

# Genetické manipulace kvasinkovou buňkou

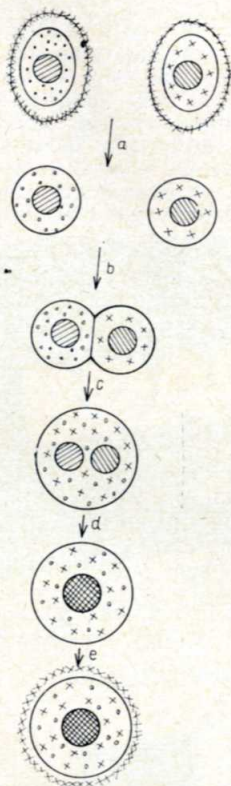
## I. Indukovaná fúze protoplastů

RNDr. VLADIMÍR VONDREJS, CSc., RNDr. BLANKA JANDEROVÁ, CSc., PhMr. RNDr. OLGA BENDOVIÁ, DrSc.,  
přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

**Klíčová slova:** genetika, protoplast, indukovaná fúze, reverze, selekce, lipozóm, sféroplast

Metoda indukované fúze protoplastů (IFP) dovolu-  
je konstruovat s dostatečným výtěžkem hybridní buňky, a  
to bez ohledu na párovací typ a druhovou příslušnost  
rodičovských buněk.

Buněčná stěna brání přímému kontaktu membrán pro-  
toplastů. Její odstranění je tedy prvním krokem postupu  
(obr. 1). Protože se tak sníží osmotická stabilita buňky,  
musí všechny následující kroky probíhat v osmoticky  
stabilizovaném prostředí. Obnažené protoplasty fúzí  
(splývají) spontánně velmi neochotně, působením fúzo-  
genních faktorů však lze indukovat agregaci a fúzi pro-  
toplastů a zvýšit tak frekvenci vzniku fúzátní o několik  
řádů. Fúzi cytoplazmatických membrán se sjednotí bu-  
něčné obsahy rodičovských protoplastů a následovat  
může i fúze jader. Protoplasty sice vykazují řadu život-  
ních funkcí, ale nejsou schopny se dělit. Tato schop-  
nost se obnoví pouze u některých buněk po regeneraci  
buněčné stěny. Reverze protoplastů na pravidelně se dě-  
lící buňky probíhá hojně v bohatých pevných médiích.



Obr. 1. Fáze IFP:

a) Příprava protoplastů, b)  
agregace protoplastů, c) fúze  
protoplastů, d) fúze jader,  
e) reverze protoplastů na dě-  
lící se buňky

Zatímco fúze probíhá úspěšně i mezi vývojově velmi  
vzdálenými druhy, reverze probíhá s tím nižší frekven-  
cí, čím jsou fúzované druhy méně příbuzné. Závěreč-  
ným krokem postupu, který již nutně nevyžaduje osmo-  
tickou stabilizaci, je izolace a charakterizace hybrid-  
ních klonů. V těch případech, kdy lze rozeznat nebo za  
vhodných podmínek dokonce selektovat hybridní klony,  
se postup podstatně zjednodušuje.

Metodou IFP se zabývá řada přehledných článků [1],  
[2], [3], [4].

### Příprava protoplastů

Jednotlivé taxony se složením buněčné stěny liší [5].  
Nejdůležitějšími složkami stěn jsou polysacharidy, bíl-

koviny a někdy i lipidy. Pro uvolnění kvasinkových pro-  
toplastů se dnes nejčastěji používají lytické enzymy izo-  
lované např. z hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*),  
*Trichoderma viride* či *Arthrobacter luteus*. Někdy je  
vhodné použít enzymy pocházející z několika zdrojů sou-  
časně.

Sloučeniny rozvolňující strukturu stěny zvyšují výraz-  
ně účinnost přípravy protoplastů tím, že enzymům zpřís-  
tupňují citlivé vazby. Například merkaptoethanol nebo  
dithiotreitol redukuje disulfidické vazby, chelatační či-  
nidla destabilizují stěnu vyvázáním dvojmocných kation-  
tů. Také kombinace s působením některých inhibitorů  
syntézy stěny, např. 2-D-deoxyglukosou, se osvědčuje  
v případech, kdy účinek lytických enzymů není dosta-  
čující.

Jako osmotických stabilizátorů se používá koncentro-  
vaných roztoků anorganických solí či polyalkoholů [6].  
Nejčastěji se setkáváme s chloridem draselným, manito-  
lem nebo sorbitolem. Pokud by stabilizátor rušil průběh  
fúze, jak to bylo zaznamenáno u chloridu draselného, je  
třeba jej před fúzí vyměnit.

Běžně používaný rychlý test pro určení frakce proto-  
plastů, sféroplastů a buněk s nepoškozenou stěnou je  
založen na jejich rozdílné osmotické stabilitě. Po zře-  
dění vodou praskají protoplasty okamžitě, sféroplasty  
opožděně a buňky přetrvávají. Přesnější odlišení proto-  
plastů je založeno na poznatku, že na povrchu osmoti-  
cky stabilizovaného média nerevertují.

### Indukovaná fúze protoplastů

Ve snaze zvýšit frekvenci fúze bylo vyzkoušeno mno-  
ho fyzikálních i chemických faktorů. Významného po-  
kroku se dosáhlo až zavedením polyethylenglykolu  
(PEG) [7] v souvislosti s fúzí rostlinných protoplastů.  
Optimální koncentrace složek indukujícího prostředí, je-  
hož důležitou součástí jsou kationty vápníku, a molární  
hmotnost použitého PEG je různá pro různé druhy pro-  
toplastovaných organismů.

Prvním stadiem procesu fúze je vytvoření stabilního  
kontaktu mezi protoplasty v malé oblasti membrán. To-  
to stadium probíhá i bez PEG, za účasti samotných vá-  
penatých iontů. PEG indukuje rychlý přechod do dalšího  
stadia. Protoplasty se v důsledku ztráty vody poněkud  
zmenšují, vytvářejí shluky a deformují se v rozsáhlých  
oblastech, ve kterých došlo k těsnému přilnutí povrchů  
membrán. Tím je usnadněn těsnější kontakt lipidických  
částí membrán, neboť bílkoviny na styčných plochách  
se vyklízejí. V lipidických dvojvrstvách lze zaznamenat  
poruchy. Třetím stadiem je vytvoření malých kanálků.  
Následuje zvětšení objemu protoplastů, zmenšení styčné  
plochy, rozšíření propojovacích kanálků, až nakonec  
vznikne velký fúzovaný protoplast. Mechanismus induk-  
ce není prozatím zcela objasněn. Současné názory jsou  
shrnuty v článku *Dušínského* [8].

Fúzovaný protoplast může obsahovat několik jader.  
Tento stav bývá někdy stabilní i po reverzi, a to zejmé-  
na u kvasinek tvořících pseudomycelium, zatímco  
u ostatních druhů dochází často k fúzi jader anebo se  
vícejaderné buňky rozdělí na původní rodičovské typy.

### Reverze protoplastů

Protoplasty se nemohou dělit a dát vznik koloniím,  
pokud se neobnoví buněčná stěna. V běžných tekutých  
médiích k regeneraci stěny nedochází, protože stěnový  
materiál uniká do média a neudrží se u povrchu proto-  
plastu dosti dlouho, aby mohl vytvořit základní síť.  
Uvnitř pevných médií, obsahujících např. agar nebo  
želatinu, vzniká nejprve stěna, která se vnitřním uspo-  
řádáním i tvarem liší od původní stěny rodičovských or-  
ganismů i od budoucí stěny hybridu [9], [10]. Regene-

race stěny není sama o sobě zárukou reverze na dělici se buňky. U rodičovských protoplastů revertuje obvykle řádově  $10^{-1}$  až  $10^{-2}$  buněk. U vnitrodruhových hybridů bývá frekvence vzniku hybridních kolonií o další tři řády nižší. U mezidruhových hybridů se výtěžky snižují ještě více. Čím menší je příbuznost rodičovských druhů, tím nižší jsou výtěžky hybridů. V poslední době se podařilo revertovat protoplasty i ve velmi viskózních roztocích PEG [11].

Vzhledem k velkému nepoměru mezi frekvencí reverze protoplastů a výtěžkem hybridů, byla hledána zlepšení, která by zvýšila účinnost metody. Optimalizací běžně používaných podmínek lze dosáhnout jen poměrně skromných zlepšení. Jako perspektivní se však jeví využití kombinovaného účinku diaforézy nebo PEG se elektrickými pulsy [12].

Druhým atraktivním zlepšením se zdá být využití feromonů produkovaných kvasinkami opačného párovacího typu, než jsou fúzované protoplasty [13]. Zatímco v předchozím případě šlo o zvýšení výtěžku patrně na účet zvýšené frekvence fúze, feromony zřejmě ovlivňují příznivě vznik životaschopných hybridů díky svému synchronizačnímu účinku a dalším vnitřním změnám, které v buňkách vyvolávají. I když se předpokládá, že se feromony uplatňují podobně jako při sexuální hybridizaci, podstata jejich vlivu na průběh fúze nebyla zatím podrobně analyzována. Osvědčily se pouze postupy, při kterých feromon působil na buňky po dobu několika hodin před přípravou protoplastů.

Reverze protoplastů probíhá často za podmínek, které jsou voleny s ohledem na selekci hybridů, resp. na eliminaci jiných než hybridních typů protoplastů. Tím je výtěžek hybridů pravděpodobně také ovlivněn. Nejčastěji se používají selekční postupy, založené na auxotrofii rodičovských kmenů, mutovaných v různých chromozomálních genech. V hybridu se komplementují funkce poškozeného genu jednoho rodiče nepoškozenou alelou druhého rodiče. Hybrid je tedy prototrofní a revertuje i na minimálním médiu.

Další selekční postupy jsou založeny na cytoplazmatických genetických znacích. Zvláště výhodné jsou různé mitochondriální znaky. Řada poškození mitochondriální DNA vede k tzv. respirační deficienci nebo rezistenci na různá antibiotika. Selektce s využitím cytoplazmatických znaků ovšem na rozdíl od předchozích typů neeliminuje cybridní kmeny.

Při hybridizacích, do kterých vstupují průmyslové kmeny kvasinek, vznikají některé speciální problémy. Většina průmyslových kmenů je polyploidní nebo alespoň diploidní, takže např. chromozomální mutanty auxotrofních typů se u nich prakticky nedaří připravovat. Vzhledem k závažnosti těchto problémů bylo třeba hledat nové přístupy založené např. na využití přirozených rozdílů mezi kvasinkovými kmeny [14]. Podrobněji se těmito otázkami zabýváme v následujícím sdělení této série.

### Variace na metodu indukované fúze protoplastů

Cytodukci rozumíme přenos cytoplazmy jednoho kmeny do hybridu obsahujícího jádro pouze z druhého rodiče. Pro tyto hybridy se razí označení cybridy. V souvislosti s fúzí může dojít k cytodukci dvěma způsoby: (a) po normální fúzi mohou v některých případech druhotně segregovat jádra za vzniku cybridů, (b) fúzi protoplastů s beziaderními vezikly. Vezikly bez jader vznikají spontánně při přípravě protoplastů z exponenciálních buněk. Jejich zdrojem jsou pupeny, do kterých ještě nevstoupilo jádro [15]. Metodou fúze protoplastů s beziaderními vezikly byly již přeneseny různé cytoplazmatické genetické determinanty, např. mitochondrie [16].

Řada autorů již také deklarovala úspěšné fúze eukaryotických organel s protoplasty. Jako velmi přesvědčivé se jeví zejména fúze izolovaných kvasinkových jader s protoplasty. Výsledkem je hybrid obsahující úplnou nebo neúplnou chromozomovou výstavbu donoru jádra a úplnou výstavbu recipienta. Cytoplazma hybridu pochází vždy pouze od recipienta [17, 18].

Pro úplnost je třeba připomenout, že podobně jako např. u bakterií by bylo případně možné přenášet DNA

zabalenu v lipozómech (umělých lipidických váčcích) do buněk pomocí indukované fúze lipozómu s protoplastem. Kromě toho lze získat životaschopné hybridy i po fúzi předem usmrcených protoplastů [19].

V souvislosti s metodami genového inženýrství má zvláštní význam speciální typ IFP, při které je alespoň jeden z rodičů tzv. kar-1 mutantem [20]. I při konjugaci těchto mutantů totiž nedochází k fúzi jader anebo je velmi opožděna. Hybridy zůstávají dikaryotické. Totéž platí i pro hybridy vzniklé IFP. V tomto stadiu může dojít mezi jádry k výměně plazmidu anebo dokonce celého chromozómu. Obdobným způsobem může přejít mezi jádry i vektor nebo vektor nesoucí fragment, který má být přenesen mezi kvasinkovými kmeny. Dikaryotický stav je nestabilní. Jádra segregují. Tímto způsobem vznikají jednak cybridy a jednak se takto uskuteční přenos jednotlivých jaderných elementů ovšem s mnohem nižší frekvencí.

Dalším styčným bodem genového a buněčného inženýrství je metoda umožňující přenést obojetné vektory a jejich deriváty z bakterií do kvasinek bez izoace DNA. Po fúzi bakteriálního a kvasinkového protoplastu mají naději na udržení v kvasince pouze molekuly DNA, schopné se v tomto hostiteli replikovat. Protože obojetné vektory a jejich deriváty nesou fragment zajišťující nejen replikaci v bakterií, ale i replikaci v kvasince, uchytí se v novém hostiteli [21]. Bakteriální chromozóm pravděpodobně zanikne.

### Závěr

Přestože je IFP velmi univerzální metodou vhodnou pro genové manipulace u kvasinek, její použití pro průmyslové účely nebylo prozatím časté. Příčina tohoto jevu spočívá v tom, že jde o metodu relativně novou, která se stále ještě rozvíjí a dále, že řada důležitých problémů čeká ještě na řešení. Hlavní problém, který musí být dořešen zejména u mezidruhových hybridů, souvisí s nízkou frekvencí jejich vzniku a s jejich nestabilitou. Vypracování metod pro co nejrychlejší stabilizaci hybridů při zachování požadovaných vlastností je tedy jedním z nejdůležitějších úkolů pro základní výzkum. Druhý problém souvisí s tím, že do hybridu jsou často vedle mnoha žádoucích anebo alespoň neutrálních genů přeneseny fúzí i geny nežádoucí. Proto mají variace na standardní postup IFP umožňující přenos části genomu takový význam.

### Literatura

- [1] PEBERDY, J. F.: Ann. Rev. Microbiol., **33**, 1979, s. 21.
- [2] PEBERDY, J. F. (ed.): Protoplasts-Applications in Microbial Genetics. Nottingham University Press, Nottingham, 1979.
- [3] FERENCZY, L., FARKACZY, G. L. (eds.): Advances in Protoplast Research, Budapest: Akadémiai Kiadó, Oxford: Pergamon Press, 1980.
- [4] FERENCZY, L., KEVEI, F. (eds): Training Course on Fungal Protoplast Fusion and its Applications, Attila József University Press, Szeged, 1981.
- [5] FARKAŠ, V.: Microbiol. Rev., **43**, 1979, s. 117.
- [6] VILLANUEVA, J. R., CARCIA ACHA, J.: Methods in Microbiol., **4**, 1971, s. 665.
- [7] KAO, K. N., MICHAYLUK, M. R.: Planta, **115**, 1974, s. 355.
- [8] DUŠINSKÝ, R.: Biol. listy, **49**, 1984, s. 176.
- [9] NEČAS, O.: Bacteriol. Rev., **35**, 1971, s. 149.
- [10] NEČAS, O.: v [3], s. 151.
- [11] SVOBODA, A.: osobní sdělení.
- [12] HAFMANN, H. J., EMEIS, C. C., ZIMMERMANN, U.: FEMS Microbiol. Letters, **20**, 1983, p. 13.
- [13] CURRAN, B. P. G., CARTER, B. L. A.: Curr. Genet., **10**, 1986, s. 943.
- [14] VONDREJS, V., PŠENÍČKA, I., KUPCOVÁ, L., DOSTÁLOVÁ, R., JANDEROVÁ, B., BENDOŮVÁ, O.: Folia Biologica, **29**, 1982, s. 372.
- [15] KOPECKÁ, M., GABRIEL, M., NEČAS, O.: J. Gen. Microbiol., **81**, 1974, s. 111.
- [16] MARÁZ, A., SUBIK, J.: Mol. Gen. Genet., **181**, 1981, s. 131.
- [17] BECHER, D., CONRAD, B., BÖTTCHER, F.: Curr. Genet., **6**, 1982, s. 163.
- [18] MAEMURA, T., YAMASHITA, I., FUKUI, S.: FEBS letters, **158**, 1983, s. 50.
- [19] TOMEŠOVÁ, D., VONDREJS, V.: Kvas. prům., **32**, 1986, s. 322.
- [20] CONDE, J., FINK, G. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **73**, 1976, s. 3651.
- [21] VONDREJS, V., PÁLKOVÁ, Z.: Biol. listy, **51**, 1986, s. 140.

Lektoroval dr. V. Jirků, CSc.

**Vondrejs, V. - Janderová, B. - Bendová, O.: Genetické manipulace kvasinkovou buňkou I.: Indukovaná fúze protoplastů.** Kvas. prům. 33, 1987, č. 7, s. 205—207.

Popisují se jednotlivé kroky metody indukované fúze protoplastů, příprava protoplastů, indukovaná fúze, reverze protoplastů na dělicí se buňky a selekce hybridů. Charakterizovány jsou i postupy příbuzné, příprava cybridů, fúze usmrčených protoplastů, fúze protoplastu s lipozómem, fúze kvasinkového protoplastu s bakteriálním sféroplastem, přenos cytoplazmatických a případně i jaderných genů v průběhu fúze kar mutantů, které lze využít pro přenos částí genomu z donorových do recipientních buněk.

**Вондрейс, В. - Яндерова, Б. - Бендова, О.: Генетические манипуляции с дрожжевой клеткой. I. Индуцированное соединение протопластов.** Квас. прум. 33, 1987, № 7, стр. 205-207.

Отдельные шаги метода индуцированного соединения протопластов, получение протопластов, индуцированное соединение, реверсия протопластов на разделяющиеся клетки и селекция гибридов описываются наряду с характеристикой близких подходов, как получение цибридов, соединение убитых протопластов, соединение протопласта с липозомом, соединение дрожжевого протопласта с бактериальным сферопластом, перенос цитоплазматических, или же и ядерных генов в течение соединения кар mutantов, которые можно использовать для переноса частей генома в реципиентные клетки.

**Vondrejs, V. - Janderová, B. - Bendová, O.: Genetic Manipulations with the Yeast Cell. I. Induced Protoplasts Fusion.** Kvas. prům. 33, 1987, No. 7, pp. 205—207.

The individual steps of a method of the induced protoplast fusion, i. e. the protoplast preparation, the induced fusion, the protoplast reversion to divided cells and the hybrid selection are described. Also other procedures are characterized as follows: the hybrid preparations, the fusion of dead protoplasts, the fusion of protoplasts with liposome, the fusion of a yeast protoplast with a bacterial spheroplast, the transition of cytoplasmic and nucleic genes during the fusion of kar mutants. These operations serve in the transition of some parts of genom from donor to recipient cells.

**Vondrejs, V. - Janderová, B. - Bendová, O.: Genetische Manipulationen der Hefezelle. I. Induzierte Fusion der Protoplaste.** Kvas. prům. 33, 1987, Nr. 7, S. 205—207.

Es werden die einzelnen Schritte der Methode der induzierten Protoplasten-Fusion beschrieben, die Zubereitung der Protoplaste, induzierte Phase, Reversion der Protoplaste auf sich teilende Zellen und Selektion von Hybriden. Es werden weiter auch verwandte Verfahren charakterisiert, die Vorbereitung von Cybriden, Fusion der getöteten Protoplaste, Fusion des Protoplastes mit dem Liposom, Fusion des Hefeprotoplastes mit dem bakteriellen Spheroplast, Übertragung der cytoplasmatischen Gene bzw. auch Kerngene im Verlauf der Fusion der Karmutanten, die für die Übertragung der Genomteile aus den Donorzellen in die Rezipient-Zellen ausgenutzt werden können.