

Protoplasty kvasinek jako modelový objekt

Historie objevu modelu protoplastů

Metody přípravy protoplastů

Metody regenerace buněčné stěny u protoplastů

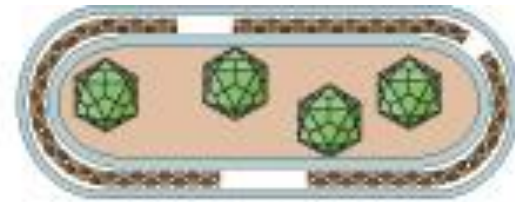
Fúze protoplastů

Sexuální hybridizace u protoplastů

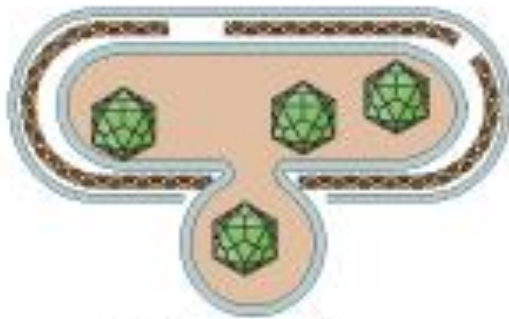
Genetická transformace kvasinek na modelu protoplastů



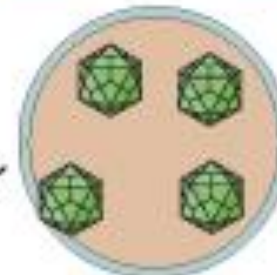
Rostlinná buňka



Lýza buňkové stěny/mechanické protržení



Protržení buňkové stěny



Protoplast



Osmotic lysis

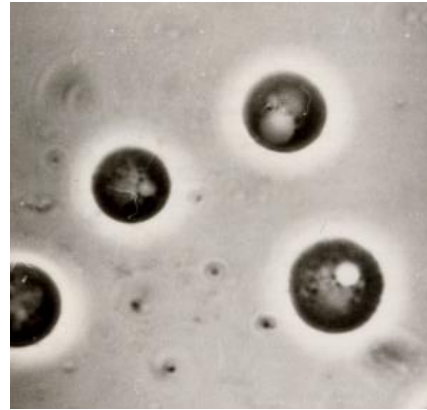
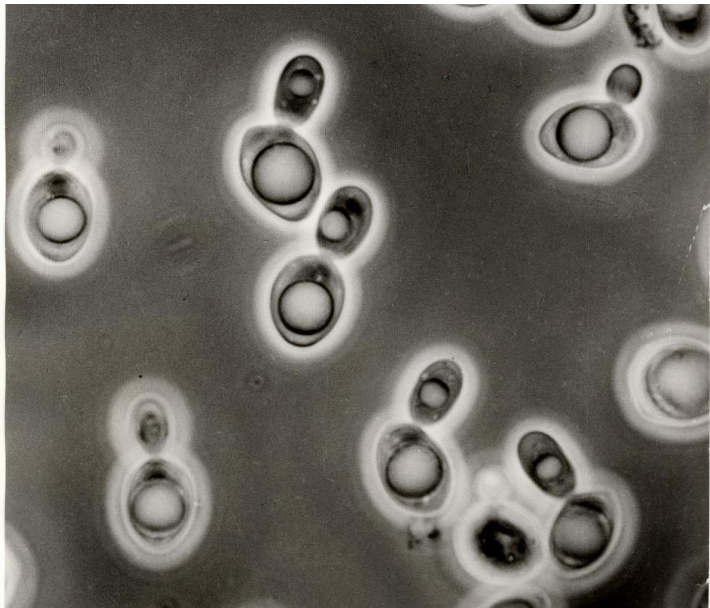
Protoplasty jsou buňky s odstraněnou buňkovou stěnou, cytoplasmatická membrána je vnější vrstva buňky

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, Chekhoslovatskaia Biol 1954)
- Autolytické protoplasty (Nečas, Nature 1956)
- Protoplasty kvasinek připravené lýzou b. stěny, *Helix pomatia* – šnekáza (Eddy a Williamson, 1959)
- Regenerace protoplastů v gelech (Nečas, 1962, Svoboda 1966)

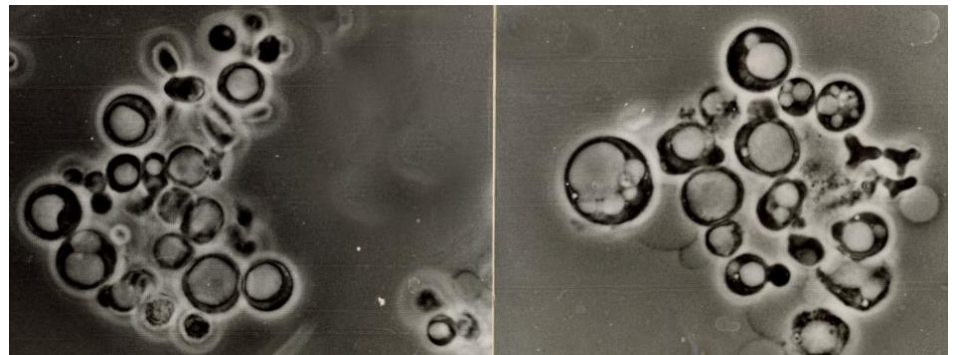
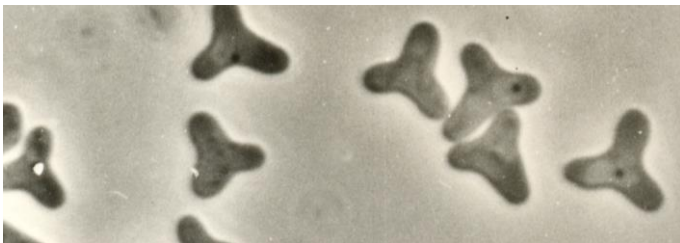
Metody přípravy protoplastů

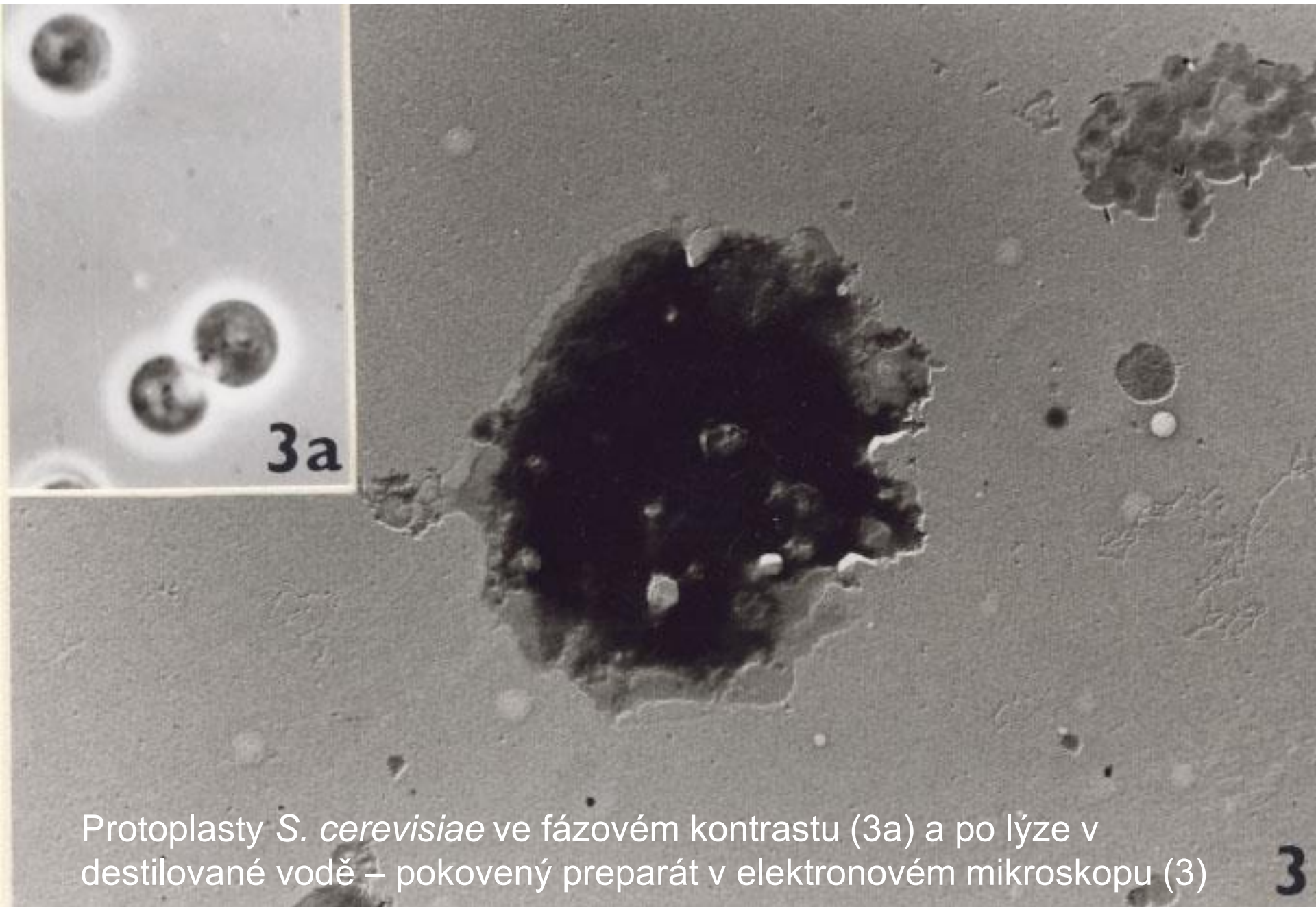
- Mechanické rozbití kvasinkových buněk v hypertonickém roztoku
- Autolýza buněčné stěny
- Aplikace enzymů lyzujících buněčnou stěnu
 - Výběr osmotika - sorbitol, manitol, KCl, MgSO₄ a koncentrace
 - Aplikace látek rušících S-S vazby v buněčné stěně – merkaptoetanol, dithiothreitol



Buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a čerstvě vytvořené protoplasty

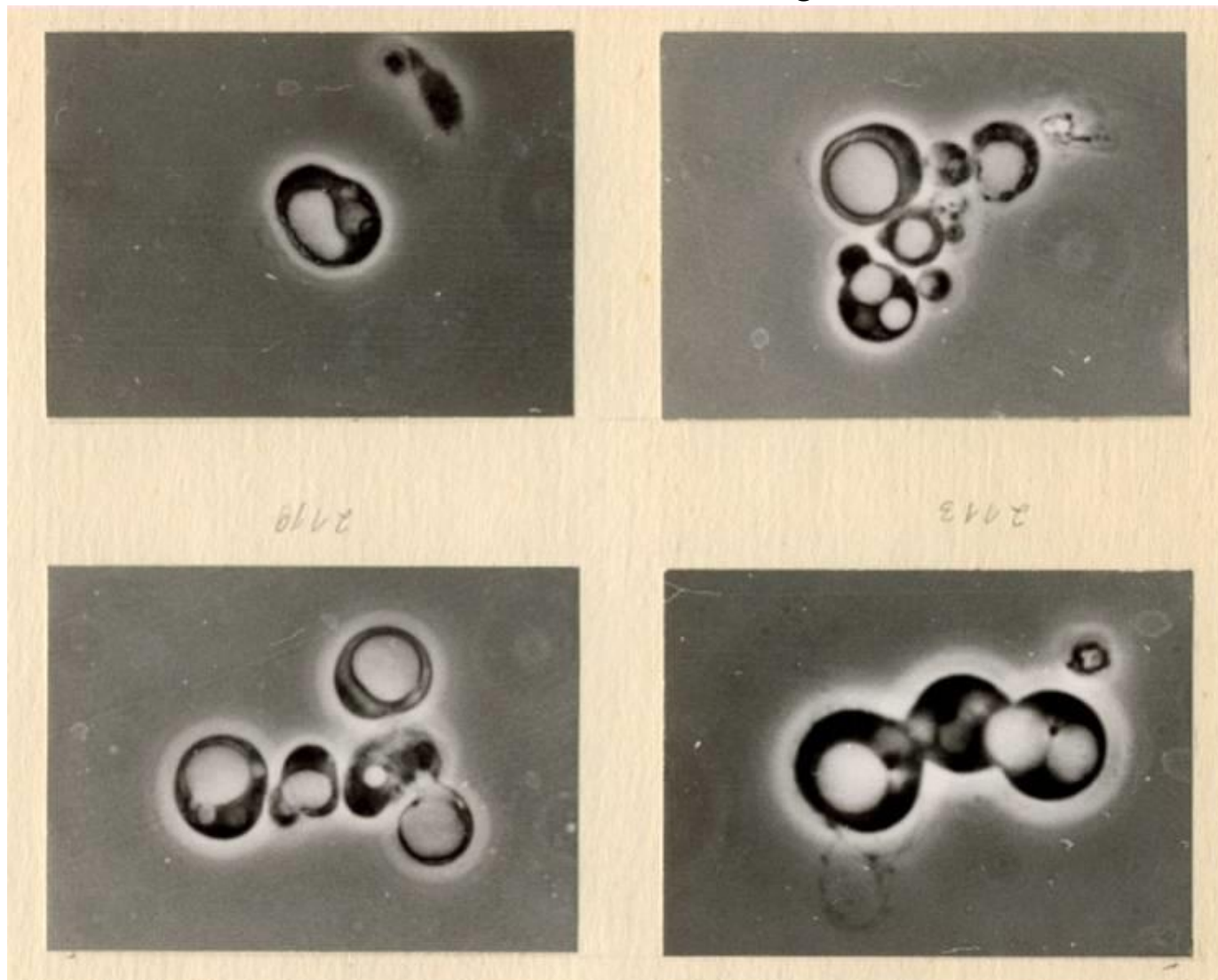
Trigonopsis variabilis





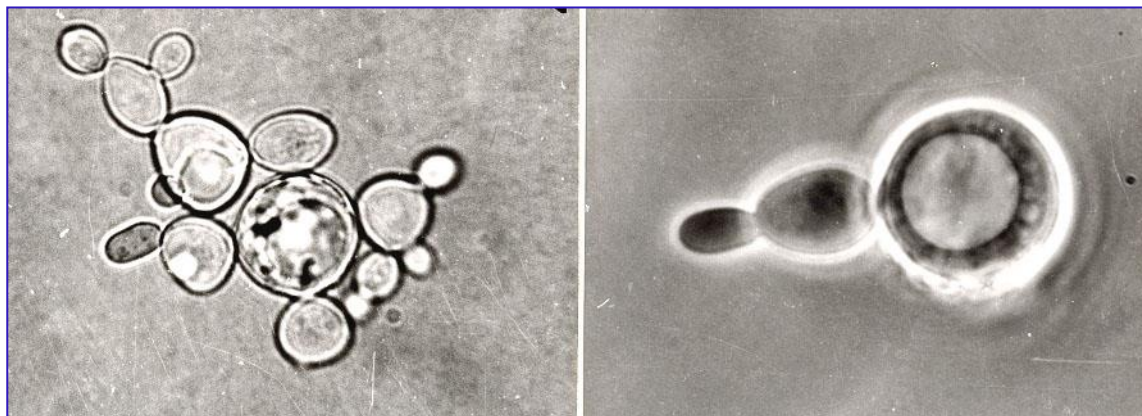
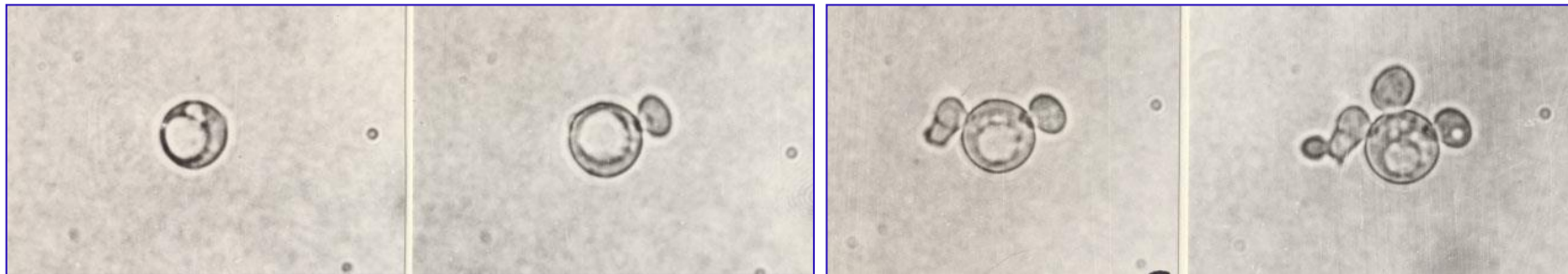
Protoplasty *S. cerevisiae* ve fázovém kontrastu (3a) a po lýze v destilované vodě – pokovený preparát v elektronovém mikroskopu (3)

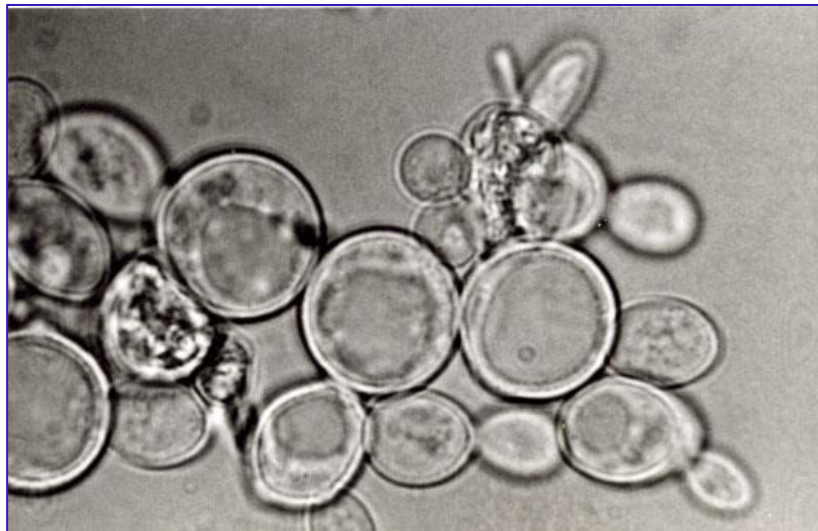
Regenerace buněčné stěny na povrchu protoplastů při kultivaci v tekutém mediu a v gelu



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

Morfologie regenerace protoplastů v 2% agarovém gelu





Regenerace protoplastů v polyethylenglykolovém mediu

Fúze protoplastů je fyzikální fenomén, při kterém dochází k fúzi dvou a vícero protoplastů během jejich vzájemném blízkém kontaktu (náhodném nebo indukovaném)

Indukovaná fúze:

Mechanická fúze – mikromanipulátor

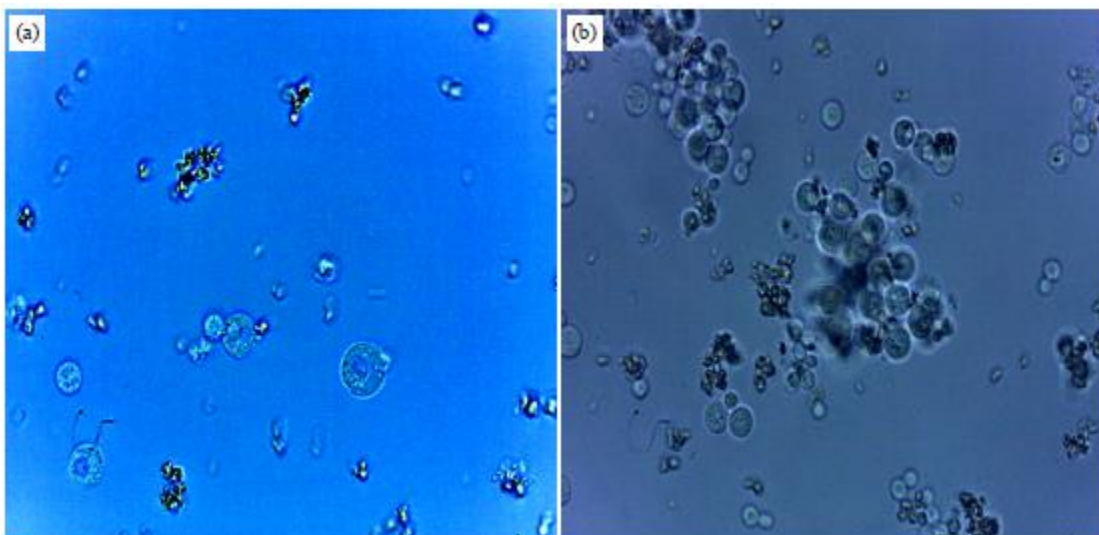
Chemofúze:

dusičnan sodný, PEG, Ca^{2+} ionty,
způsobují adhezenci protoplastů
nespecifická, levná, ale cytotoxická
může vytvářet masivní fúzní produkty

Elektrofúze

elektrická stimulace
elektrické pole se slabou silou (1-5 kV/cm)
kontrolovatelná, reprodukovatelná
méně toxická, ale drahá

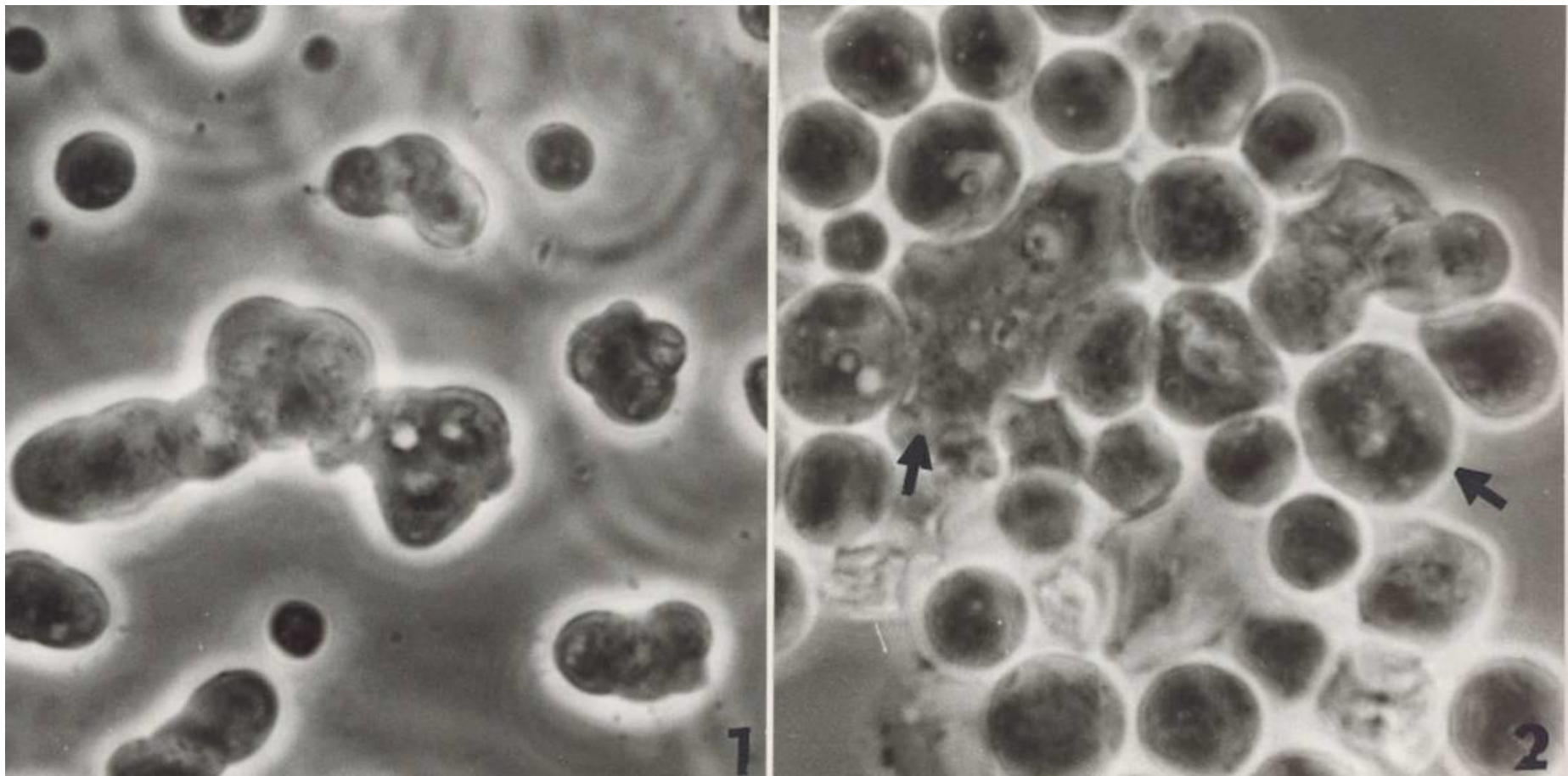




- (a) Nízká koncentrace PEG způsobuje prasknutí protoplastů
 (b) Vysoká koncentrace způsobuje nadměrné shlukování

Exp.	PEG 6000 concentration (%)	CaCl ₂ (mM)	Time fusion (min)	No. of protoplast (protoplasts mL ⁻¹)	Protoplast fusion rate (%)
1	25	0.1	10	1.22×10 ⁶	29.21
2	25	1	20	1.10×10 ⁶	26.33
3	25	10	30	0.97×10 ⁶	23.23
4	25	100	40	1.92×10 ⁶	28.33
5	30	0.1	10	1.26×10 ⁶	30.00
6	30	1	20	1.32×10 ⁶	31.58
7	30	10	30	1.45×10 ⁶	34.65
8	30	100	40	1.38×10 ⁶	32.98
9	35	0.1	10	1.38×10 ⁶	32.82
10	35	1	20	1.72×10 ⁶	41.01
11	35	10	30	2.19×10 ⁶	52.21
12	35	100	40	1.352×10 ⁶	32.82
13	40	0.1	10	1.31×10 ⁶	31.24
14	40	1	20	1.27×10 ⁶	30.21
15	40	10	30	1.10×10 ⁶	26.13
16	40	100	40	0.88×10 ⁶	20.98

Optimalizace fúze protoplastů



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

Elektrofúze

1

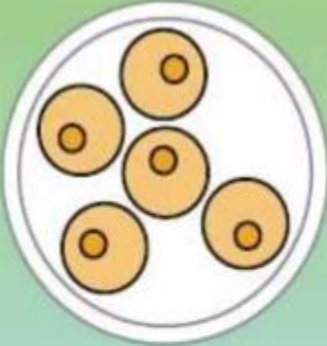
Harvest cells
Count
Adjust cell number

2

Mix cells
Transfer into fusion chamber

3

Alignment
Pulse
Post-alignment



Transfer to cell culture dish



Povrchy agregovaných
protoplastů ve 40% PEG

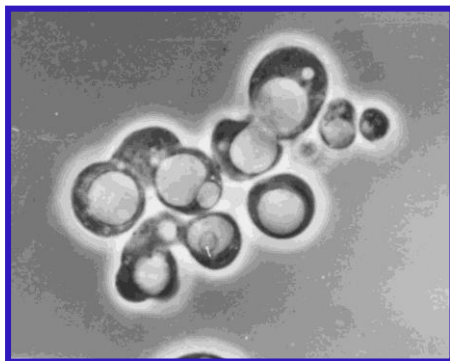
Lokální poruchy struktury
plasmatické membrány po
inkubaci protoplastů ve
40% PEG 30 min při 37° C



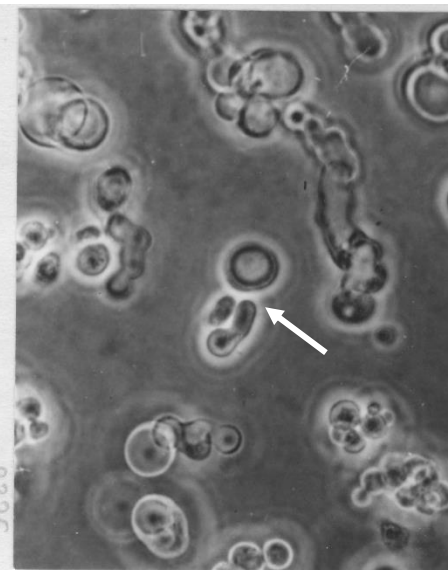
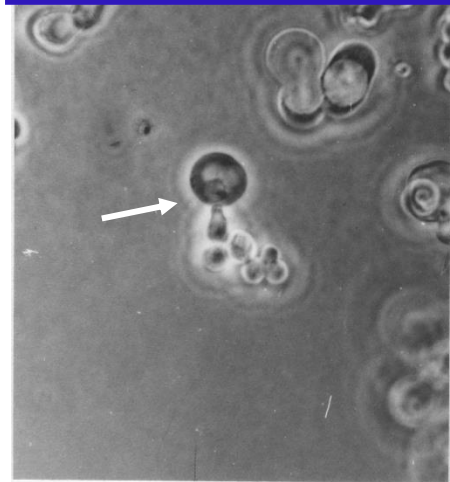
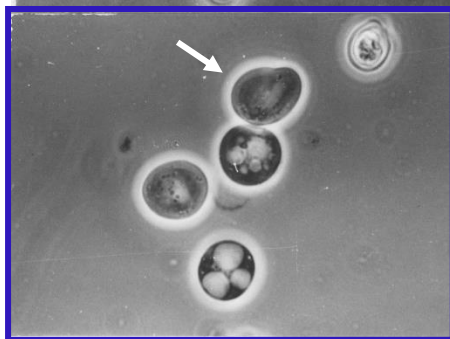
Aplikace protoplastů kvasinek v buněčné biologii a genetice

- Studium funkce buněčné stěny
 - mechanická bariéra
 - signální funkce – recepce stresových faktorů, feromonů a regenerační schopnosti buňky
 - syntéza komponent buněčné stěny
- Studium struktury plasmatické membrány
- Studium nepohlavní hybridizace kvasinek
 - vnitrodruhová a mezidruhová hybridizace
- Transformace kvasinek

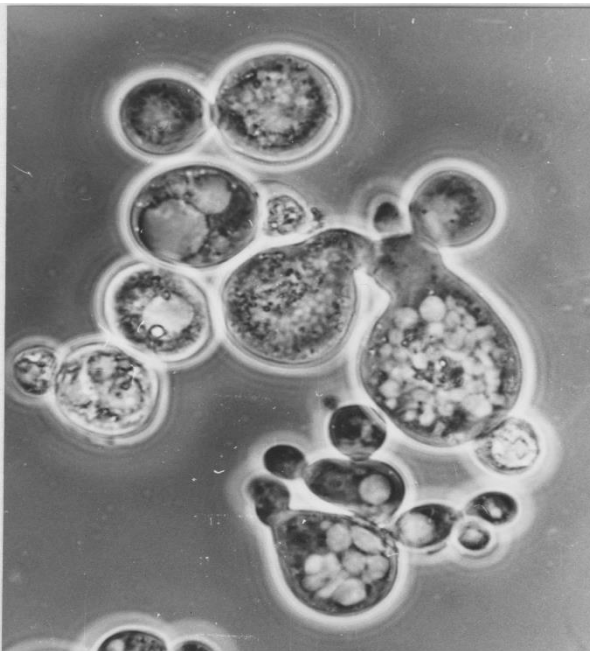
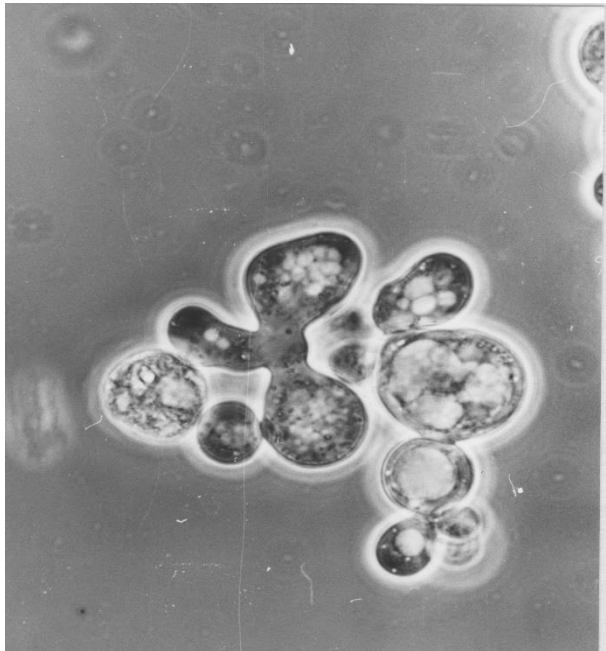
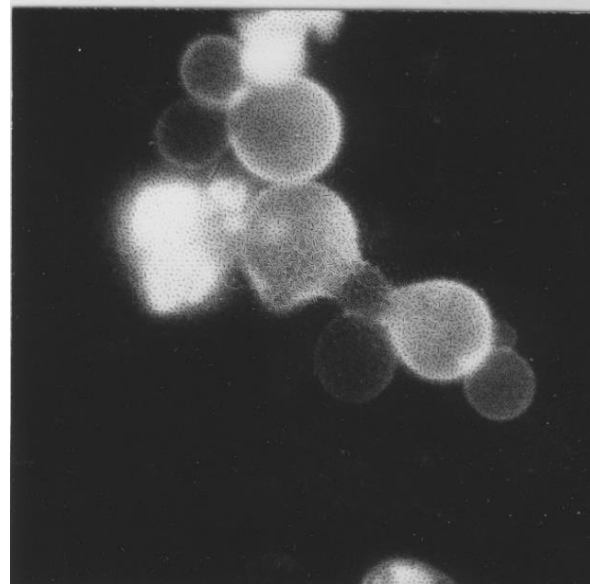
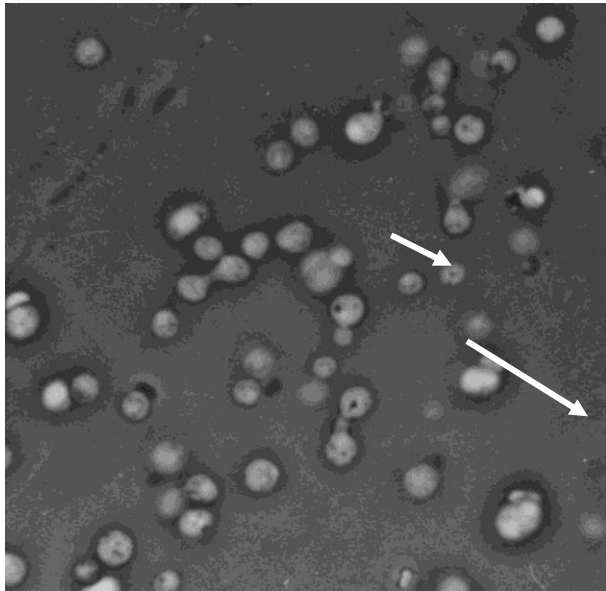
Protoplasty S.c.
 $\alpha + a$, pouze
neorientovaný
růst, žádná fuze



α protoplasty +
a buňky:
párovací
výběžky tvoří
pouze buňky



Orientovaný růst
buněk směrem k
rostoucímu
protoplastu –
žádná fuze

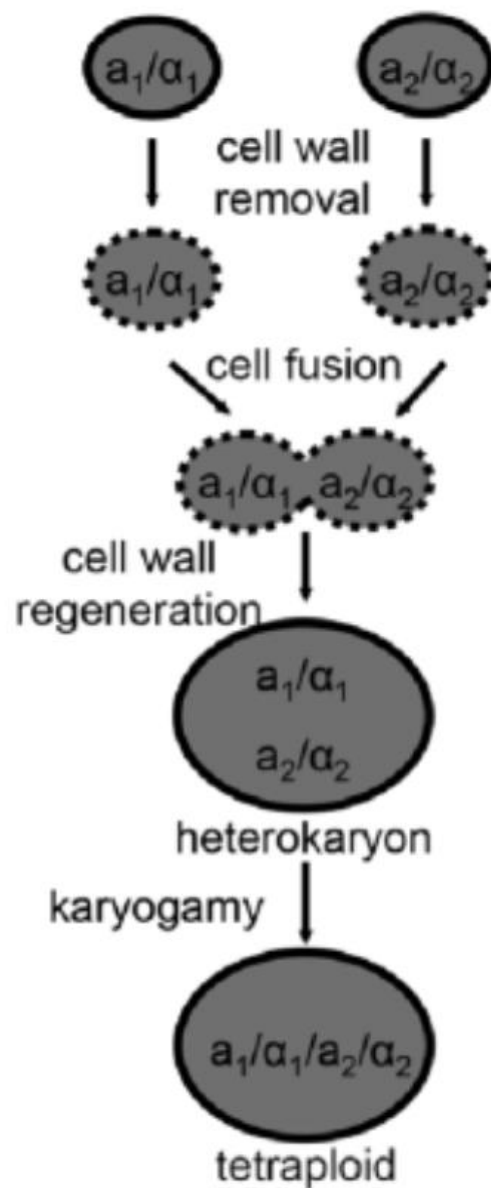


Protoplasty opačných párovacích typů fúzí teprve tehdy, zregenerují-li svoji buněčnou stěnu

(A) Cytoduction



(B) Protoplast fusion



Využití fúze protoplastů

Fúze protoplastů mezi *Saccharomyces cerevisiae* var. *Diastaticus* a *S. bayanus/uvvarum* vedla k vzniku klonů produkujících pivo s nízkým obsahem cukru a zajímavé vůně. (Saccharo (cukr) myces (houby) cerevisiae (pivo))

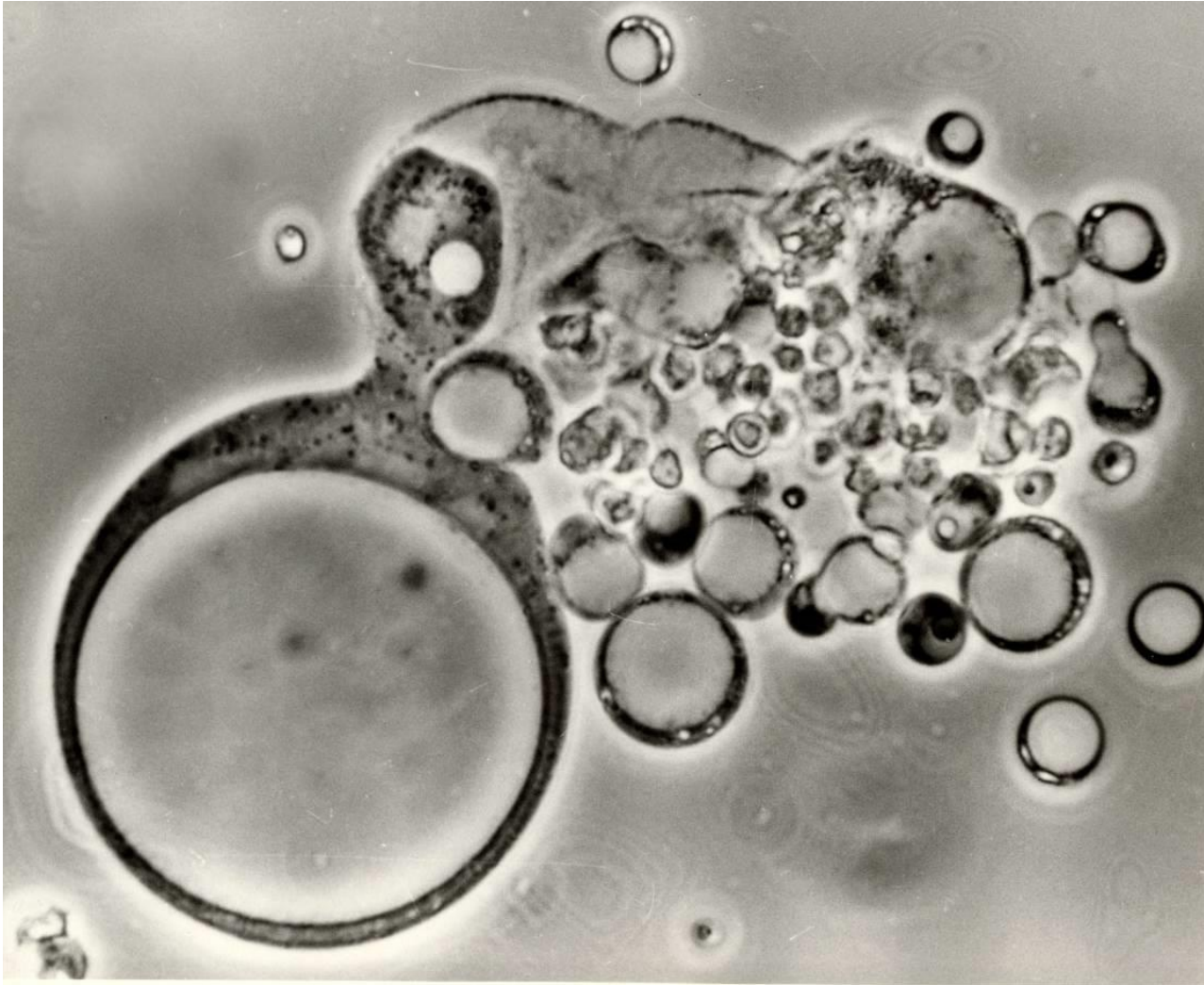
Hybridní klony – produkce glycerolu (kvalita vína), tolerance nízkých teplot (řízená fermentace – lepší macerace vín), osmotolerance, metabolismus kyseliny jablečné, produkce vonných esterů

Torulaspota delbrueckii diploidní kmen byl vytvořen pro průmyslové fermentační aplikace.

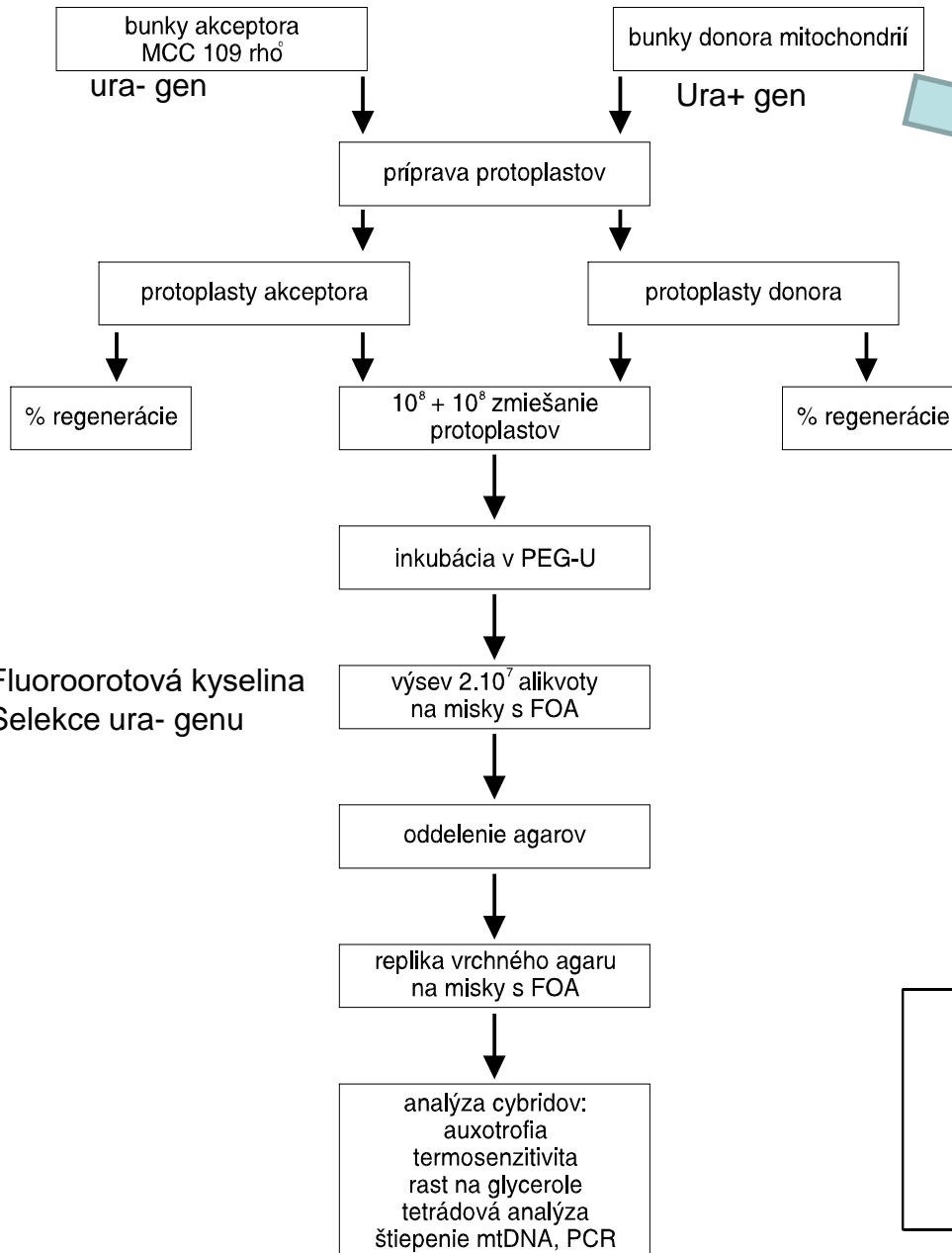
Polyploidní kvasinky – tolerance vyšší teploty, robustní fermentace, tolerance vyššího obsahu alkoholu

Produkce cybridů – přenos dsRNA plazmidu nesoucího killer toxin do kvasinek pro řízenou fermentaci => omezení růstu divokých kvasinek

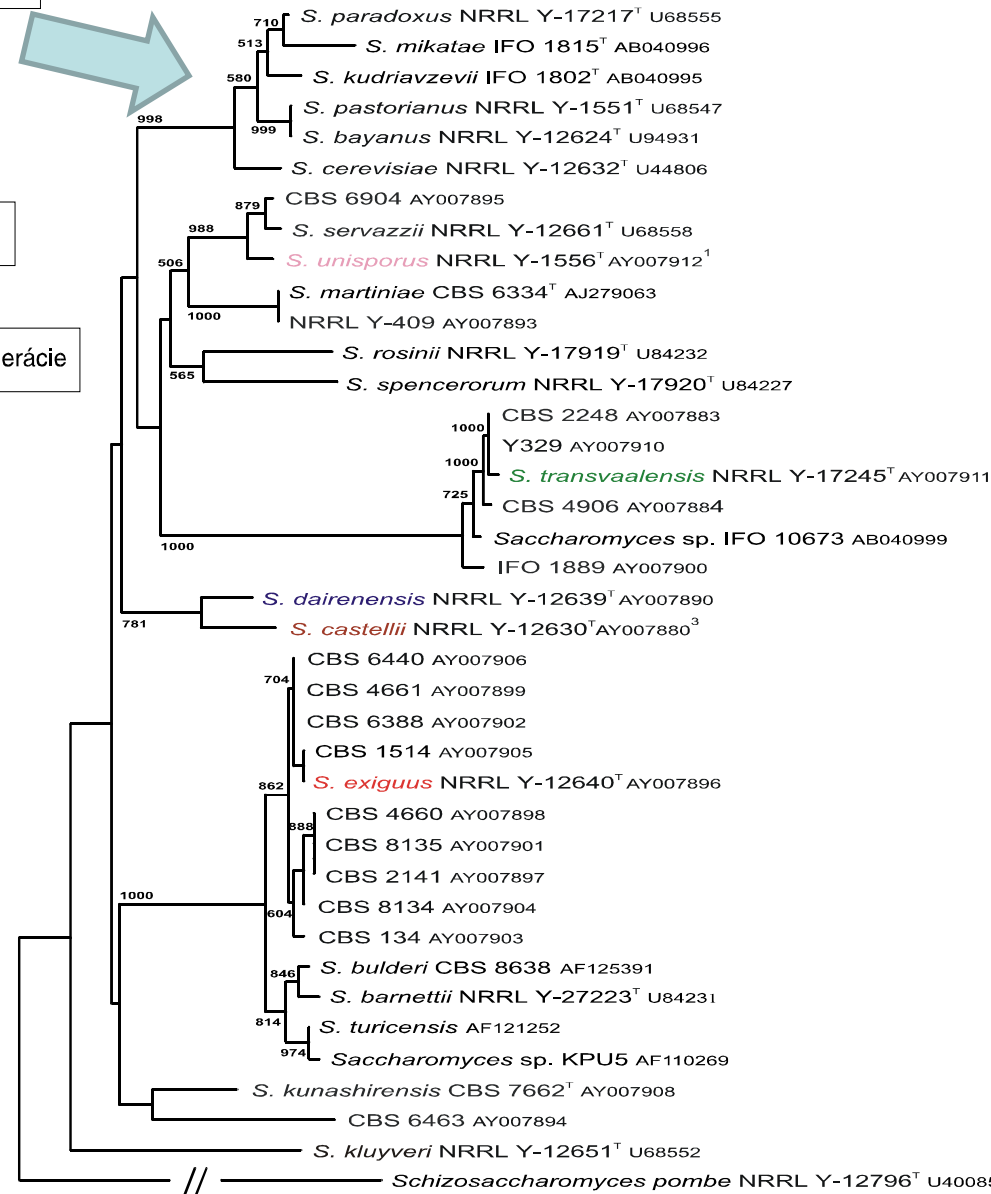
Mezidruhová fuze ***S.cerevisiae his⁻*** x ***S.pombe trp⁻*** :tyto druhy jsou fylogeneticky vzdálené, *S. cerevisiae* má 16 chromosomů, *S. pombe* pouze 3. Protoplasty mohou fúzovat, v minimálním agaru i rostou, na hybridní buňky však nerevertují



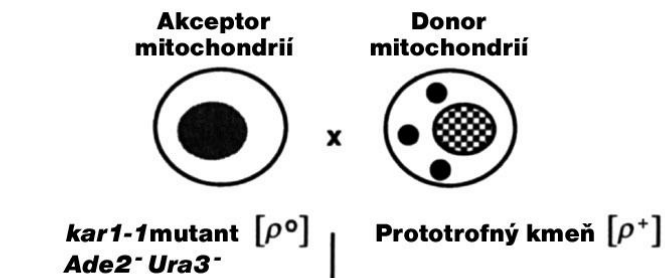
Produkce mezidruhových cybridů



Fylogenetický strom -D1/D2 doména 26S rRNA genu



Fluoroorotová kyselina
Selekce ura- genu



bez fúzie jadier

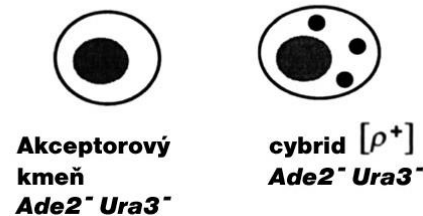


Akceptorový kmeň **Donorový [ρ^+]** **cybrid [ρ^+]**

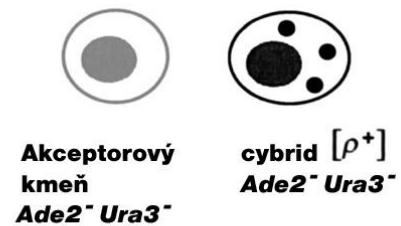
Ade2⁻ Ura3⁻ kmeň kmeň *Ade2⁻ Ura3⁻*

selekcia cybridov
replika na FOA misky

selekcia cybridov
replika na FOA misky



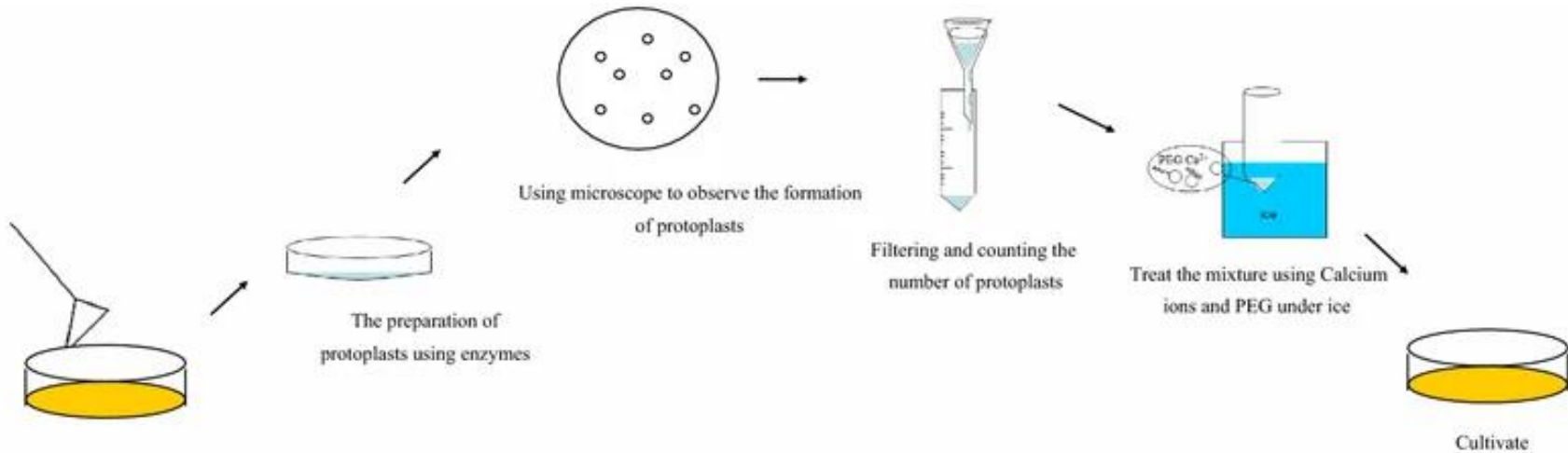
druhá replika
na FOA/minimálne
Ade Ura misky
po 7 dňoch



x K2145 [*mit⁻*]
 Δ *COX2*
selekcia
na GE pôdach



Protoplasty zprostředkovaná transformace



Collecting hyphae or spores as raw material

Příprava protoplastů, odstranění buňkové steny (polysacharidy - glukán, manan, chitin), složení je dynamické, různé složení u odlišných kvasinek => optimální výběr enzymů (šnekáza, Zymolyáza, Lyticase, beta-glucanase a pectinase z *Trichoderma* sp. a *Aspergillus niger*), lýza probíhá v pufru obsahujícím osmotický stabilizátor (např. 0,8-1,2 M sorbitol)

Transformační roztok dále obsahuje DNA, Ca²⁺ ionty (otvírá kanály v cytomembráně a PEG (fúze protoplastů), inkubace na ledu 30 minut regenerace protoplastů na miskách bez selekčního tlaku

Alternativně DNA může být vnesena do lipozomů (Dioleoylphosphatidyl ethanolamine (DOPE) or dioleoylphosphatidyl choline (DOPC))