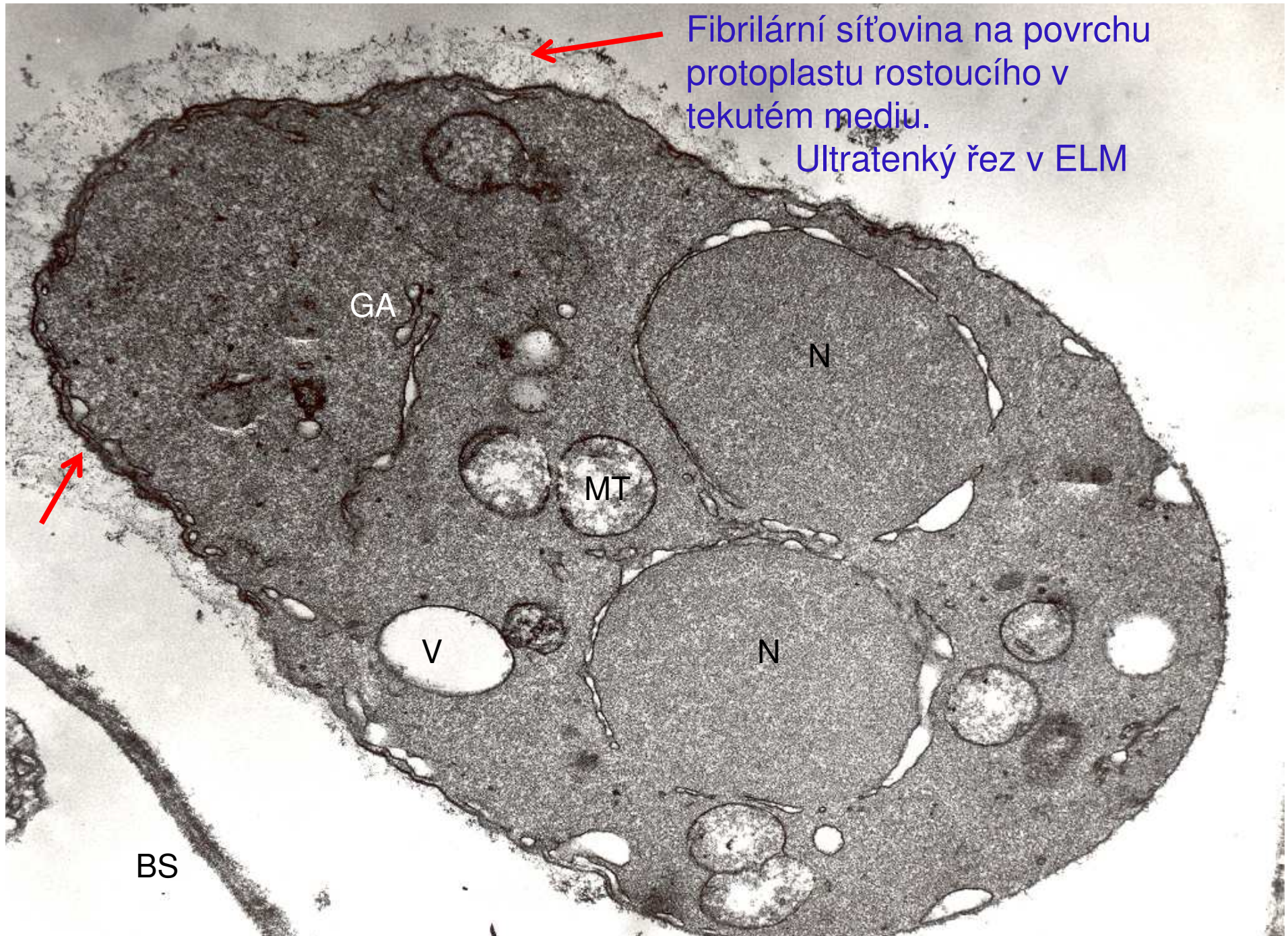
Protoplasty rostou polárně nebo multipolárně, vakuolizují, probíhá karyokineze, cytokineze je však zablokována. Na povrchu rostoucích protoplastů se tvoří fibrilární síťovina tvořená β -1,3 glukanem, mannan-proteiny jsou uvolňovány do media



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

Fibrilární síťovina na povrchu
protoplastu rostoucího v
tekutém mediu.

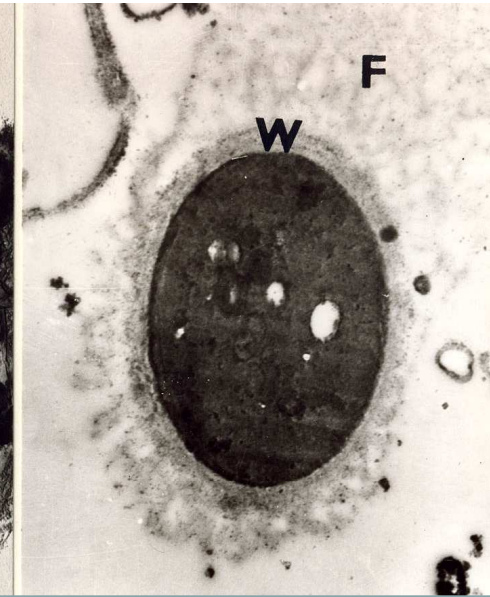
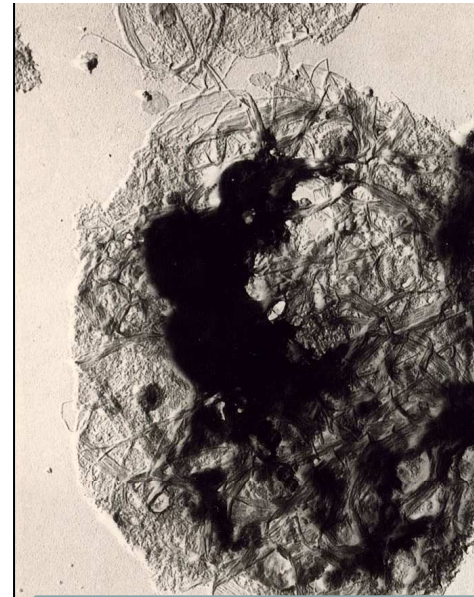
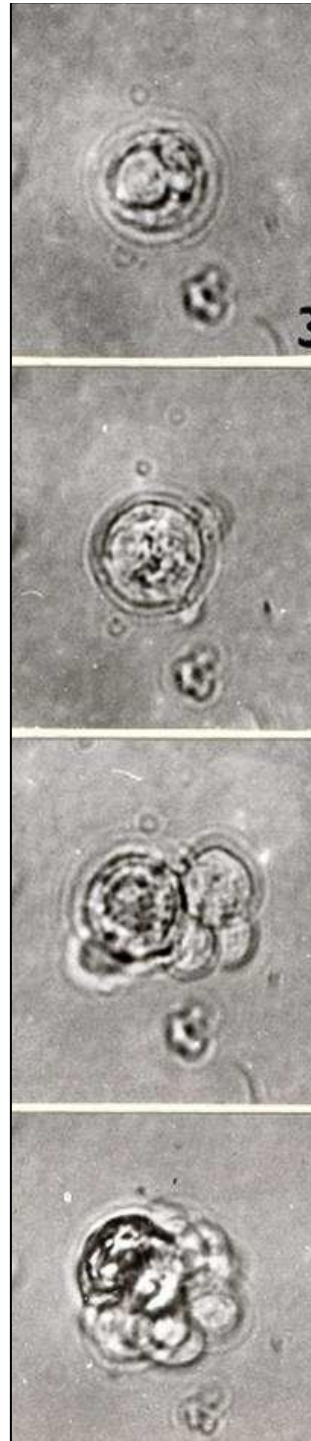
Ultratenký řez v ELM



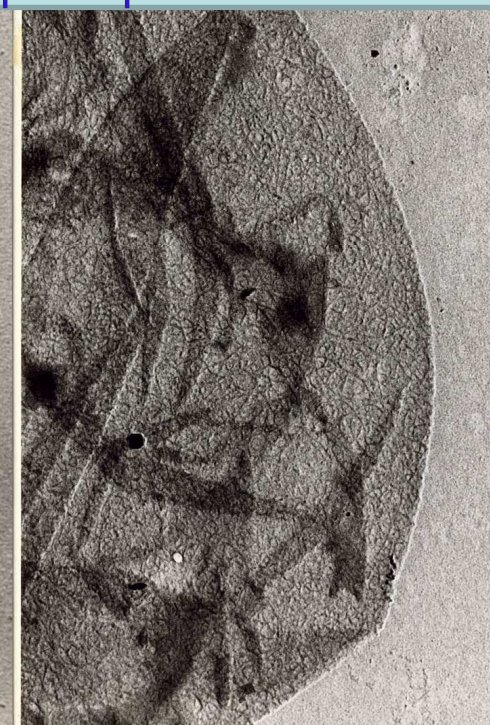
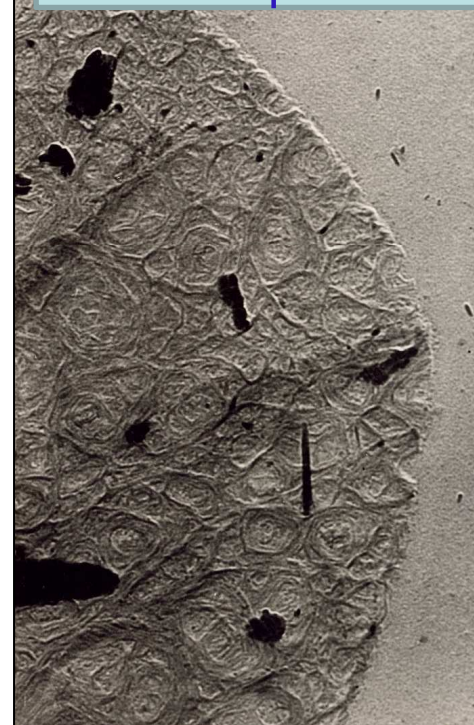
BS

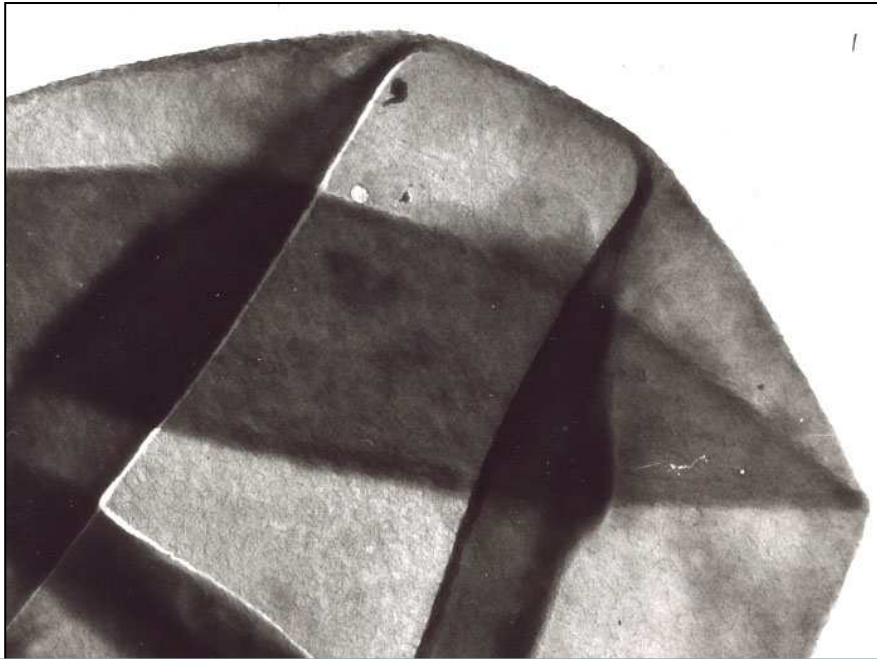
Regenerace protoplastů v želatinovém gelu:

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

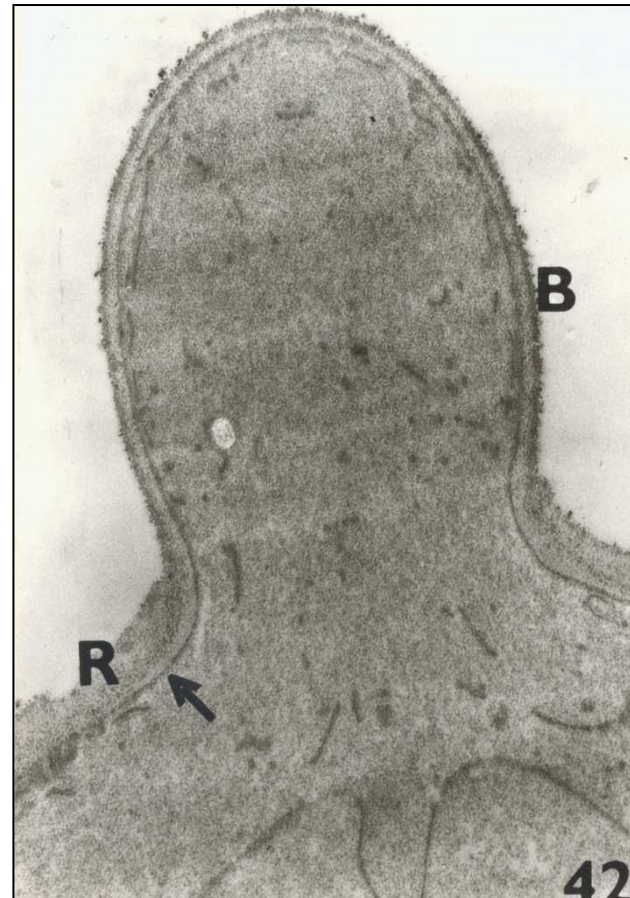


Tvorba kompaktní buněčné stěny na povrchu protoplastů

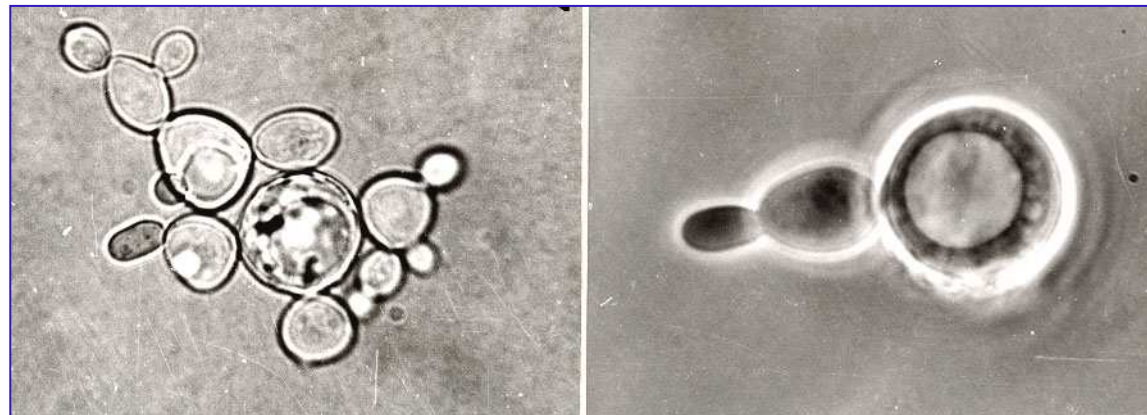
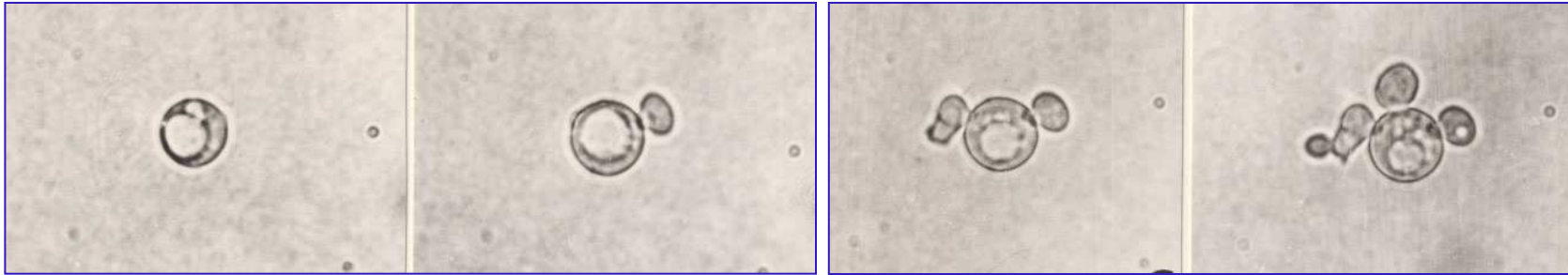




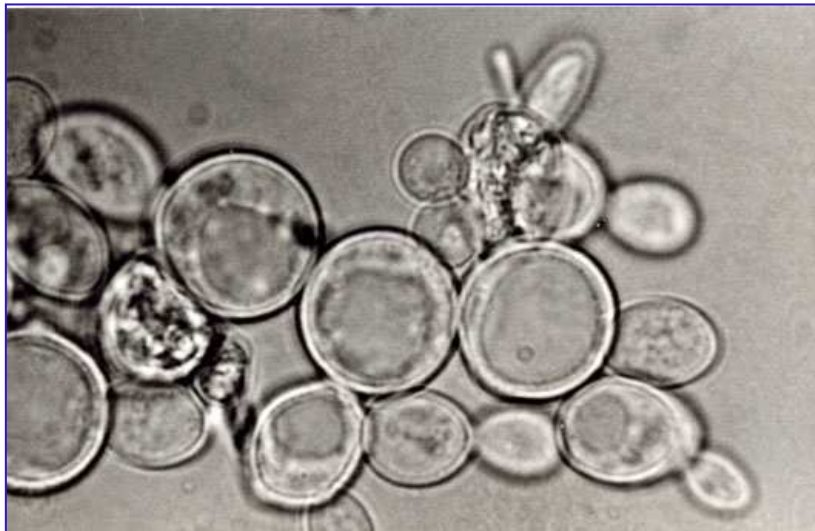
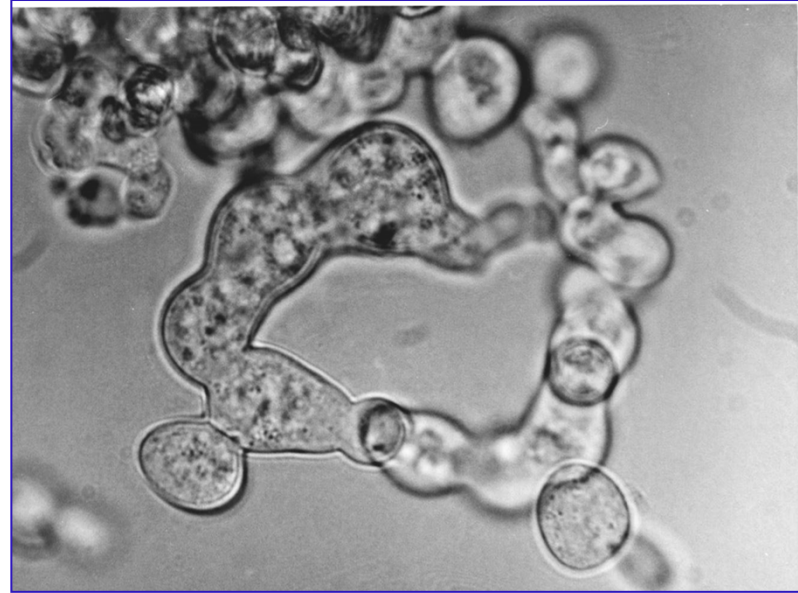
Povrch a řez kompaktní buněčnou stěnou



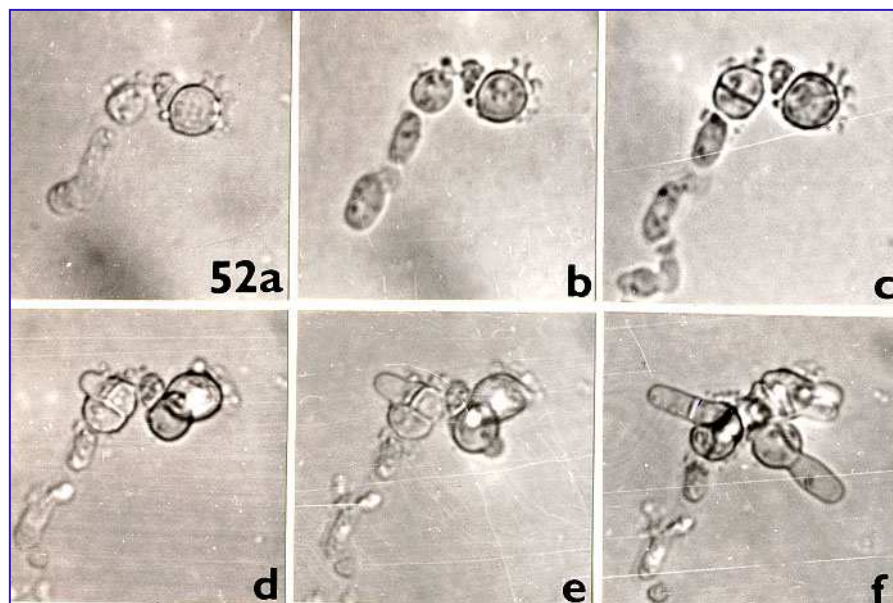
Morfologie regenerace protoplastů v agarovém gelu



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

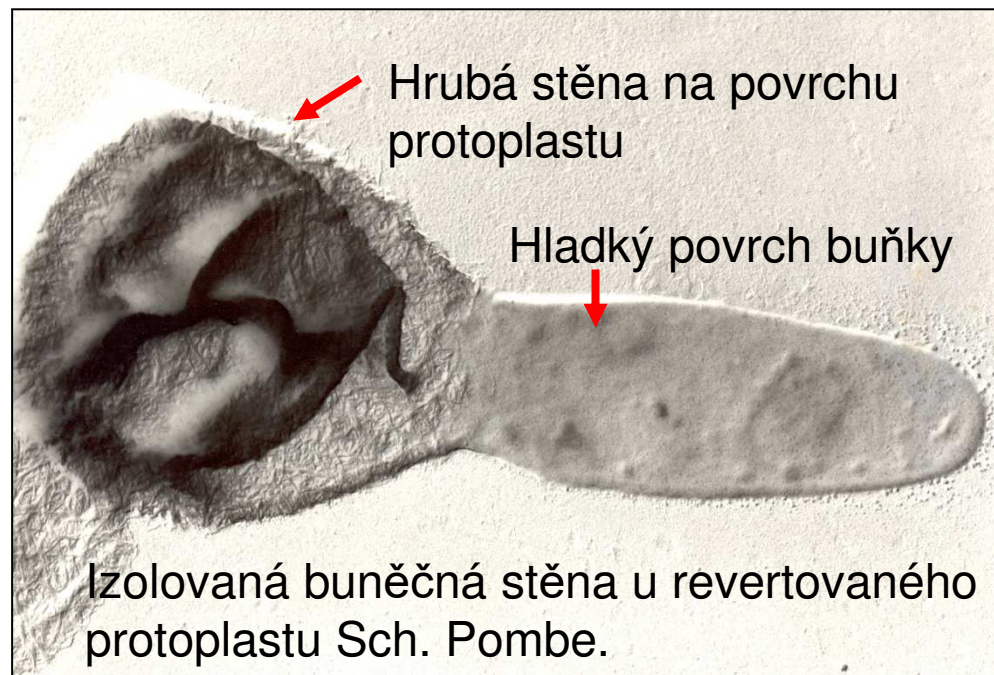


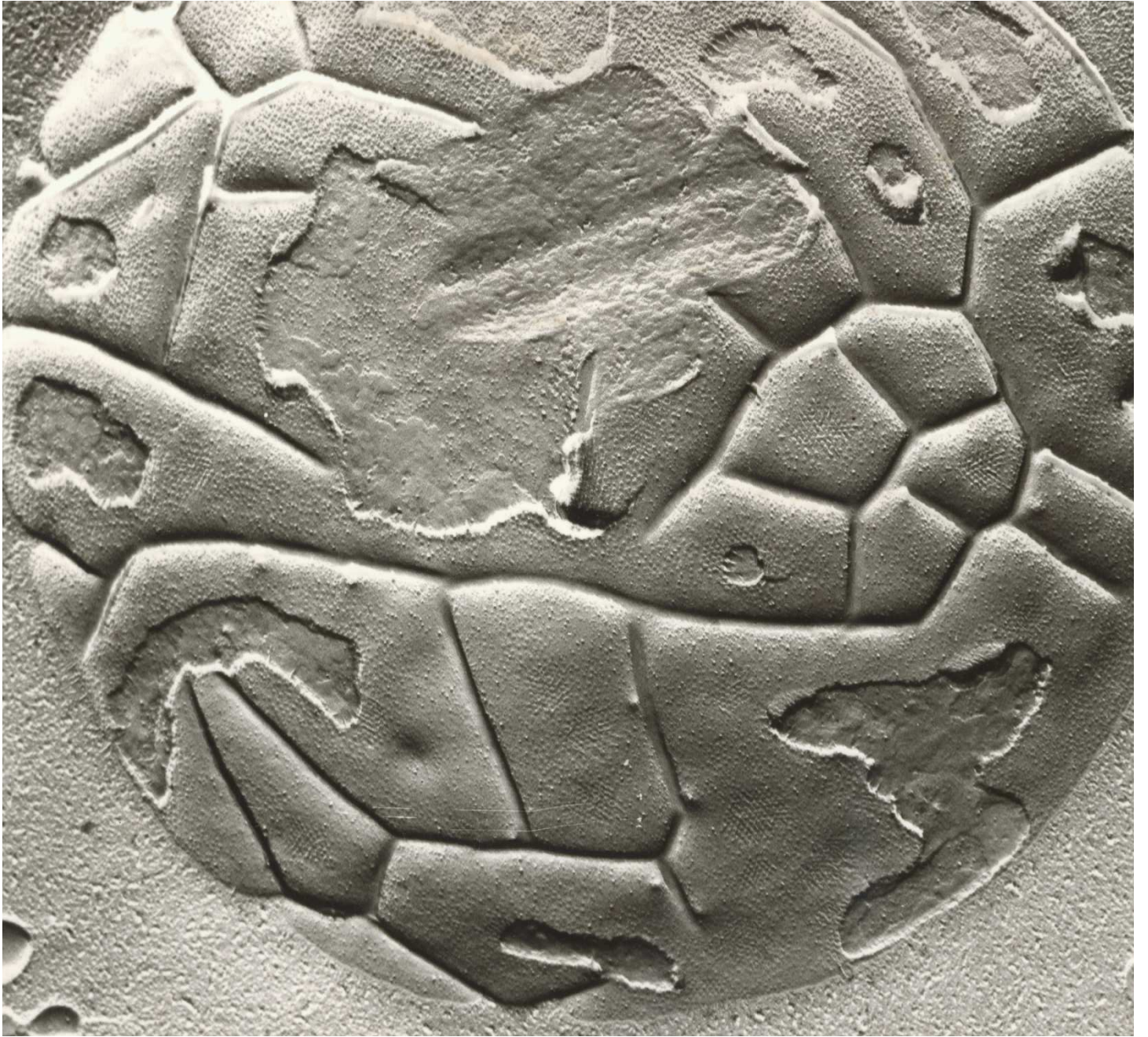
Regenerace protoplastů v **polyethylenglykolovém** mediu: po různě dlouhé době tubulárního růstu se objevují regenerované normální buňky.

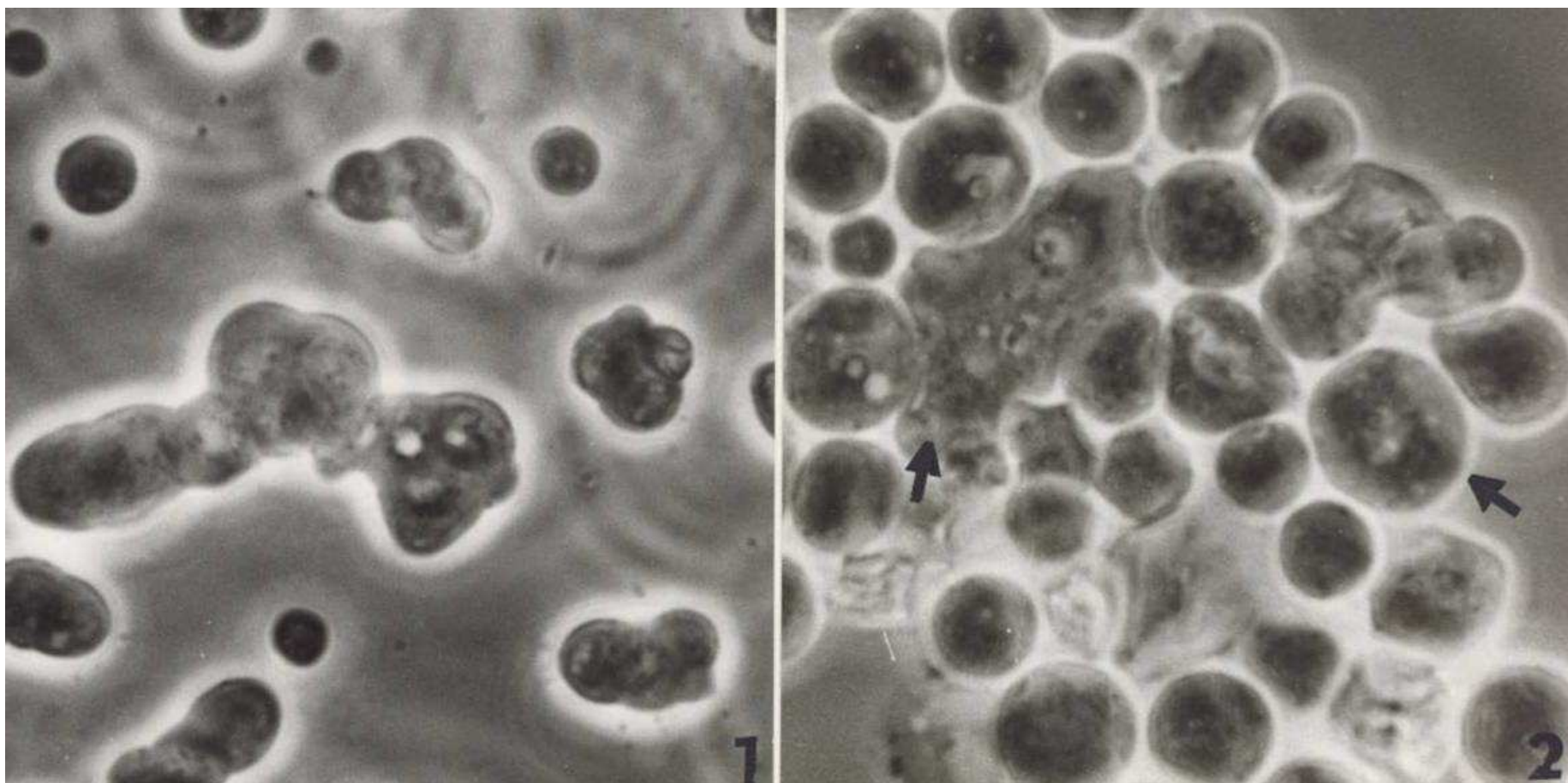


Vývoj protoplastu *Sch. pombe* na povrchu agarového media. Protoplast roste polárně, nejstarší části se zakulacují a mají zřetelnou pevnou stěnu. Pak vzniká septum a v další generaci se již objevují cylindrické buňky typické pro *Sch. pombe*.

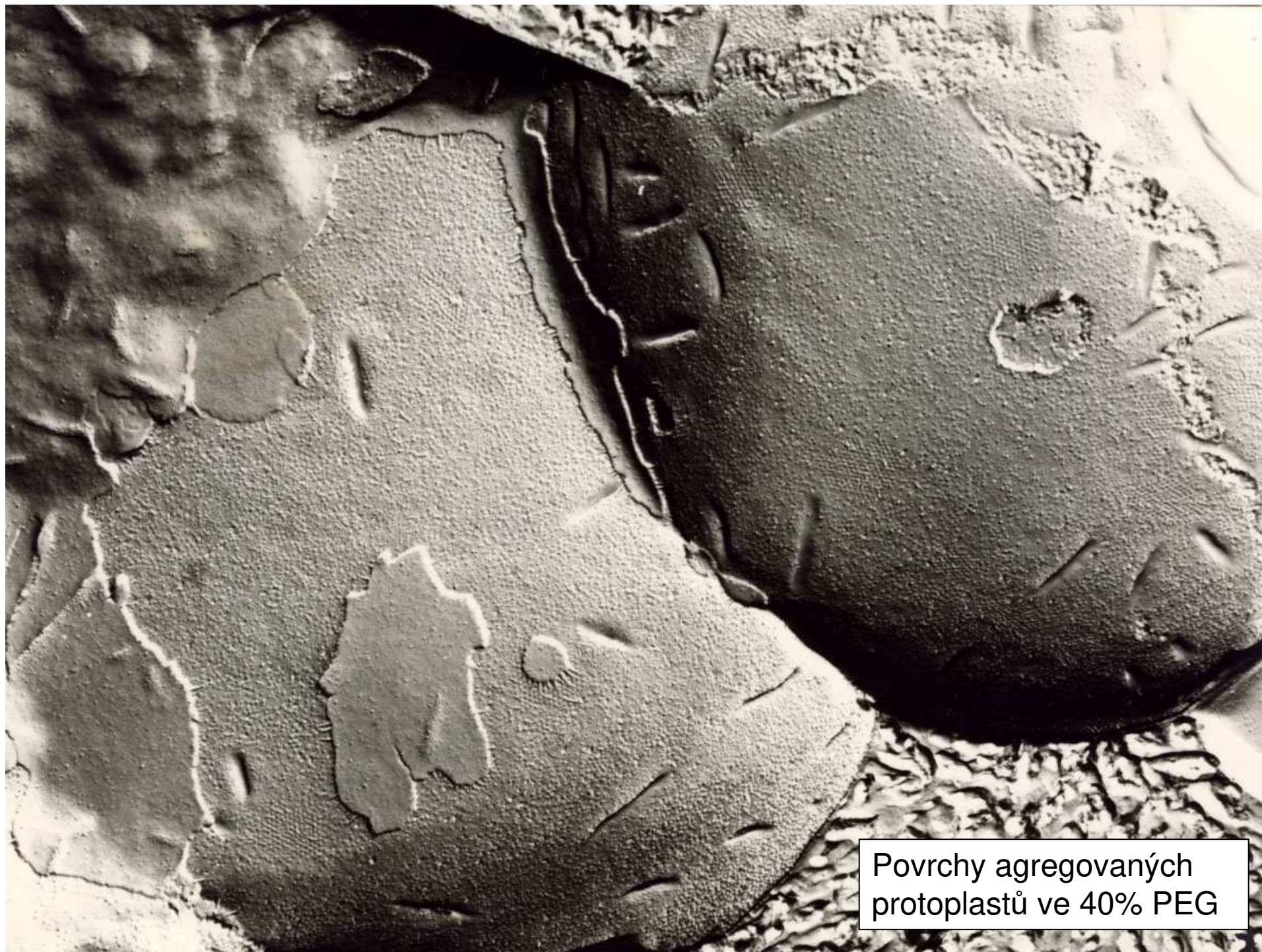
Protoplasty některých kvasinek (*Sch. pombe*) nevyžadují pro regeneraci na buňky obklopení gelem a mohou regenerovat i na povrchu agarových filmů nebo v tekutém mediu. Před reverzí na buňky rostou určitou dobu tubulárně, pokračuje tvorba fibrilární stěny, která po dosažení určité hustoty nahradí gelové prostředí.







Aglutinace protoplastů ve 40% polyethylenglykolu a vytváření polyprotoplastů po zředění živným médiem

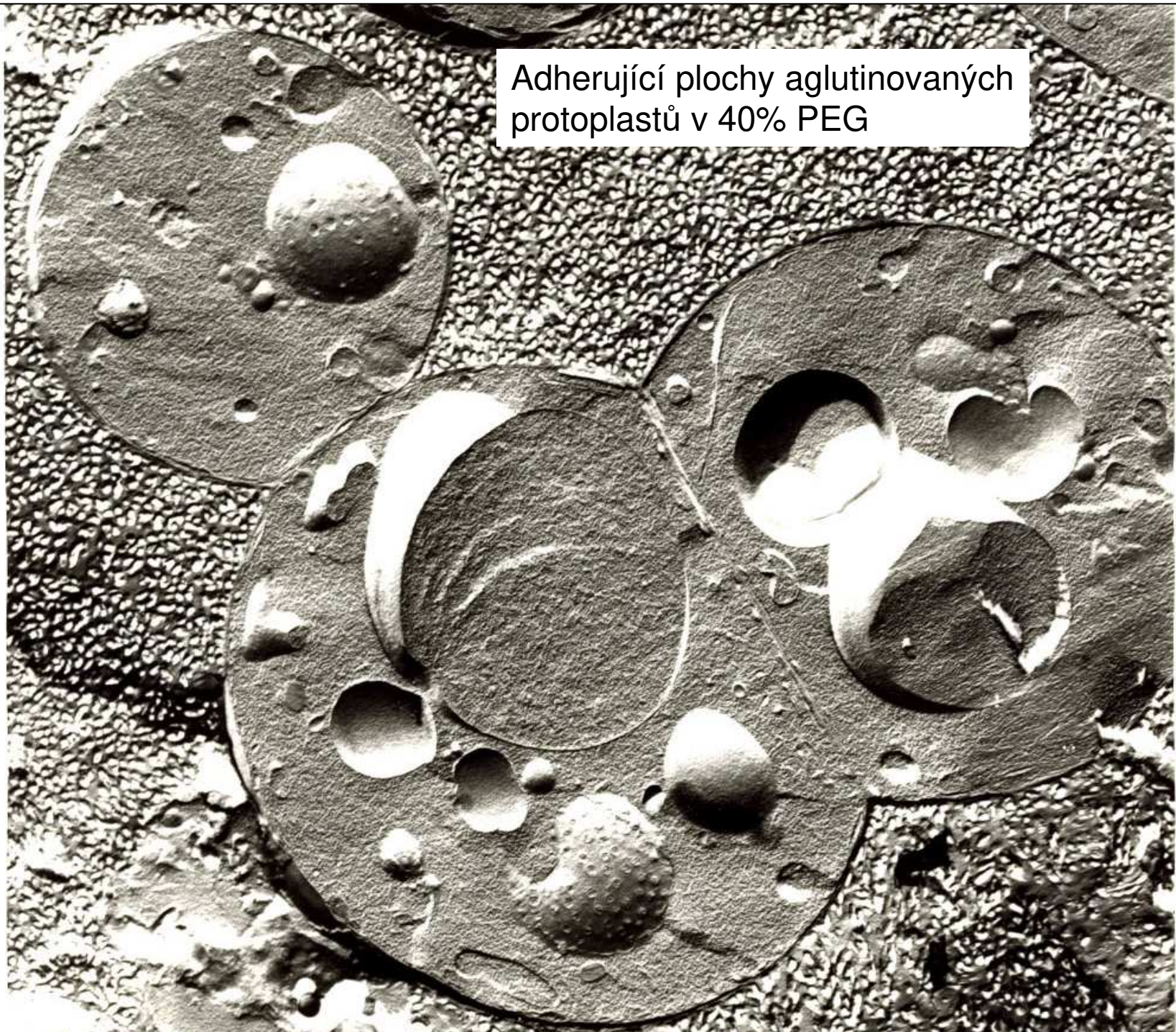


Povrchy agregovaných
protoplastů ve 40% PEG

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



Aplikace protoplastů kvasinek v buněčné biologii a genetice

1. Studium funkce buněčné stěny

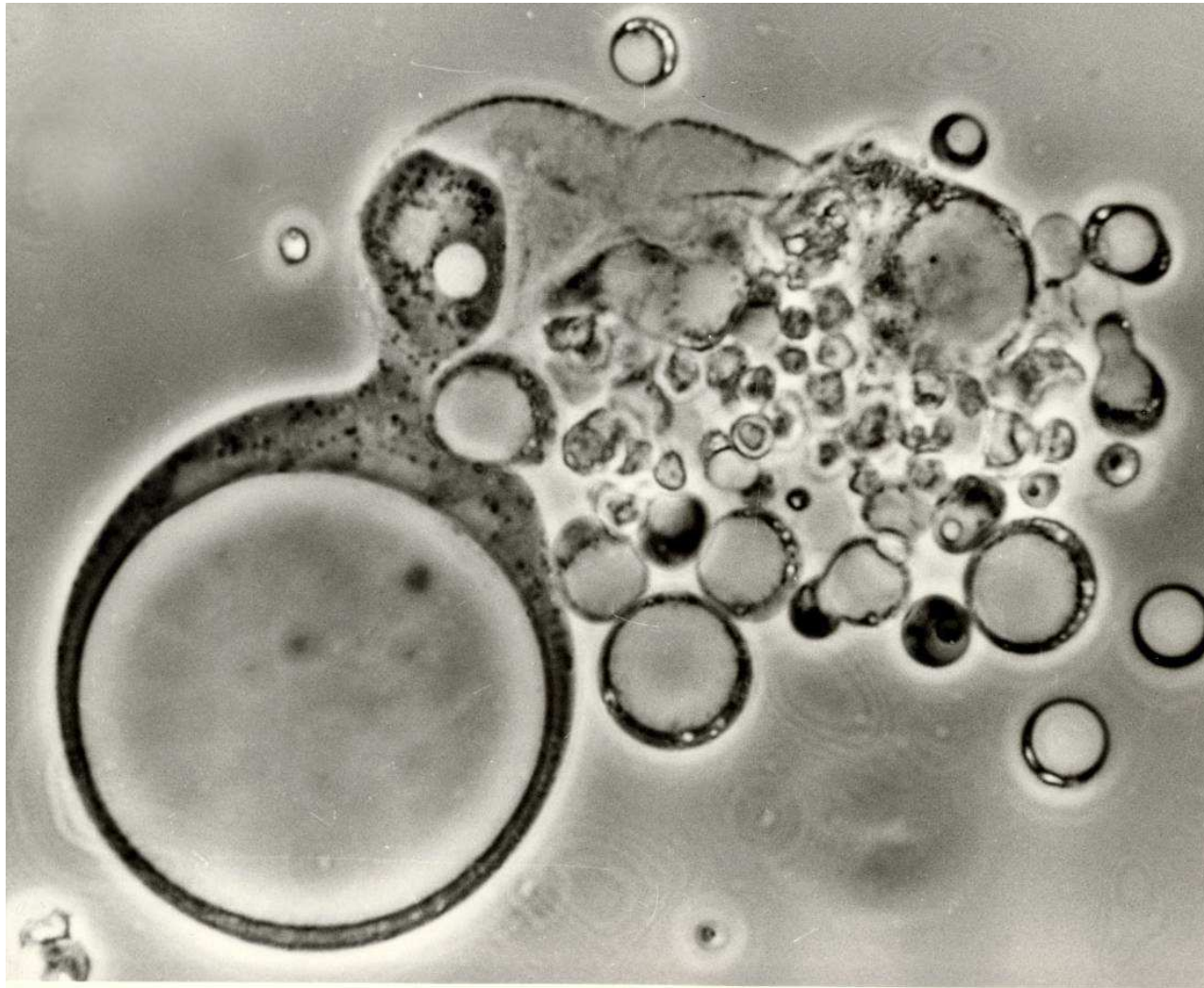
- mechanická bariéra
- signální funkce – receptce stresových faktorů, feromonů aj
- receptce signálů pro start cytokineze
- syntéza komponent buněčné stěny

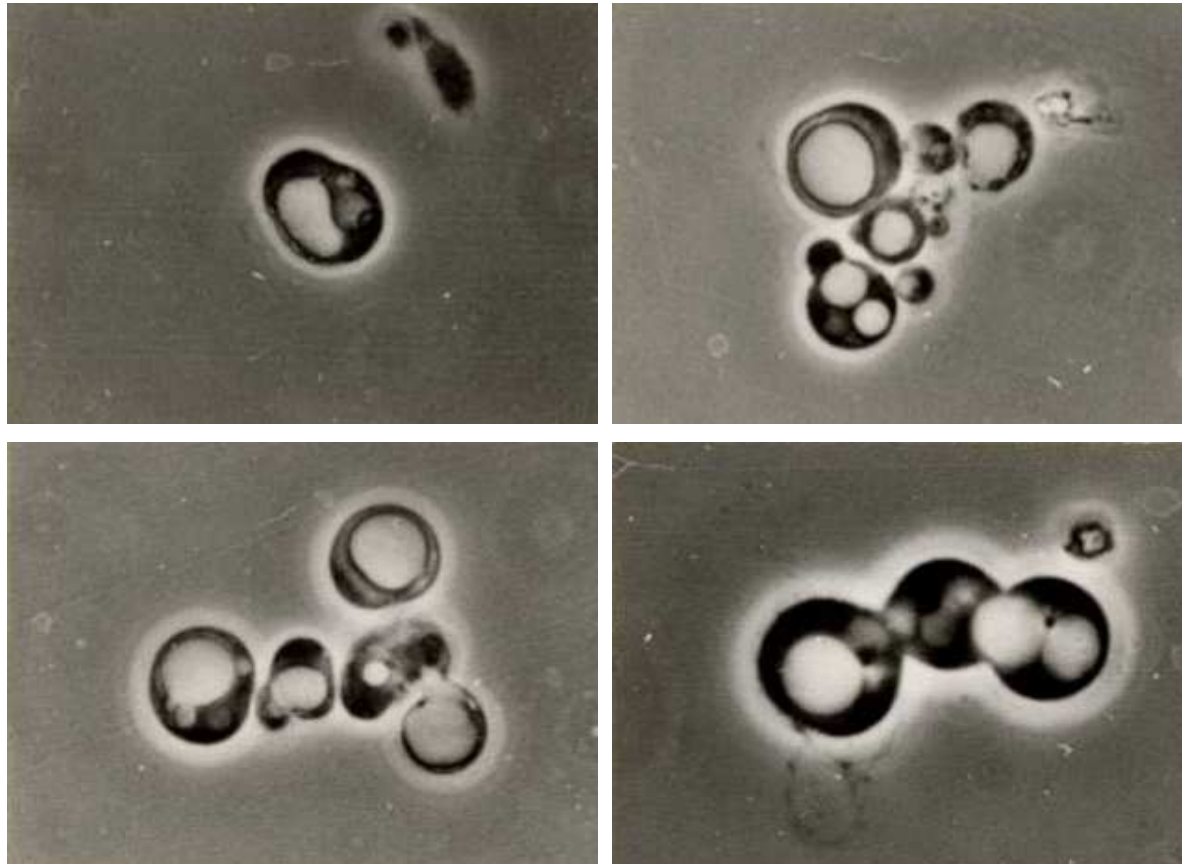
2. Studium struktury plasmatické membrány

3. Studium nepohlavní hybridizace kvasinek cestou fúze protoplastů

4. Transformace kvasinek izolovanou DNA

Mezidruhová fuze *S.cerevisiae his⁻* x *S.pombe trp⁻* tyto druhy jsou fylogeneticky vzdálené, *S. cerevisiae* má 16 chromosomů, *S. pombe* pouze 3. Protoplasty mohou fúzovat, v minimálním agaru i rostou, na hybridní buňky však nerevertují

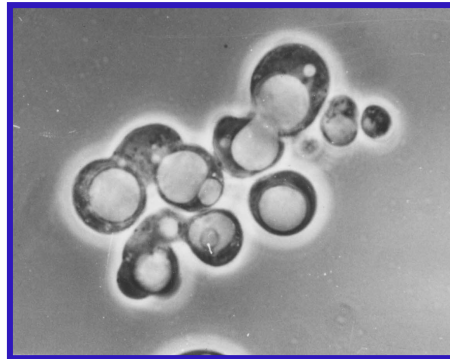




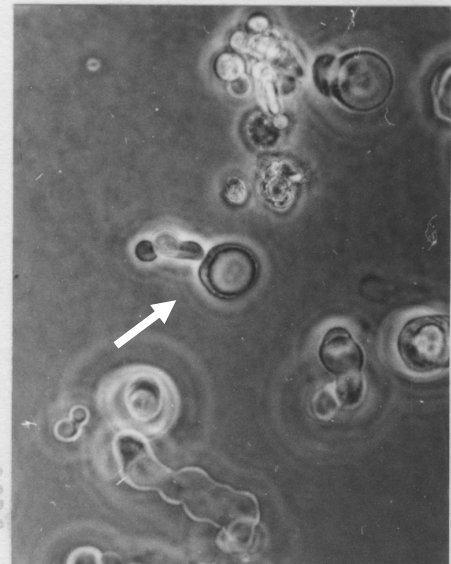
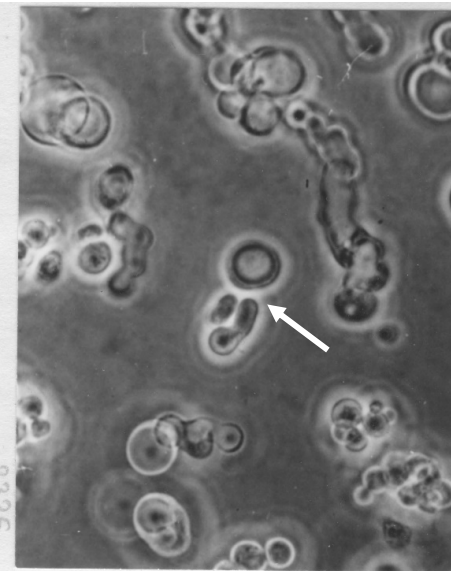
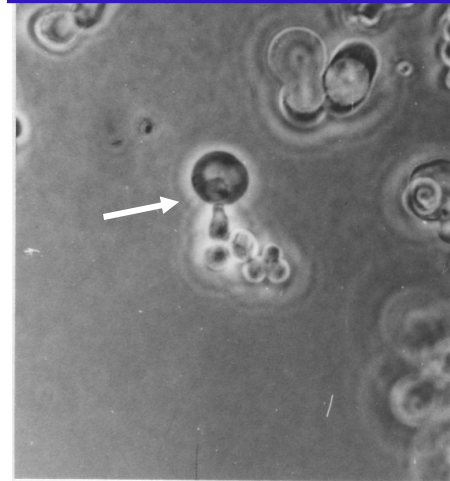
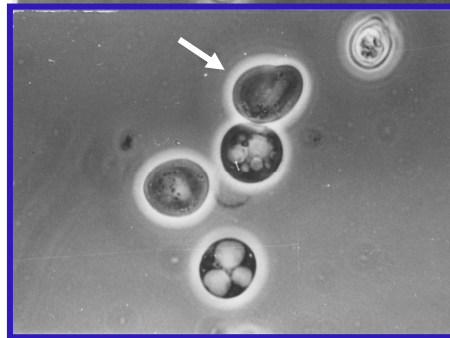
Růst protoplastů v tekutém mediu nebo na povrchu agarových bločků: jádra se dělí, cytoplasma vytváří vakuolizované útvary, avšak cytokineze neprobíhá.

Závěr: Nekompletní fibrilární stěna pouze moduluje tvar zvětšující se cytoplasmy, nevede však k obnovení normální buněčné morfogeneze

Protoplasty S.c.
 $\alpha + a$, pouze
neorientovaný
růst, žádná fuze



α protoplasty +
a buňky:
párovací
výběžky tvoří
pouze buňky

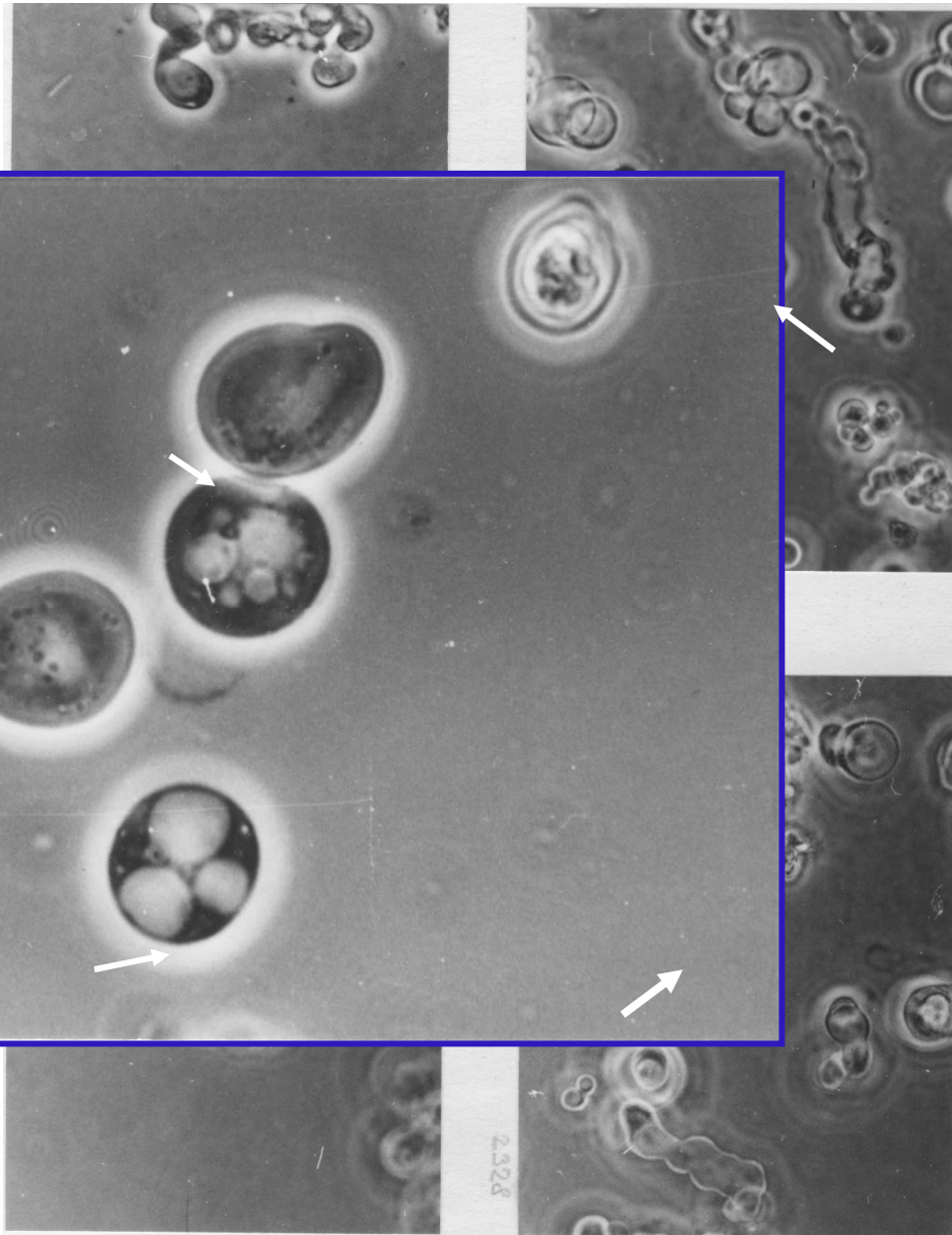


Orientovaný růst
buněk směrem k
rostoucímu
protoplastu –
žádná fuze

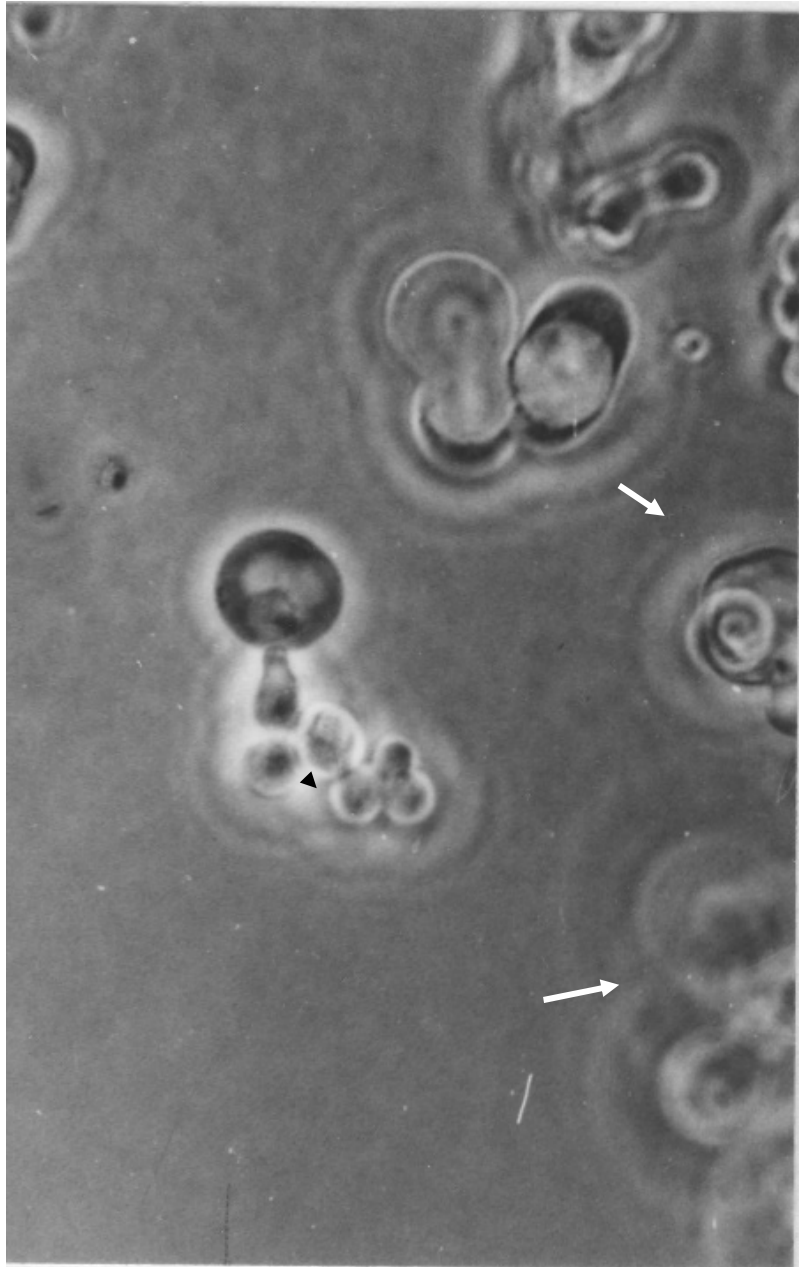
Protoplasty S.c.

$\alpha + a$, pouze
neorientovaný
růst, žádná fuze

α protoplasty +
a buňky:
párovací
výběžky tvoří
pouze buňky



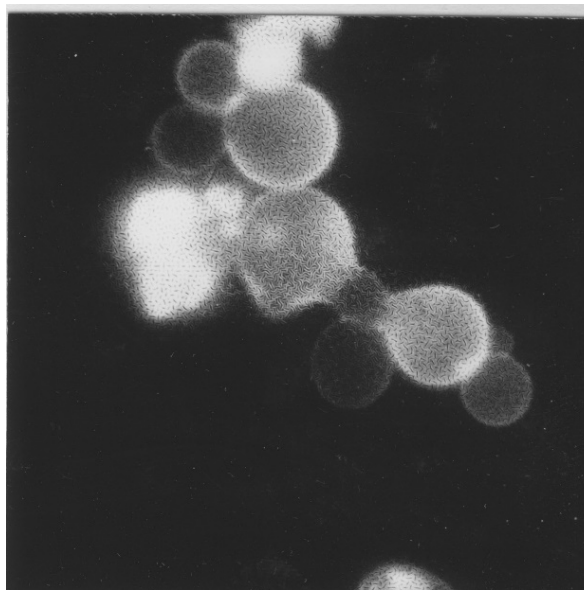
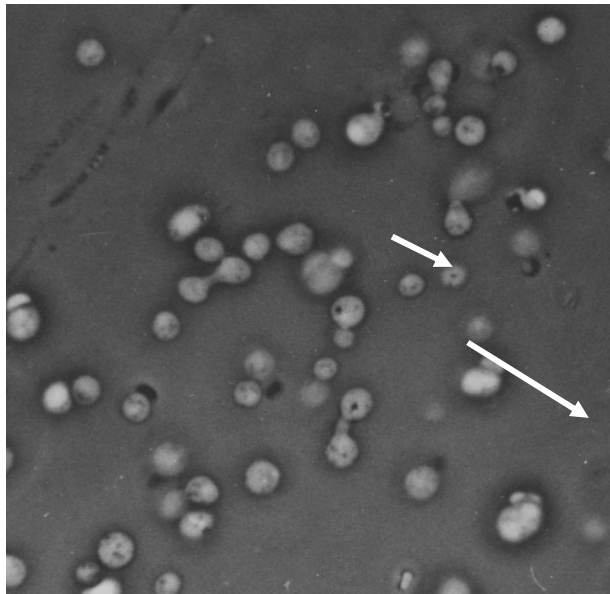
Orientovaný růst
buněk směrem k
rostoucímu
protoplastu –
žádná fuze



2328



Orientovaný růst
buněk směrem k
rostoucímu
protoplastu –
žádná fuze



Protoplasty opačných párovacích typů fúzuji teprve tehdy, zregenerují-li svoji buněčnou stěnu

