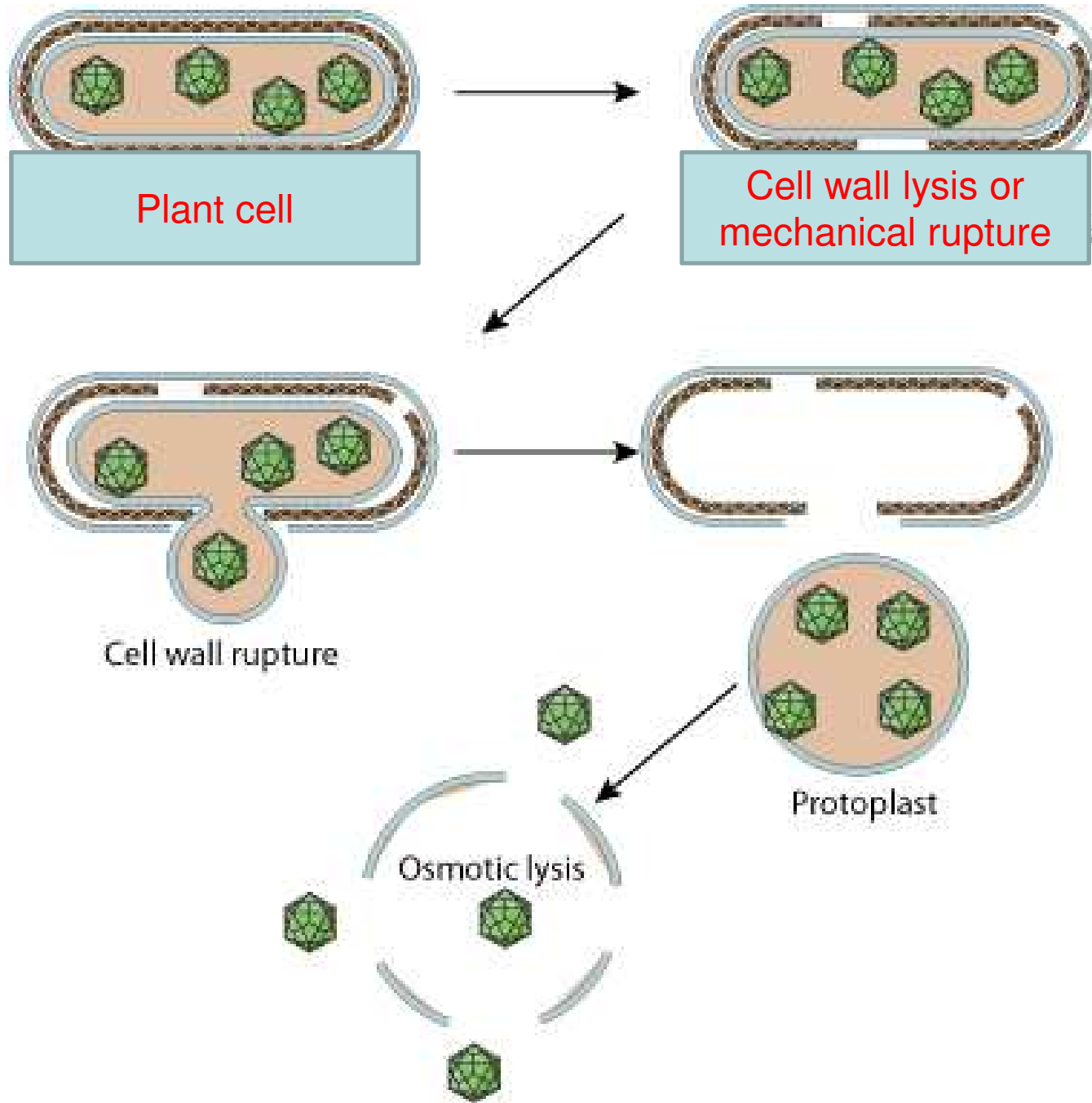


# Protoplasty kvasinek jako modelový objekt

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)

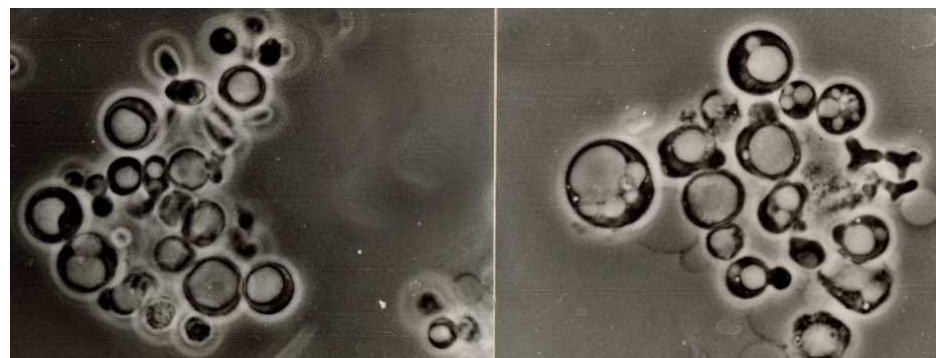
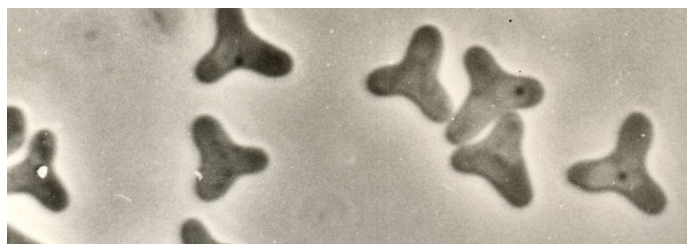
## 2. Metody přípravy protoplastů

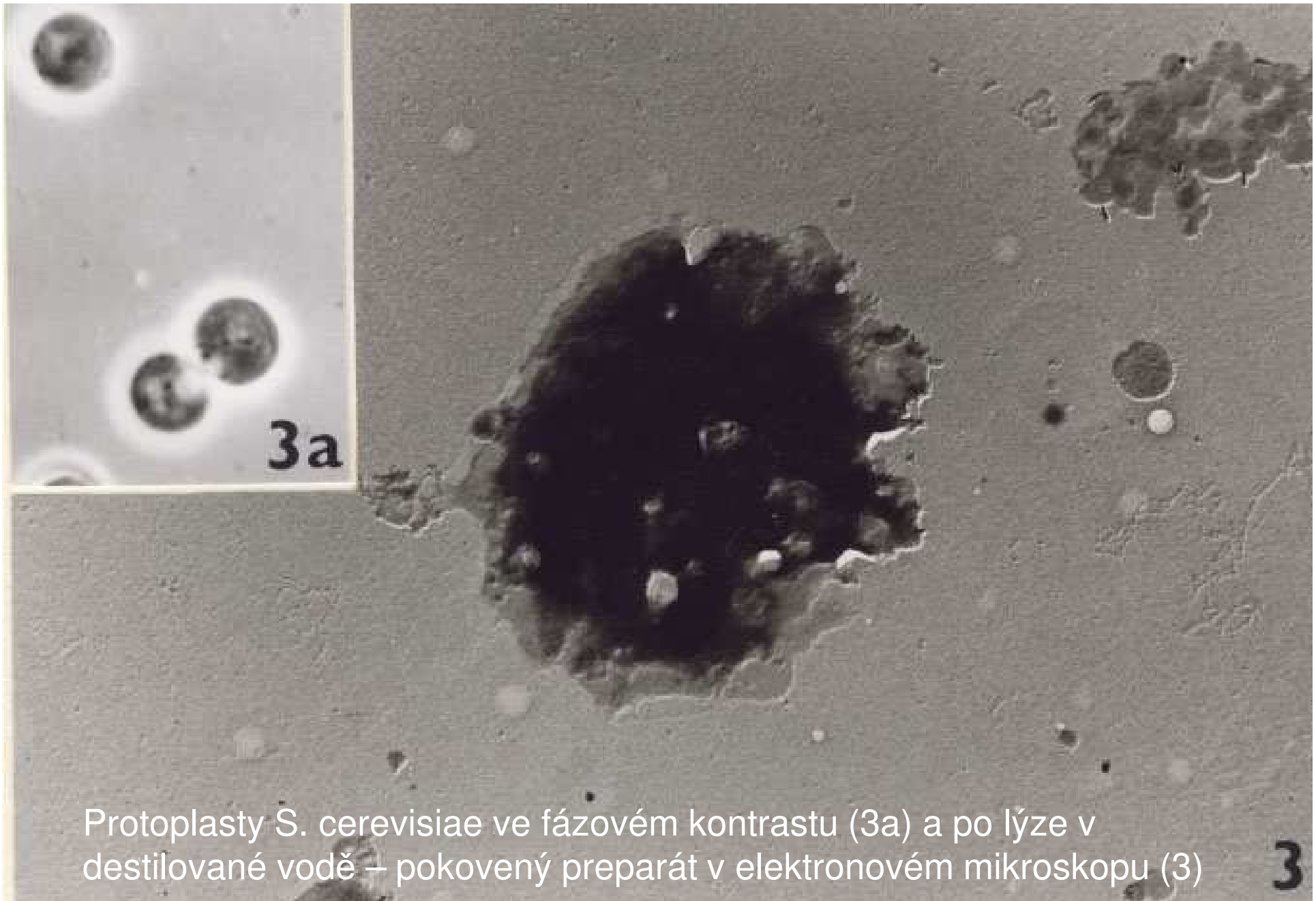
- Mechanické rozbití kvasinkových buněk v hypertonickém roztoku
- Autolýza buněčné stěny
- Aplikace enzymů lyzujících buněčnou stěnu
  - Výběr osmotika - sorbitol, mannitol, KCl, MgSO<sub>4</sub> a koncentrace
  - Aplikace látek rušících S-S vazby v buněčné stěně – merkaptoetanol, dithiothreitol aj

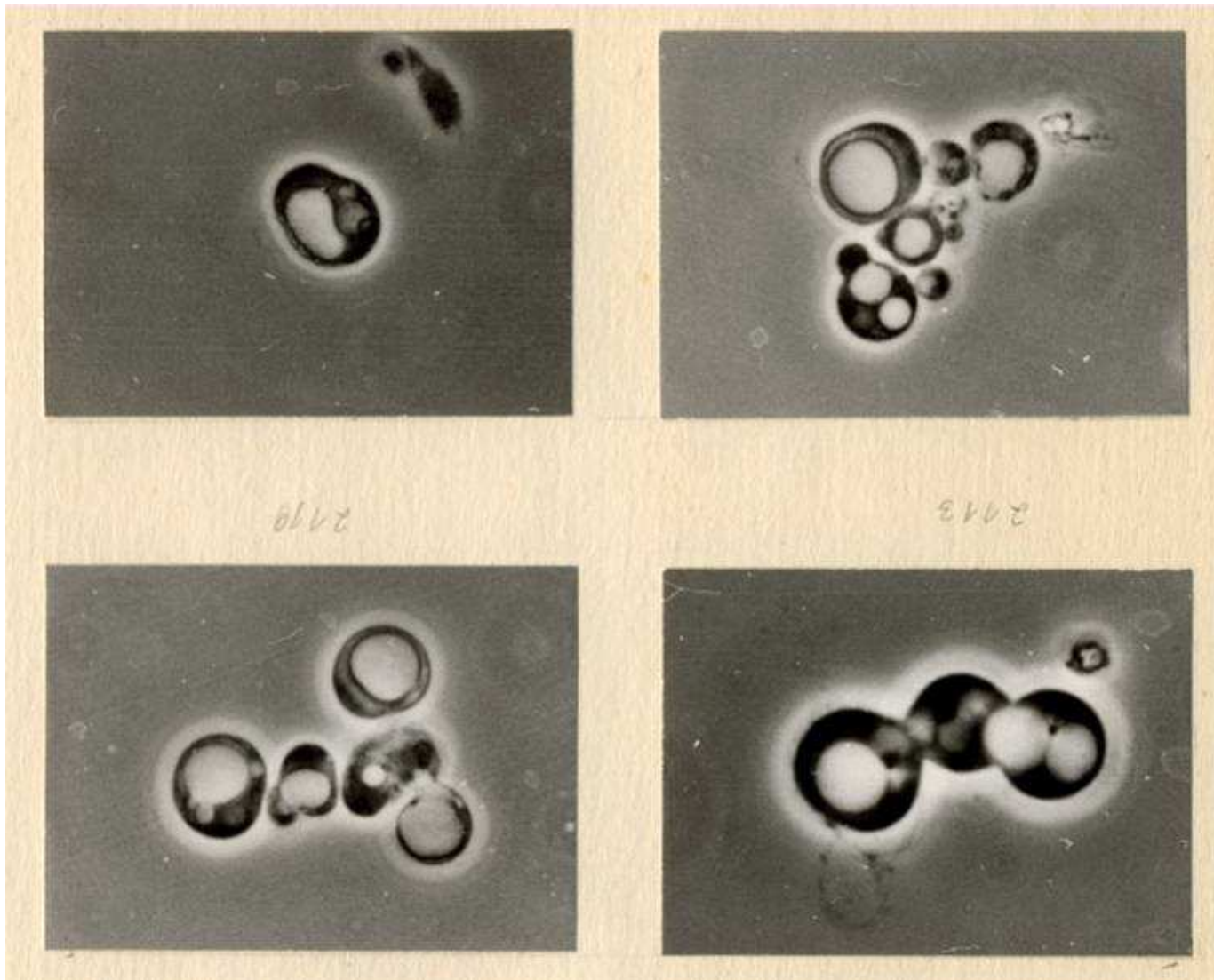


Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a čerstvě vytvořené protoplasty

### *Trigonopsis variabilis*





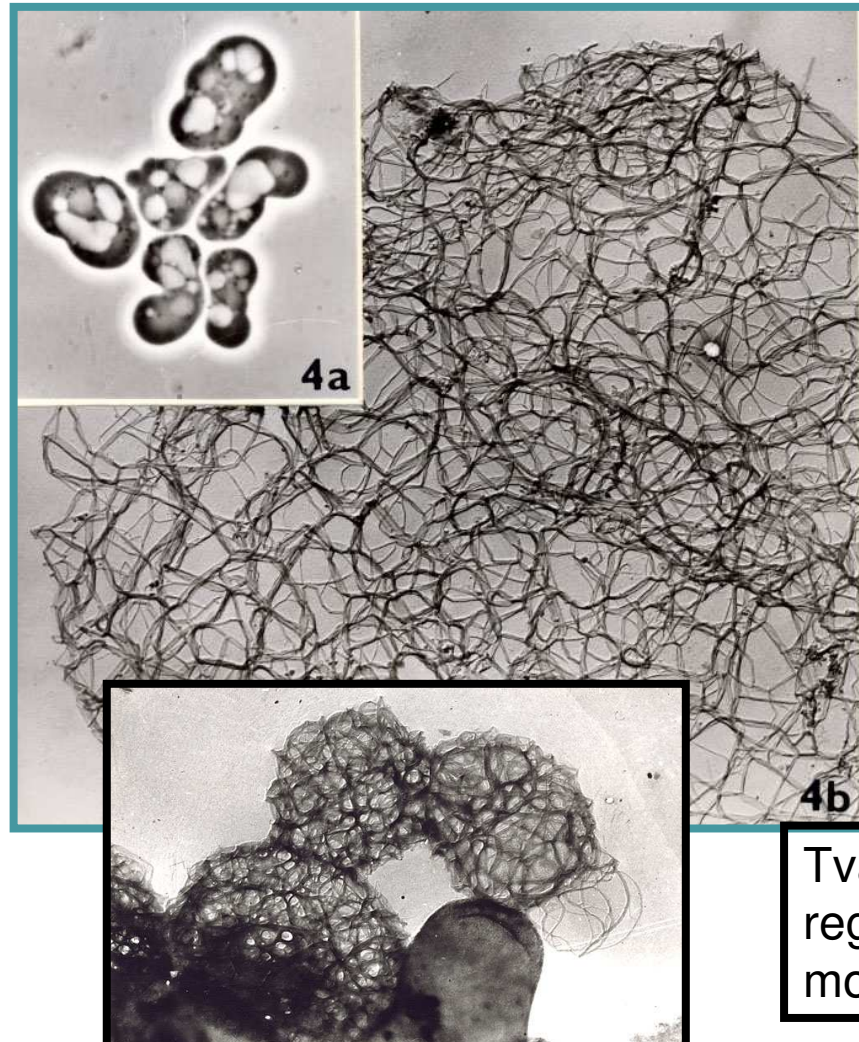


Růst protoplastů v tekutém mediu nebo na povrchu agarových bločků: jádra se dělí, cytoplasma vytváří vakuolizované útvary, avšak cytokineze neprobíhá.

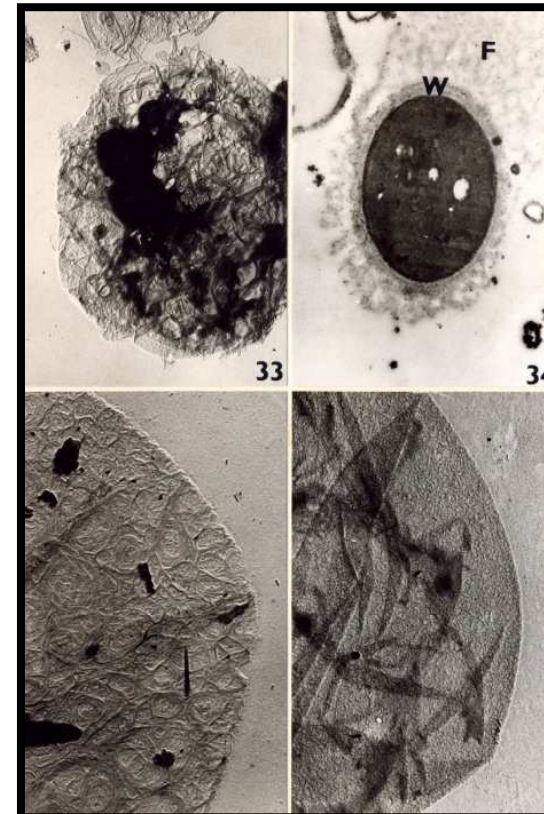
Závěr: Protoplasty – buňky bez buněčné stěny - se nemohou reprodukovat

# Regenerace buněčné stěny na povrchu protoplastů při kultivaci

v tekutém mediu

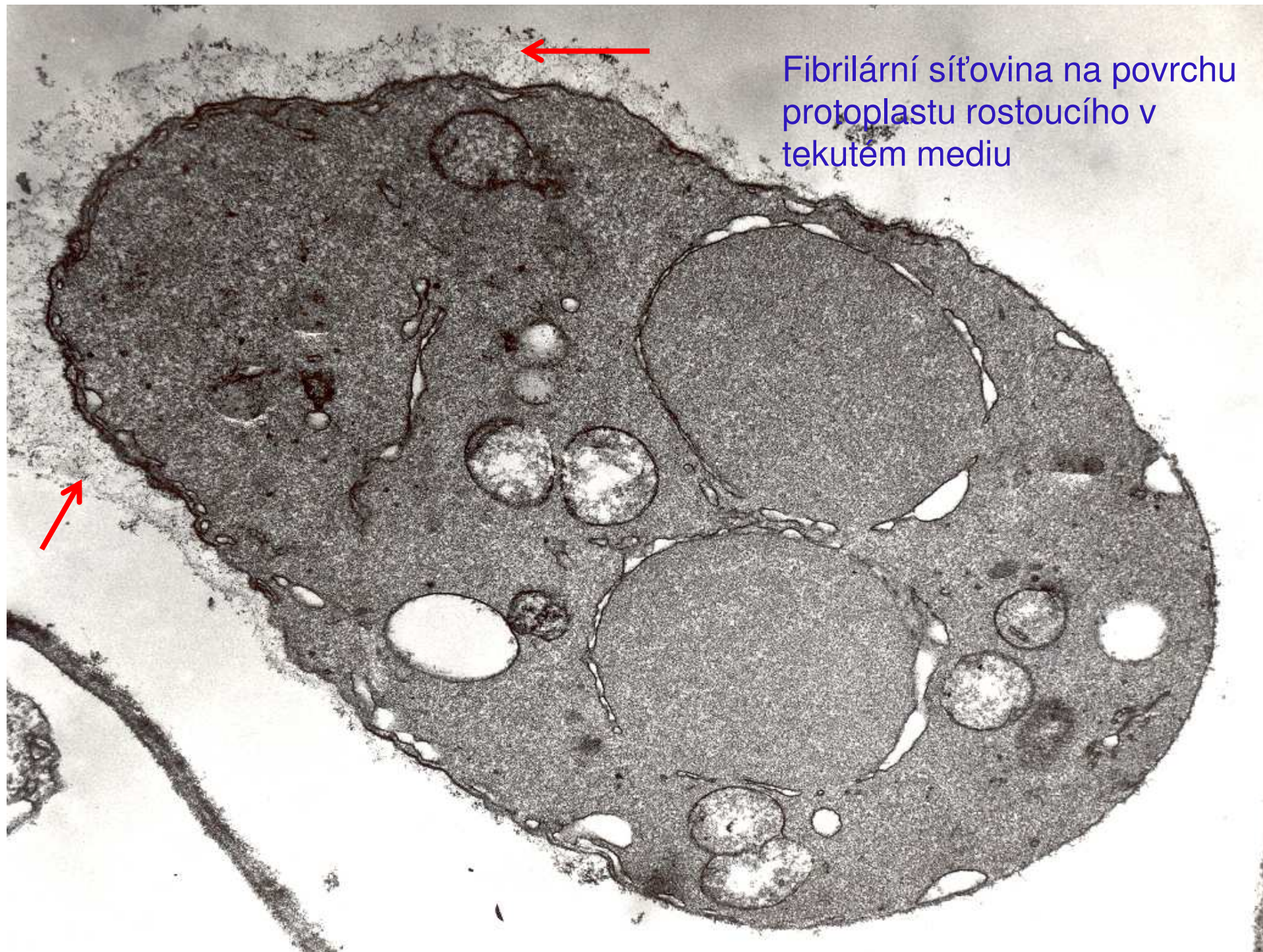


v gelu



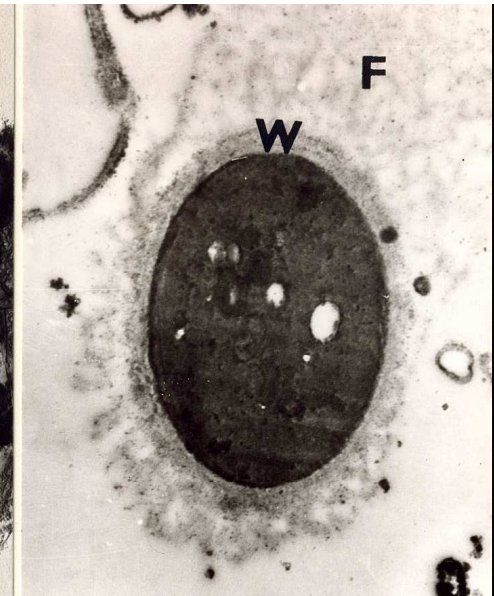
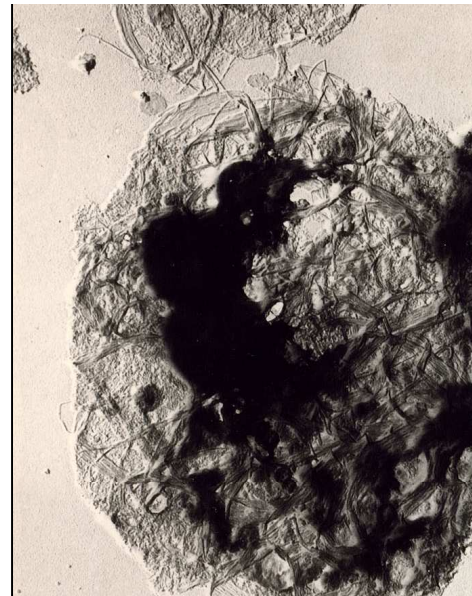
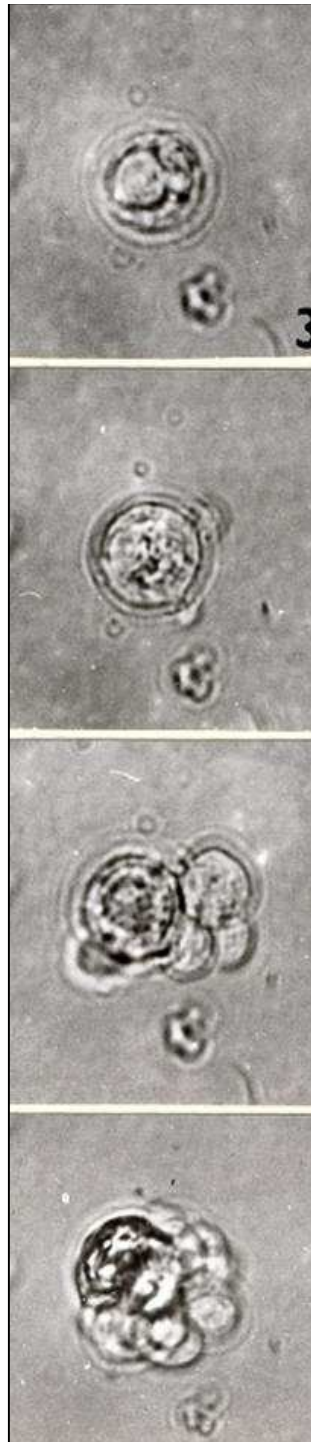
Tvar rostoucího protoplastu je není určován regenerující buněčnou stěnou, ta jen modifikuje morfologii rozpínající se cytoplasmy



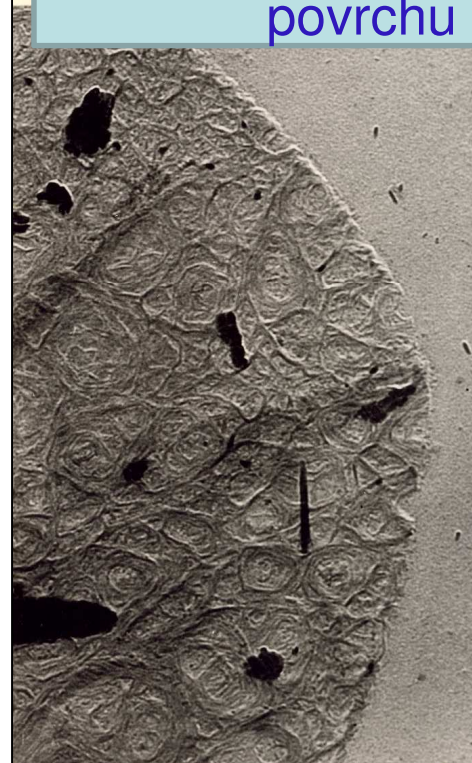


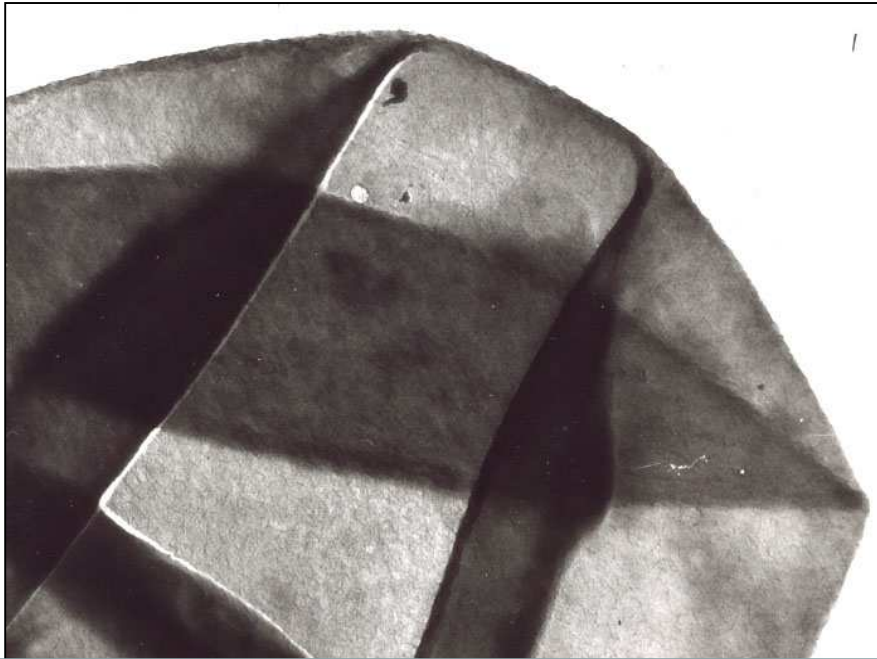
Fibrilární síťovina na povrchu  
protoplastu rostoucího v  
tekutém mediu

Regenerace  
protoplastů v  
želatinovém  
gelu

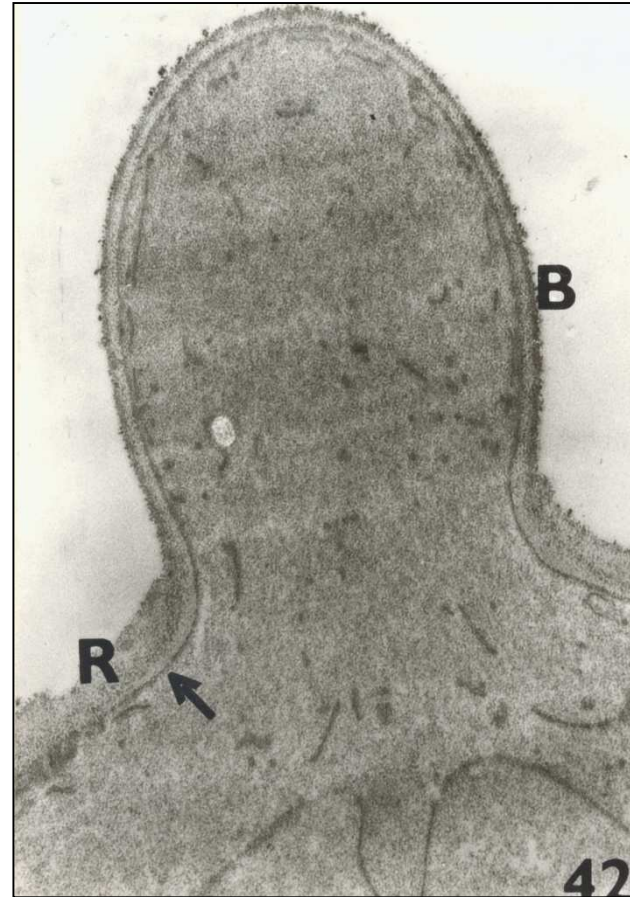


Tvorba kompaktní buněčné stěny na  
povrchu protoplastů

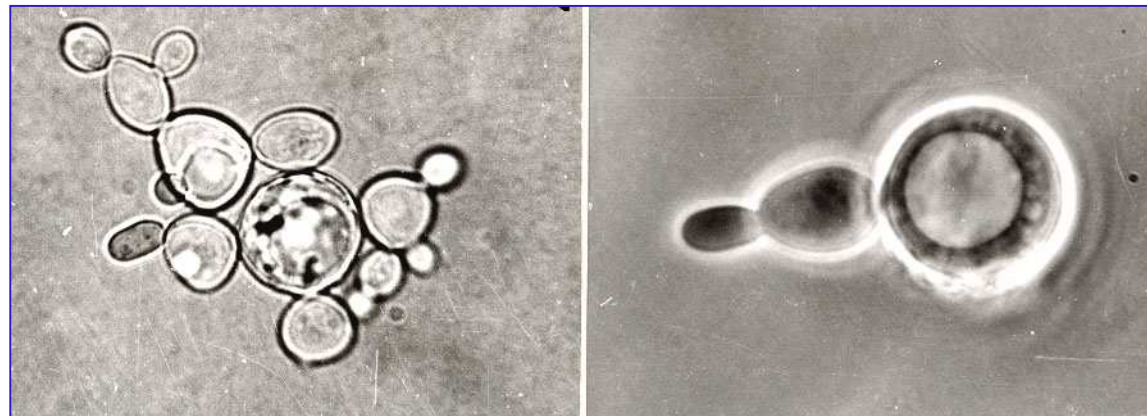
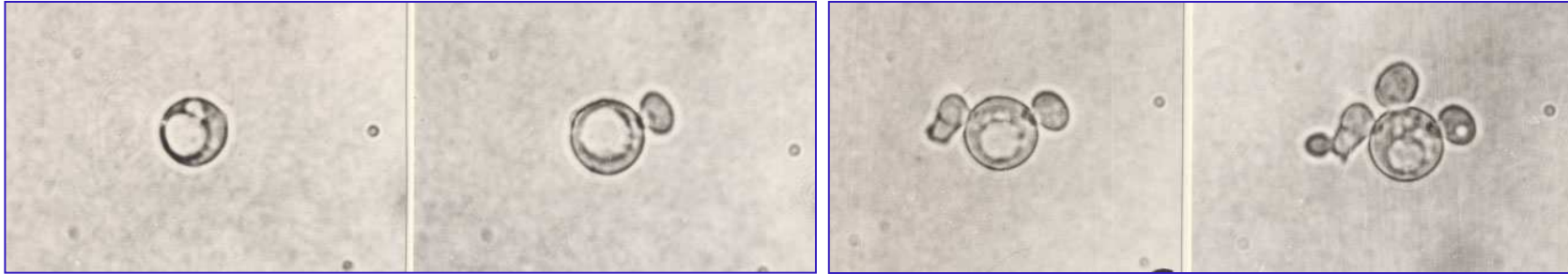




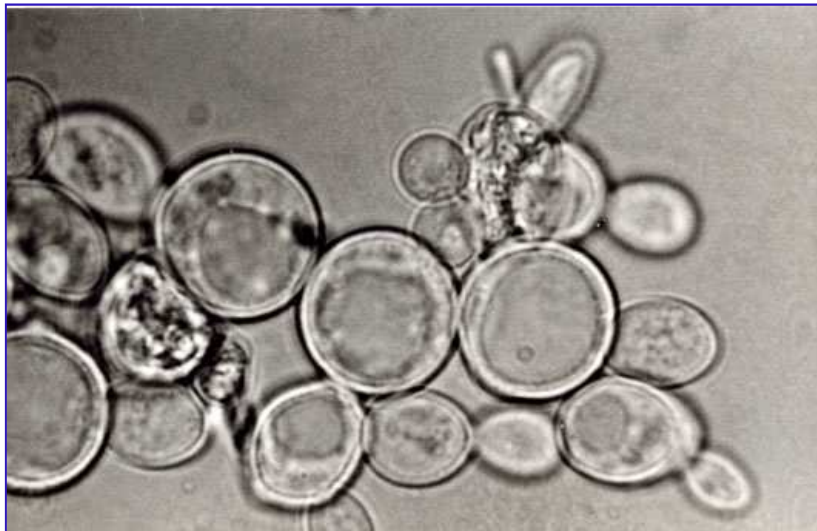
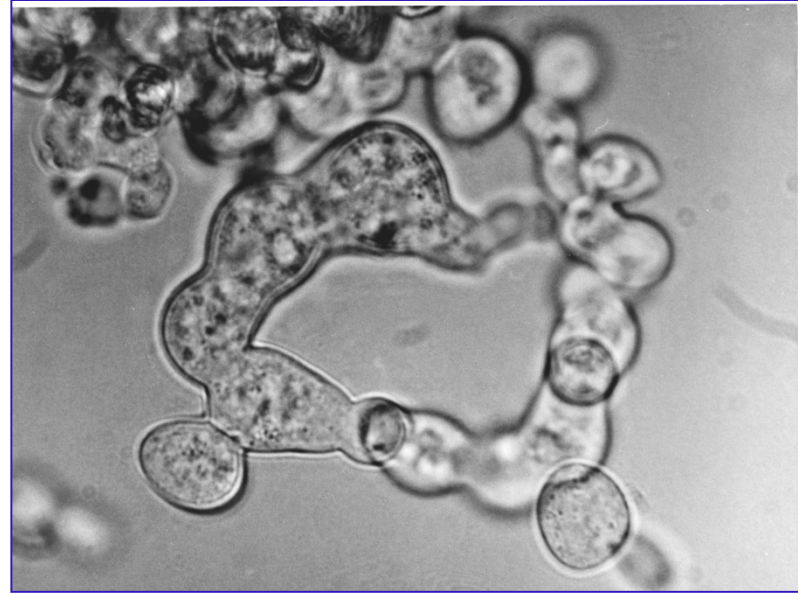
Povrch a řez kompaktní buněčnou stěnou



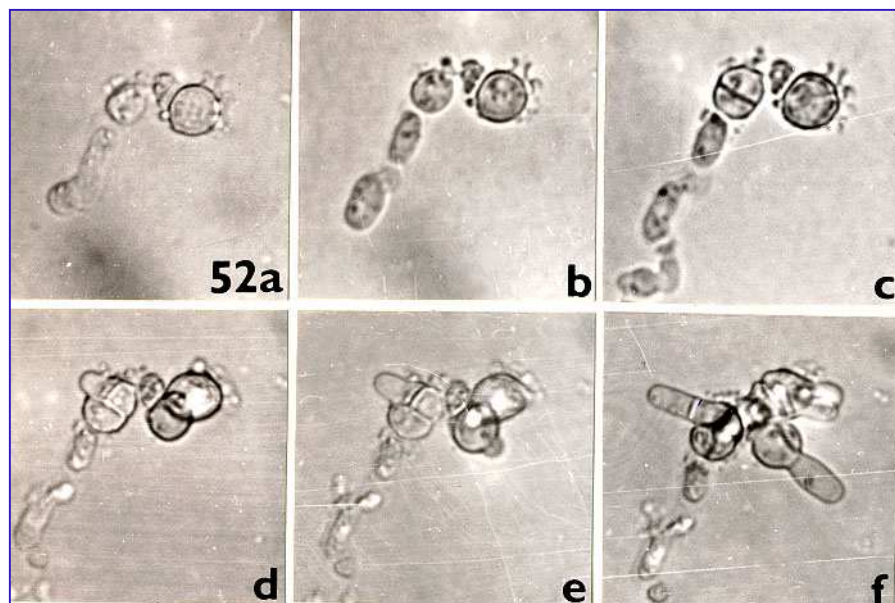
## Morfologie regenerace protoplastů v agarovém gelu



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

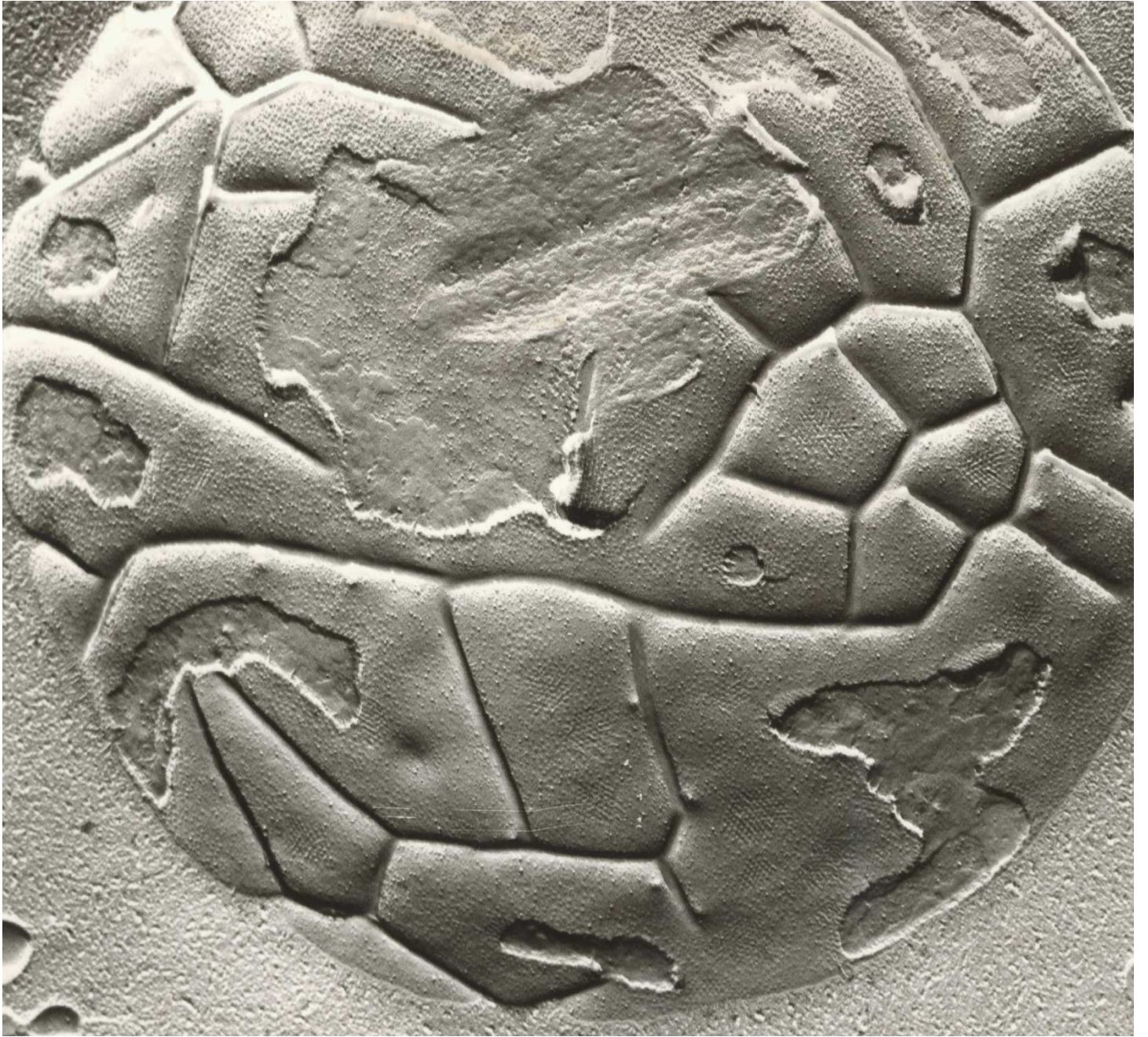


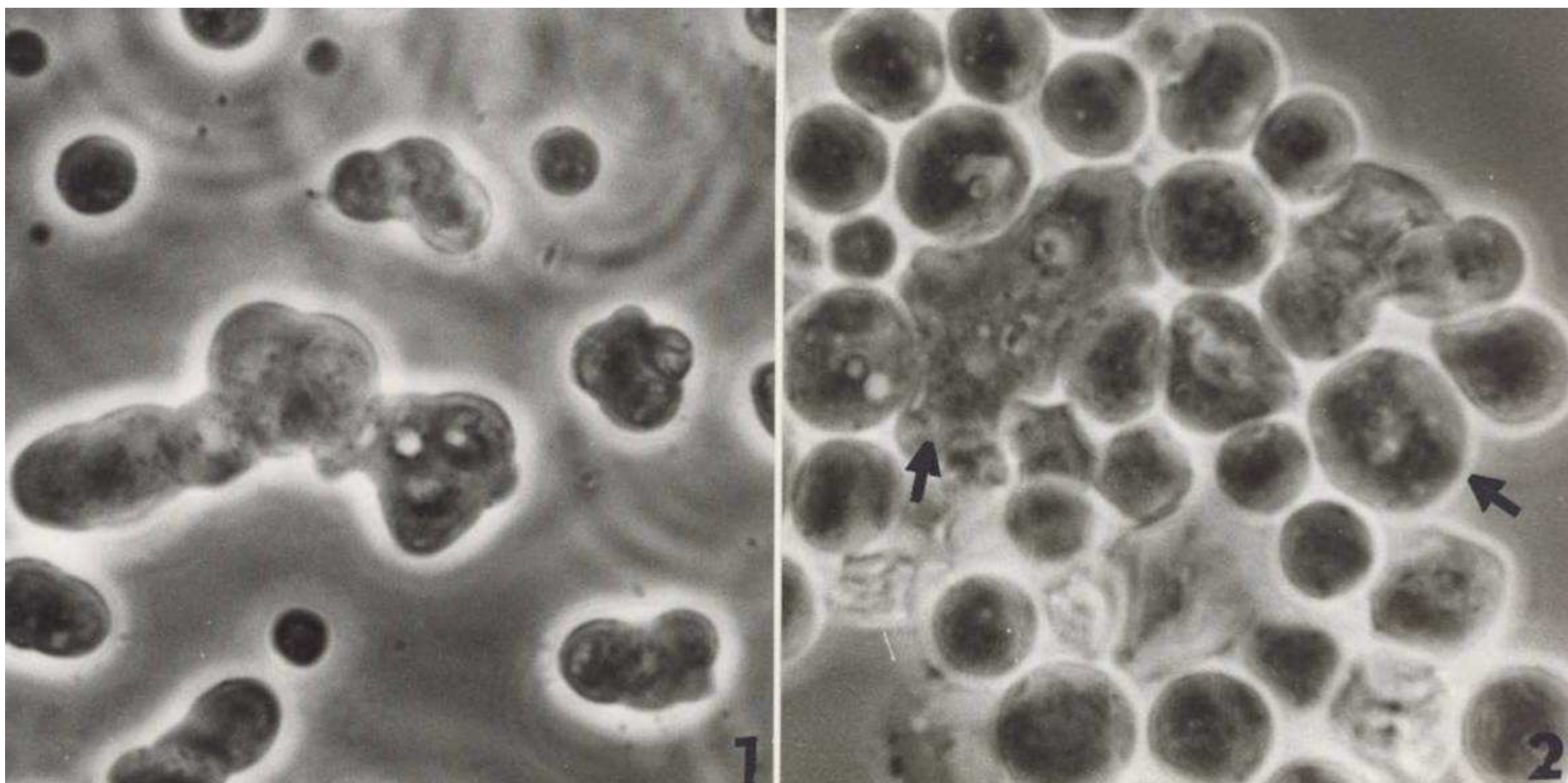
Regenerace protoplastů v polyethylenglykolovém mediu



Protoplasty některých kvasinek mohou regenerovat na agarových filmech nebo i v tekutém mediu

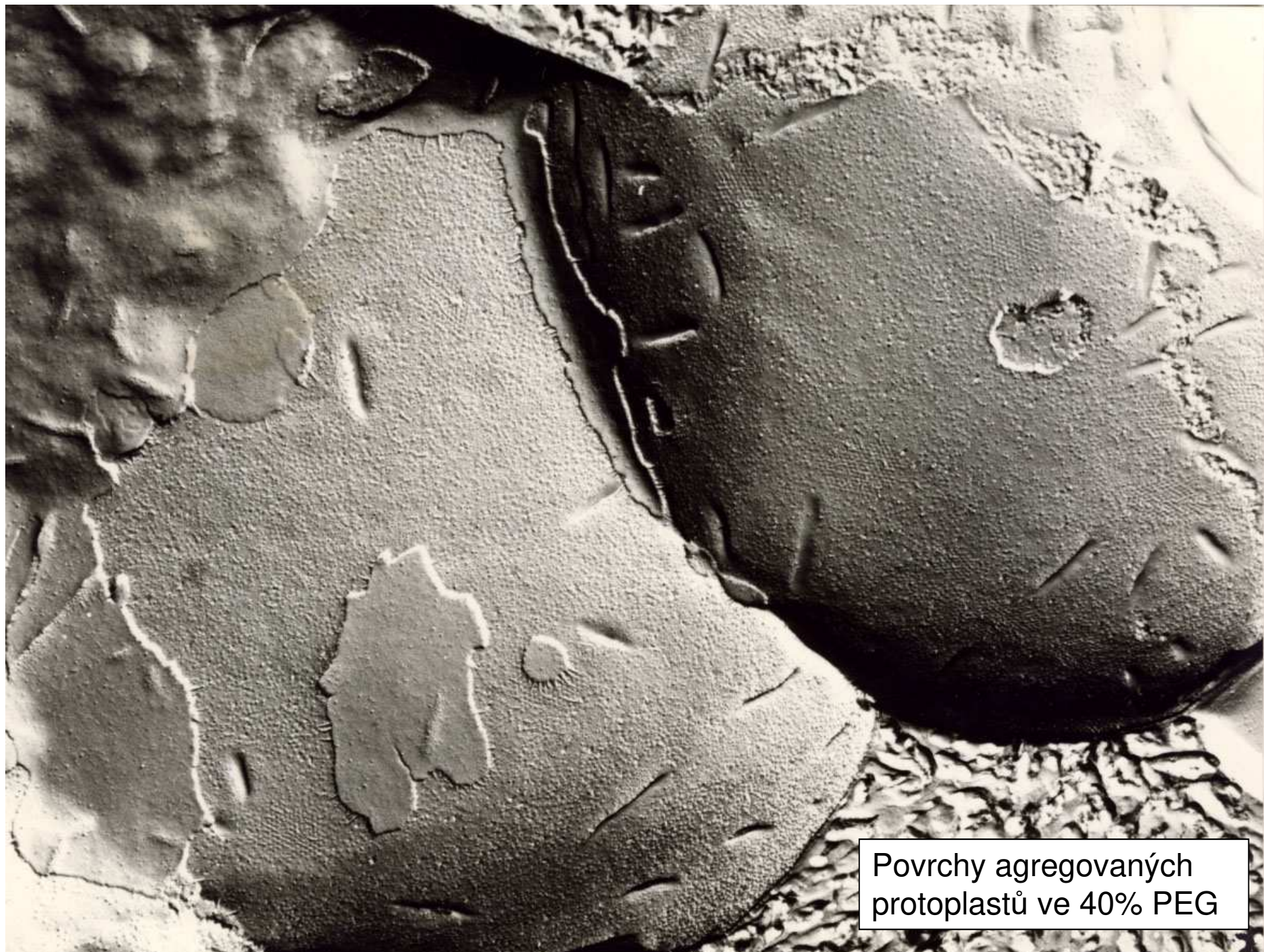






Aglutinace protoplastů ve 40% polyethylenglykolu a vytváření polyprotoplastů po zředění živným médiem

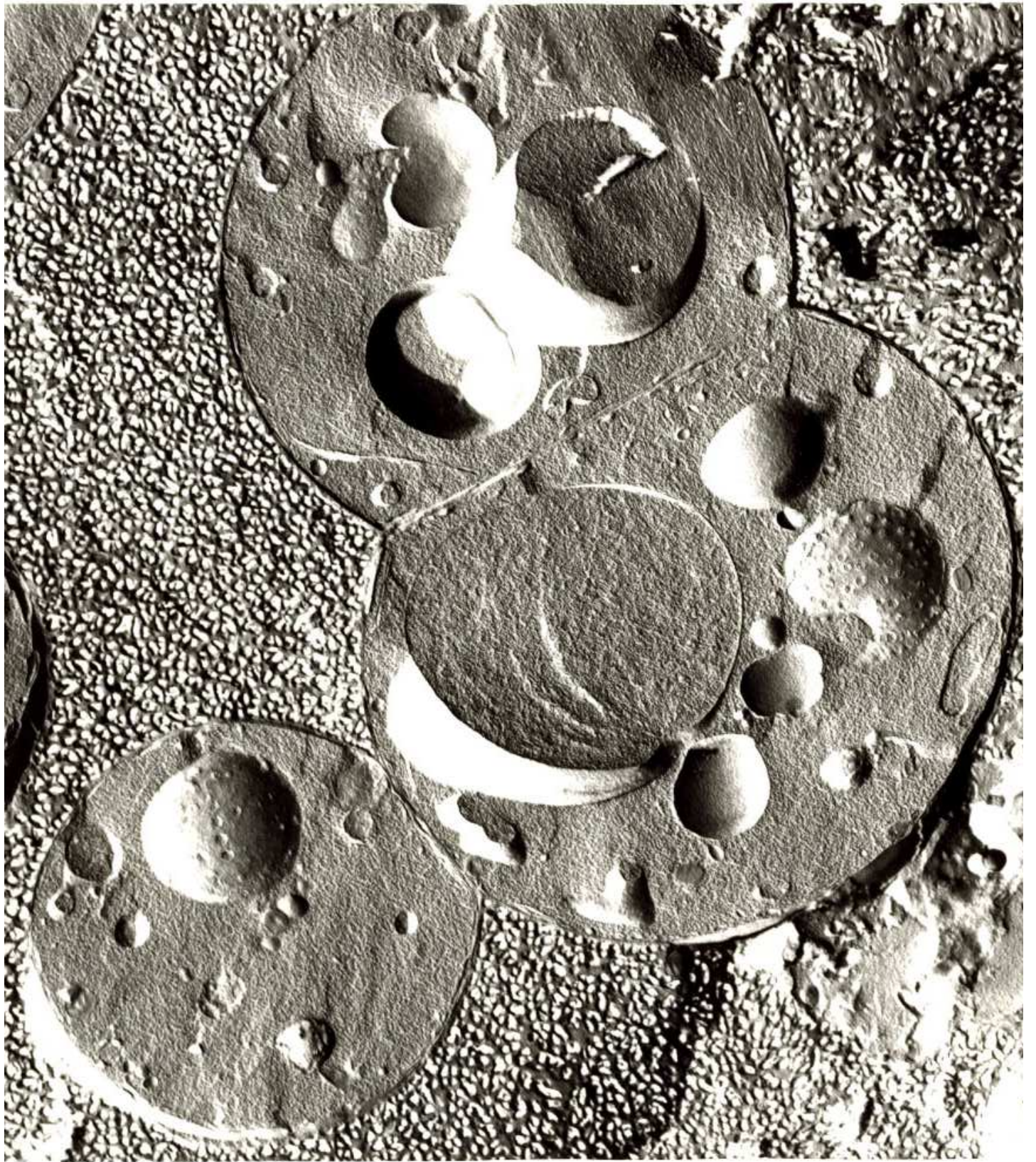




Povrchy agregovaných  
protoplastů ve 40% PEG

Lokální poruchy struktury  
plasmatické membrány po  
inkubaci protoplastů ve  
40% PEG 30 min při 37<sup>0</sup> C

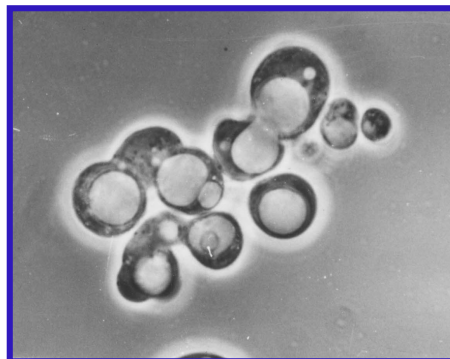




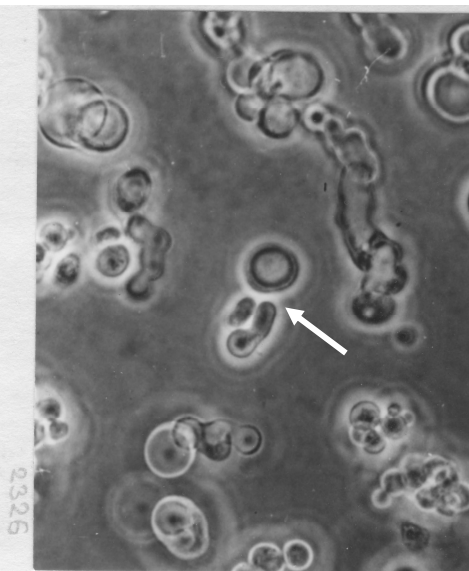
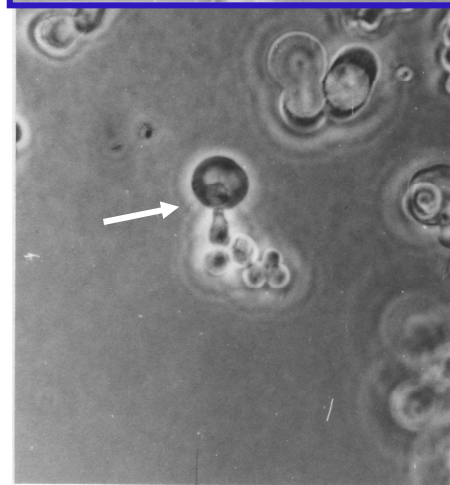
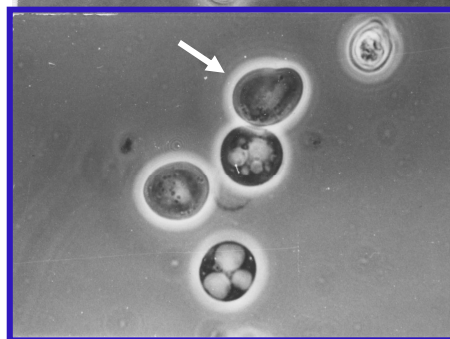
# Aplikace protoplastů kvasinek v buněčné biologii a genetice

- 1. Studium funkce buněčné stěny
  - mechanická bariéra
  - signální funkce – recepce stresových faktorů, feromonů aj
  - regenerační schopnosti buňky
  - syntéza komponent buněčné stěny
- 2. Studium struktury plasmatické membrány
- 3. Studium nepohlavní hybridizace kvasinek cestou fúze protoplastů
- 4. Transformace kvasinek izolovanou DNA

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

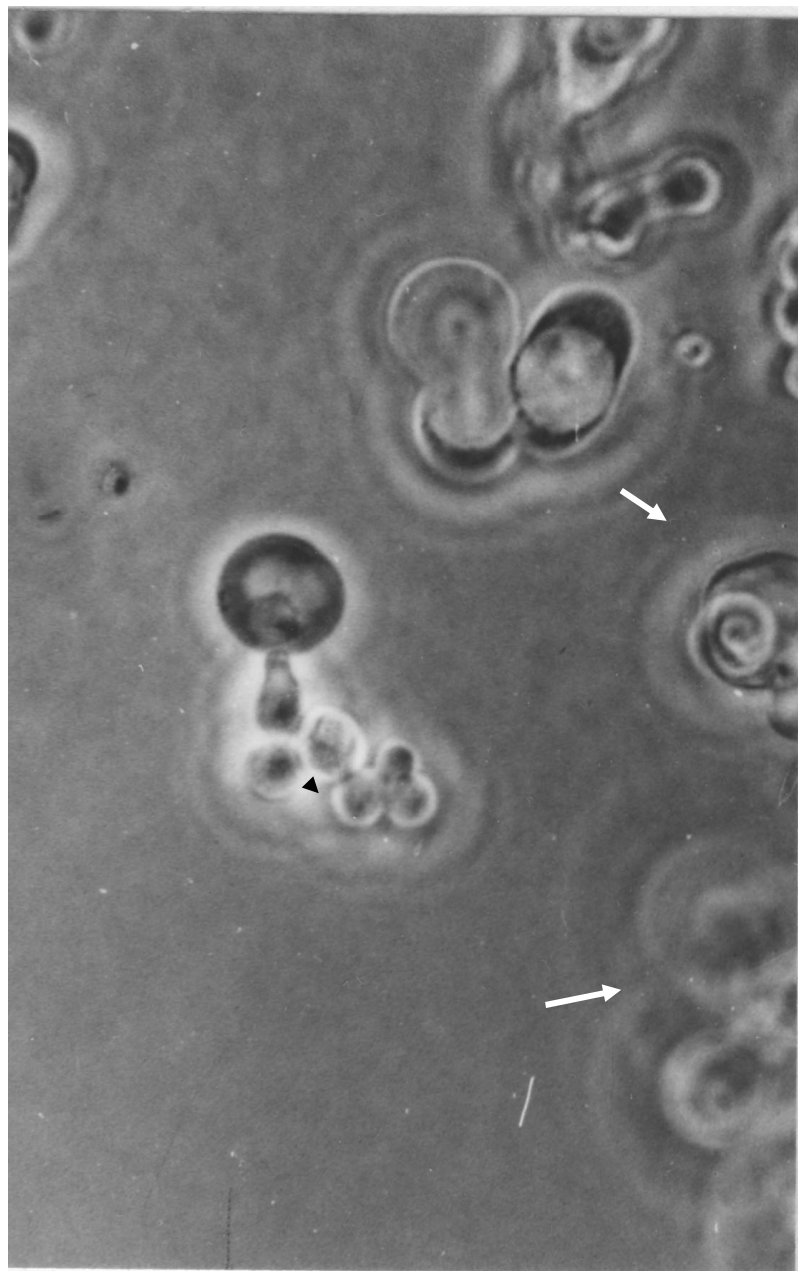


$\alpha$  protoplasty +  
a buňky:  
párovací  
výběžky tvoří  
pouze buňky



Orientovaný růst  
buněk směrem k  
rostoucímu  
protoplastu –  
žádná fuze

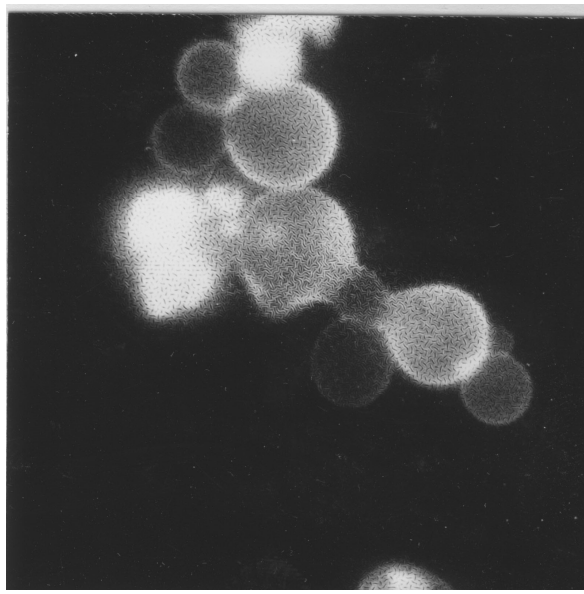
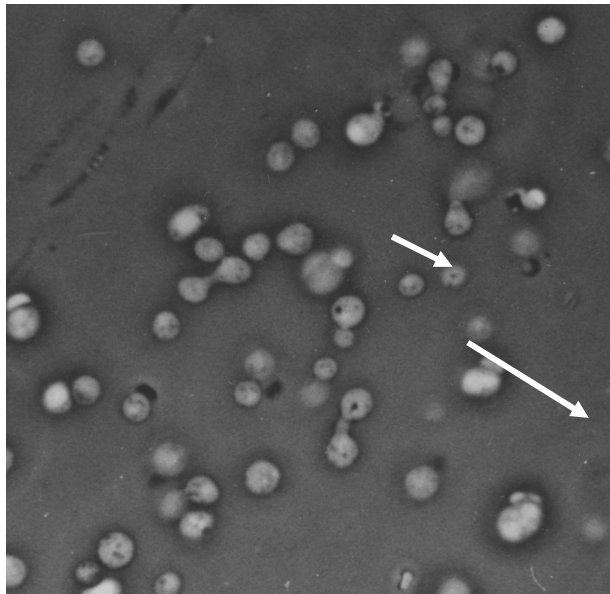




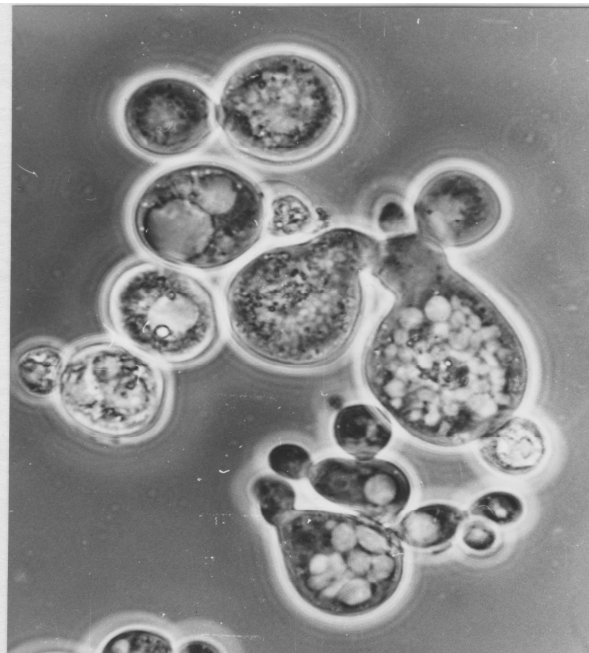
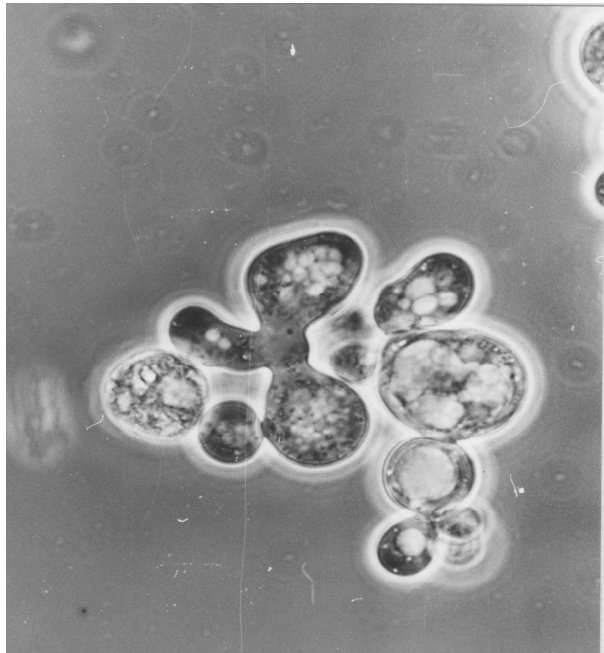
2328



Orientovaný růst  
buněk směrem k  
rostoucímu  
protoplastu –  
žádná fuze



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





Mezidruhová fuze *S.cerevisiae his<sup>-</sup>* x *S.pombe trp<sup>-</sup>* 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

