

Flokkulens élesztőtörzsek növekedésének és kölcsönhatásainak vizsgálata
folyékony tápközegben



Kovordányi Anna

TDK dolgozat

Témavezetők:

Gaizer Tünde

Pillér Bíborka

Dr. Csikász-Nagy Attila

Információs Technológiai és Bionikai Kar

Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Budapest, 2022

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Irodalmi áttekintés	4
2.1. Élesztő, mint modellorganizmus	4
2.1.1. Ivaros szaporodás	5
2.1.2. Párosodási típusok	6
2.2. A populáció növekedése	6
2.3. A lag fázis hossza	7
2.4. Kölcsönhatások a populációban	8
2.5. Flokkuláció	9
2.5.1. Flokk képződés	10
2.5.2. Genetikai háttér	10
2.5.3. Heterofil kötődés Flo1p-vel	11
2.5.4. Adhéziós erők a flokkban	12
2.5.5. A ploidia szerepe a flokkuláció szabályozásában	12
2.5.6. A flokkuláció mérése	12
3. Tervezés	14
4. Módszerek és előkészületek	15
4.1. Felhasznált törzsek	15
4.2. Tápközegek	16
4.2.1. YPD (yeast peptone dextrose)	16
4.2.2. SD (synthetic defined)	16
4.2.3. Sporulációs táptalaj	16
4.3. Tárolás	16
4.4. Sporuláltatás	16
4.5. Spórák szétszedése mikromanipulátoros mikroszkóppal	17
4.6. Nyomdázás	17
4.7. Kolónia PCR	17
4.8. Gélelektroforézis	18

4.9. Előkultúra készítés	18
4.10. Növekedésvizsgálat	19
4.10.1. Kevert kultúrák esetén	19
4.11. A lemezolvasó beállításai	19
4.11.1. Általános esetben	19
4.11.2. Flokkulens törzsekre	20
4.12. Kiértékelés	20
4.13. Felvételek készítése fluoreszcens mikroszkóppal	21
5. Eredmények	22
5.1. Több ponton mérés	22
5.2. Fluoreszcencia mérés	23
5.3. Különböző rázatások	24
5.4. Kölcsönhatások	25
5.5. Fluoreszcens mikroszkópos képek	29
6. Eredmények értékelése	30
6.1. Növekedési görbék erősen flokkulens törzsek esetén	30
6.2. A ráztatás hatása a mérési eredményekre	30
6.3. Kölcsönhatások vizsgálata	30
6.4. Fluoreszcens mikroszkóppal készült képek	32
7. Összefoglalás	34
8. Jövőbeli tervek	35

Kivonat

A dolgozat alapjául szolgáló kutatás során olyan élesztőtörzsek együttes növekedését vizsgáltam lemezolvasó segítségével, melyek hajlamosak flokkulálásra, azaz folyadékban pelyheket képeznek.

Ez a tulajdonság megnehezíti a populáció növekedésének lemezolvasóval történő mérését, ugyanis a mért optikai denzitás a sejtszámmal nem feltétlenül lesz arányos. Annak érdekében, hogy lemezolvasó segítségével megbízhatóbb eredményekhez jussunk, különböző beállítások mellett mértem flokkulens törzsek növekedését. Emellett a flokkulens (és nem flokkulens) törzsek együttes növekedésének vizsgálatát is megkezdtem.

Jelen dolgozatban először nagyívű irodalmi áttekintést nyújtok az élesztőkről és felhasználásukról. Ezt követően bemutatom a kísérletes munka folyamán használt eljárásokat, és a kísérletek eredményeit. Végül az eredmények értékelését követően további terveimet mutatom be a mérések javítására és az együttes növekedés, valamint a populációk közötti kölcsönhatások vizsgálatára.

1. Bevezetés

Az élesztők vizsgálata több okból is különösen érdekes. Egyrészt széles körben és nagyon jól használhatók, mint eukarióta modellorganizmus, illetve több területen is jelentős a biotechnológiai alkalmazásuk. Ezért is fontos, hogy molekuláris működésük mellett kiemelt figyelmet fordítsunk mikrobiális közösségekben betöltött szerepeikre és kölcsönhatásaikra is.

Különböző élesztőtörzsek páronkénti kevert kultúráinak segítségével vizsgálható, hogy a törzsek együtt tenyésztése esetén hogyan hatnak egymás növekedésére a különböző populációk. Az eredmények alapján matematikai modell állítható fel a sejtek közötti kapcsolatok szimulációjára, mellyel megbecsülhető a populáció viselkedése.

Bizonyos élesztőtörzsekre jellemző az ún. flokkuláció, azaz folyadékban a sejtek összetapadva pelyheket képeznek. Ez a stratégia jellemző a bor- és sörkészítésben használt egyes élesztőtörzsekre [1]. A flokkulációra való hajlam bizonyos esetekben hasznos tulajdonság, mely egyes közegekben szelekciós előnyt biztosíthat az élesztőtörzs számára [2].

A laboratóriumokban általánosan használt (ún. "háziasított") törzsek jelentős része nem képes vagy nem hajlamos flokkulálásra [3]. Ennek a tulajdonságnak leginkább a szeszes italok készítése során van szerepe, ugyanis az erjedés végeztével a leülepedett (vagy épp a megkötött szén-dioxid miatt a felszínre úszó) élesztőket könnyen, gazdaságosan és környezetbarát módon tudják eltávolítani [4][1].

Különösen igaz ez a sörfőzésre, melynek során az ily módon kinyert élesztők egy részét felhasználják a következő fermentációhoz. Ráadásul a sör erjedéséhez viszonylag rövid időre van szükség, így fontos, hogy a felhasznált élesztők gyorsan kiürüljenek az oldatból [1].

A flokkulens élesztőtörzseket kutatják tehát a sörök minőségének fenntartása és javítása érdekében, de ezen túlmenően a flokkban kialakuló együttműködés, és általánosságban a létrejövő sejt aggregátumok a multicellularitás felé vezető evolúció kutatásában modellként alkalmazhatóak [2] [3].

Az élesztők folyadék tápközegekben való növekedésének mérésére jó eszköz a lemezolvasó, de az erősen flokkulens törzsek esetén a laborban általánosan használt protokoll nagyon rossz minőségű adatokat eredményezett. Ennek oka, hogy ez a tulajdonság megnehezíti a populáció növekedésének lemezolvasóval történő mérését, ugyanis a mért optikai denzitás a sejtszámmal nem feltétlenül lesz arányos, mivel a sejtek nem homogén módon helyezkednek el a médiumban.

A dolgozat felépítése

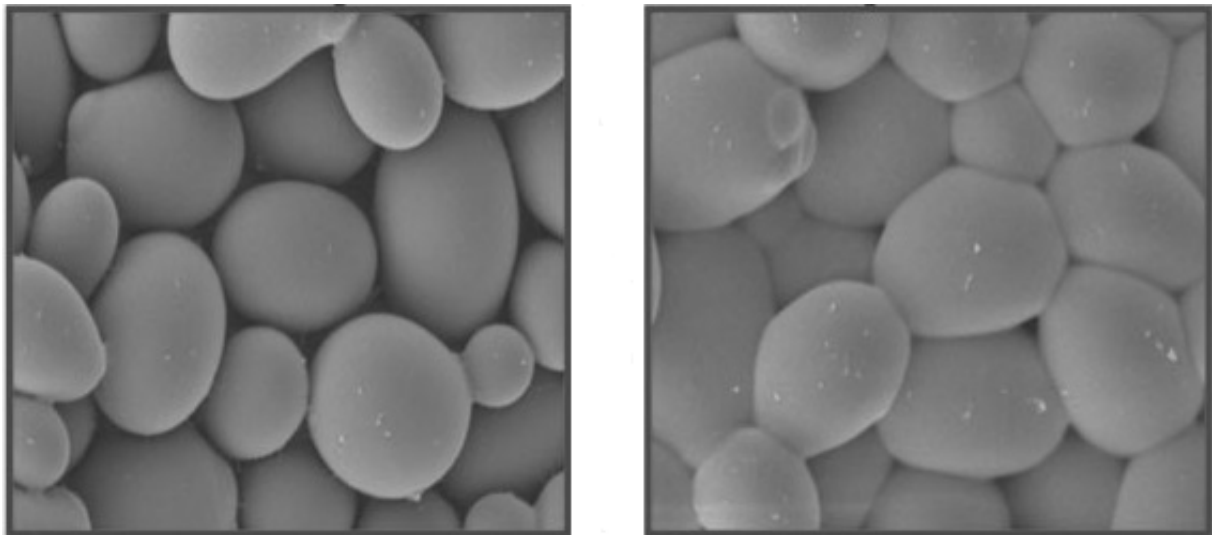
A dolgozatom folyamán először bemutatom az általam megismert témához kapcsolódó irodalmat. Ennek során általánosságban bemutatom az élesztőket, főként a sarjadzó élesztőt (*Saccharomyces cerevisiae*), kitérve a populációk viselkedésére. Ezt követően ismertetem a flokkuláció jelenségét, okait és gyakorlati jelentőségét.

Az irodalmi áttekintést követően leírom a tervezés főbb lépéseit, majd a megvalósítás során alkalmazott eljárásokat és anyagokat. Ezután bemutatom a kísérletek eredményeit, és az eredmények értékelését. Végül ismertetem a jövőbeli terveimet a mérések további javítására és vizsgált törzsek közti kölcsönhatások további vizsgálatára.

2. Irodalmi áttekintés

Az élesztők egysejtű, eukarióta mikroorganizmusok. Mind élelmiszeripari, mind biológiai szempontból kiemelkedő jelentőséggel bírnak, különösen a *Saccharomyces cerevisiae* faj (sarlós élesztő) [5].

Különböző törzsei használatosak a szeszes italok készítése során (sör- és borélesztők), ahol az etanol képződéséért felelősek, illetve kenyerek és más kelt tészták kelesztéséhez, ahol elsősorban szén-dioxid kibocsátásuk révén érik el a pékáruk levegős állagát [5]. Az általuk végzett erjesztés során a fentiekén túl képződnek olyan melléktermékek is, amelyeket ízanyagként érzékelünk. Ez a tulajdonságuk a sütőiparban kevésbé lényeges, de sör- és borkészítés folyamán a megfelelő ízhatás eléréséhez kiemelt fontosságú [6].



1. ábra. Élesztőkolóniák elektronmikroszkópos képei, bal oldalt a sejtek nem tapadnak egymáshoz, jobb oldalt a sejtek összetapadnak (flokkulálnak).

Forrás: [D. C. Queller, “The social side of wild yeast,” *Nature*, vol. 456, no. 7222, pp. 589–590, Dec. 2008 után módosítva.

2.1. Élesztő, mint modellorganizmus

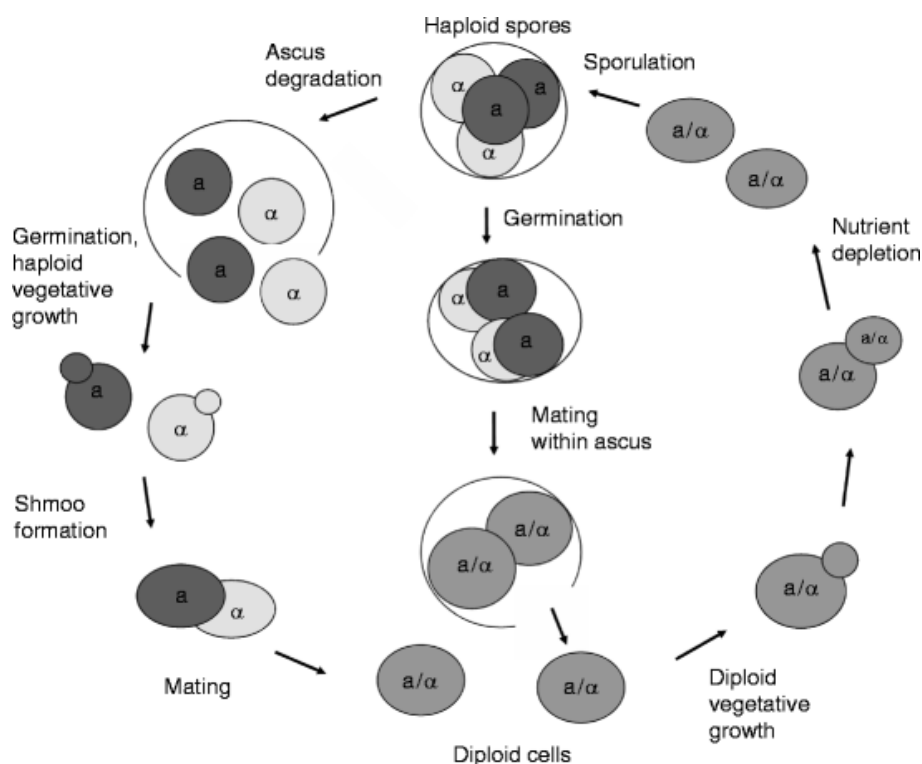
Az élesztők biológiai fontossága abból ered, hogy nagyon jól használhatóak, mint eukarióta modellorganizmus [5]. Ennek egyik lényeges oka, hogy habár eukarióta, több, a prokariótákhoz hasonló előnyös tulajdonsággal bír, amelyek megkönnyítik a vele kapcsolatos munkavégzést. Az élesztők genomja könnyen manipulálható, növekedésük gyors, de alapvető funkcióikban (pl.

sejtciklus) az emlős sejtekhez hasonlóan viselkednek [5]. Ezen túlmenően a sarjadzó élesztő nem patogén, azaz vizsgálata során nincs szükség különleges óvintézkedésekre [5].

A *Saccharomyces cerevisiae* törzsek további különleges - és biológiai vizsgálatok szempontjából kedvező - tulajdonsága, hogy mind diploid, mind haploid formában stabilak és mitotikus osztódásra képesek [5]. Mitotikus osztódással történő ivartalan szaporodásukat sarjadzásnak nevezzük. Ennek során az anyasejt egy vele genetikailag megegyező leánysejtet hoz létre [7][8].

2.1.1. Ivaros szaporodás

Kedvező körülmények közt az élesztősejtek ivartalanul szaporodnak, de kedvezőtlen körülmények között (tápanyag- vagy oxigénhiányos környezetben) a diploid sejtek képesek ivaros szaporodásra, melyet sporulációnak nevezünk [5]. Ennek eredményeként négy darab haploid sejt jön létre, melyeket spóráknak nevezünk, míg a négy spóra együttesére tetrádként hivatkozunk [5].



2. ábra. A sarjadzó élesztő sejtciklusának összefoglalása

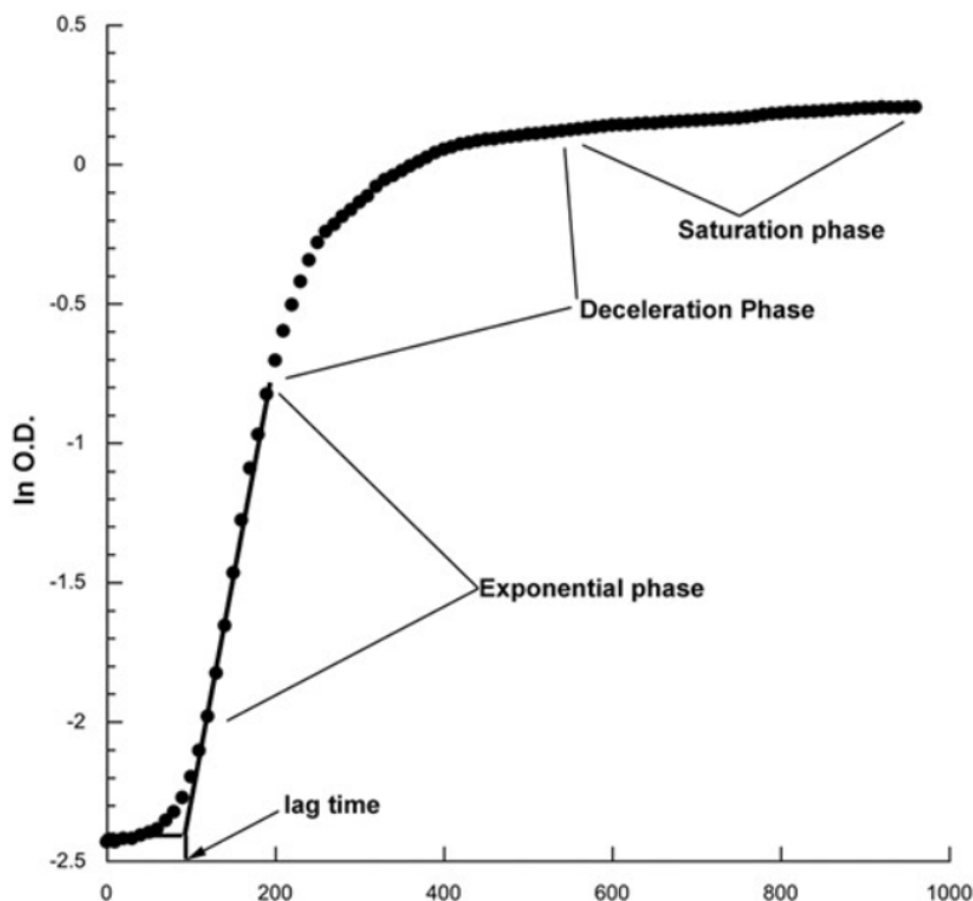
Forrás: C. Geijer, D. Joseph-Strauss, G. Simchen, N. Barkai, and S. Hohmann, "Saccharomyces cerevisiae Spore Germination," *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*, pp. 29–41, 2010, doi: 10.1007/978-3-642-12422-8₃.

2.1.2. Párosodási típusok

A spórák kétféle párosodási típus (a és α) valamelyikébe tartoznak, két különböző típus párosodásával ismét diploid sejt jön létre [9].

A párosodási típust a MAT gén kódolja, alléljai MATa és MAT α [10]. A sarjadzó élesztő vad típusa képes a párosodási típusát akár minden generációban megváltoztatni szakasz specifikus homológ rekombináció segítségével, melynek során a MAT allélt egy addig máshol tárolt DNS szakaszra - a másik MAT allélra - cseréli a sejt [10]. A párosodási típus megváltozása vizsgálataink szempontjából nehézségeket vetne fel, ezért a MAT cseréért felelős HO gént [10] a csoport tagjai korábban kiütötték.

2.2. A populáció növekedése



3. ábra. Az élesztőkre jellemző növekedési görbe. A vízszintes tengelyen az idő, a függőlegesen pedig az ln OD mennyiség látható, amely a sejtszámmal arányos. Forrás: Hall, Barry G., et al. "Growth rates made easy." *Molecular biology and evolution* 31.1 (2014): 232-238.

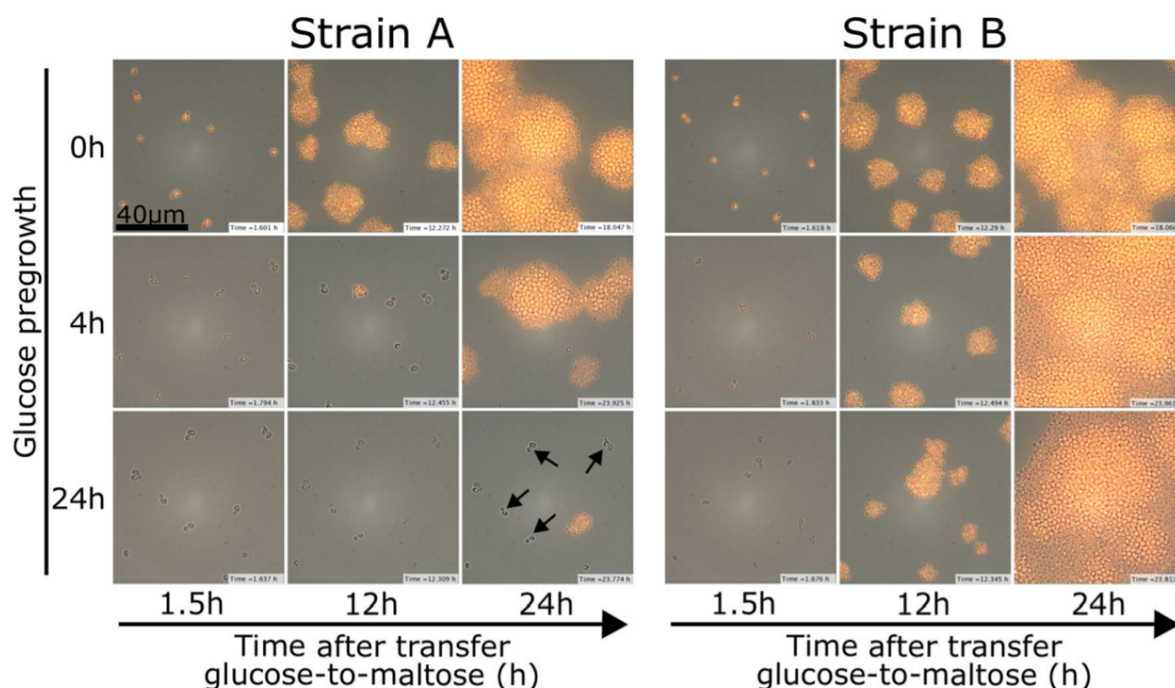
Az élesztőpopulációk növekedésére jellemző tipikus görbét a 3. ábrán láthatjuk. A növekedés kezdetben lassú. Ezt a szakaszt "lag" fázisnak nevezzük. A lassú szaporodás oka, hogy a sejtek még nem alkalmazkodtak az új közeghez [11]. Ennek végére a sejtek metabolizmusukat úgy változtatják meg, hogy az új környezetben is növekedni tudjanak, ezáltal átlépnek az ún. exponenciális szakaszba [12]. Ennek során a sejtek száma exponenciálisan növekszik [11]. Ez a növekedési ütem hosszú távon nem fenntartható, és a tápanyagok fogyása, illetve a melléktermékek megnövekedett koncentrációja miatt a növekedés egy idő után lassulni kezd, mígnem a populáció mérete eléri a maximumot, és a növekedés lényegében leáll [11][9].

2.3. A lag fázis hossza

Amint említettem a lag fázis az az időszak, melyben a sejtek az új környezethez még nem alkalmazkodtak, ezért nem képesek szaporodni. Új szénforrású közegbe kerülve a lag fázis hossza több tényezőtől is függ [12]. Ilyen tényező többek közt az, hogy az átkerülést megelőző időszakban találkozott-e az új típusú szénforrással az élesztő, avagy sem, de ezen kívül különbségeket mutatnak a különböző törzsek, mi több az azonos génállományú egysejt populációkon belül is vannak eltérések az egyedi sejtek lag fázisainak hosszában [12]. Kimutatható, hogy a sejtek közt jelentős arányban találhatók olyanok, amelyek sosem lépnek ki a lag fázisból, azaz nem alkalmazkodnak az új környezethez (4. ábra)[12]. Az új szénforráshoz szükséges alkalmazkodás során a sejtnak meg kell termelnie a felhasználásához szükséges enzimeket, ami időt és energiát vesz igénybe [12]. Ennek ellenére úgy tűnik, hogy a lag fázisból kilépést leginkább limitáló tényező az, hogy a sejtek új szénforrású közegbe kerülve aerob anyagcserébe kezdenek az addigi erjesztés helyett [12]. Ennek legvalószínűbb oka, hogy míg az erjesztéssel gyorsan nyerhetnek energiát, biológiai oxidáció során egységnyi cukorból több energiát nyernek – bár lassabban [12].

Láthatjuk, hogy az egyes sejtek különböző gyorsasággal képesek alkalmazkodni, sőt, vannak olyanok, amelyek erre egy nap elteltével sem képesek. Felvetődik a kérdés, hogy mi az oka a genetikailag homogén populáción belüli különbségeknek. Nem találtak összefüggést sem a sejtek korával, sem a sejtciklusuk állapotával, azonban a jelenség magyarázható biológiai zaj jelenlétével [12]. Eszerint a sejtek viselkedése közt genetikailag homogén, azonos környezetben levő populációban is vannak sztochasztikus jellegű eltérések [12].

Ennek következtében állandó környezetben a sejtek egy adott hányada kevésbé hatékonyan működik, de egy esetleges változáshoz gyorsabban tudnak alkalmazkodni, biztosítva ezzel a



4. ábra. Kétféle törzs növekedése maltózós táptalajra kerülést követően az időben, különböző idejű glükózon növekedést követően. A sejtek fluoreszcensen jelöltek, a fluoreszcens fehérje termelését a Mal12 indukálja, amely a lag fázis végén következik be, azaz a világító sejtek sikeresen kiléptek a lag fázisból. Az „A” törzs esetében fekete nyilakkal jelölték azokat a sejteket, amelyek 24 óra elteltével sem alkalmazkodtak az új környezethez. Forrás: Vermeersch, Lieselotte, et al. "On the duration of the microbial lag phase." *Current genetics* 65.3 (2019): 721-727.

populáció fennmaradását [12]. Ez a gondolat felveti a lag fázis evolúciós optimalizáltságának lehetőségét, bár ez még nem bizonyított [12].

2.4. Kölcsönhatások a populációban

Az élővilág más tagjaihoz hasonlóan az élesztők számára is kritikus, hogy a túlélésük érdekében a rendelkezésre álló erőforrásokból többet és jobban tudjanak felhasználni, mint azok, akikkel ezeken az erőforrásokon osztoznak. A hasonló erőforrásokat igénylő egyedek illetve populációk közt versengés vagy együttműködés alakulhat ki.

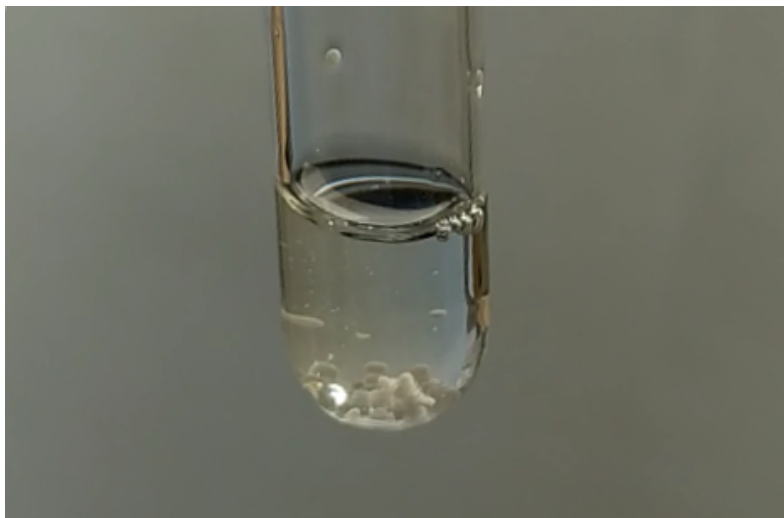
Az élesztők közötti együttműködésre jó példa a flokkuláció, amely egy olyan együttműködés, ami csak bizonyos mennyiségű résztvevő elérése esetén jár haszonnal [2].

A flokkulálás viszont a legtöbb törzs esetében egyfajta stresszreakció, amelynek célja a kedvezőtlen körülmények átvészélése, vagy a gyors ülepedés révén elhagyása [3]. Kedvező

körülmények között tehát nem alakul ki ez a típusú kooperáció a populáció tagjai közt.

2.5. Flokkuláció

A flokkuláció (pelyhesedés) az élesztősejtek aggregációja, melynek során akár több ezer sejtből álló flocok jönnek létre [13][1]. Adott esetben ezek szabad szemmel is láthatóak (5). A laboratóriumi körülmények közt használt törzsek jelentős része elveszítette ezt a képességét [3], de az élelmiszeriparban, különösen a sörkészítéshez használt élesztők körében a tulajdonság kiemelt jelentőséggel bír [1].



5. ábra. Adott esetben a flocok olyan nagyok, hogy szabad szemmel is láthatóak. A képen a kísérletek során használt egyik flokkulens törzs¹ látható

A flokkuláció nélkülözhetetlen a sörgyártásban, ugyanis ez biztosítja a fermentáció végeztével a felhasznált élesztő gyors ülepedését, kivéve a hagyományos felső erjesztésű söröket, melyek esetében a pelyhek a képződött gázokat felfogják, és a folyadék tetejére úsznak [1]. Mindez azért bír nagy jelentőséggel, mert a sörkészítés során - más erjesztési eljárásoktól eltérően - nem pusztán a használt élesztő eltávolítására, de a visszanyerésére is törekednek [1].

Ezen túlmenően a flokkulens élesztők modellként szolgálhatnak a kooperatív viselkedés evolúciójának tanulmányozásához is - habár a sarjadzó élesztőnek nincsen többsejtű leszármazottja [3].

¹UWOPS87-242.1 KanMx mCherry a egy éjszakán át SD-ben növesztett előkultúrája (lásd: 4.2.2, 4.9)

2.5.1. Flokk képződés

Bizonyos mérettartomány fölött a létrejövő aggregátum, melyet flokknak neveziünk, védelmet biztosít a benne levő sejtek számára a kémiai és biológiai stresszel szemben [3].

Lényeges megkülönböztetés a flokk képződés tekintetében, hogy a sejt csoportosulások hogyan jönnek létre: lehetséges egyrészt, hogy a képződő leánysejtek együtt maradnak az anyasejttel (staying together, röviden ST), másrészt lehetséges, hogy önálló sejtek később aggregálódnak (coming together, röviden CT) [2]. A staying together módon képződő csoportosulások genetikailag erősen homogének, míg coming together mechanizmussal genetikailag heterogén flokkok is létrejöhetnek [2].

A sörélesztők közt két fő fenotípust különböztetnek meg flokkuláció szempontjából: ezek a Flo1 és a NewFlo fenotípusok [1][14]. A NewFlo fenotípusú élesztők csak az erjedés végeztével flokkulálnak, mivel ebben az esetben az összetapadást a nyers sörlében még jelen levő cukrok gátolják [14].

Ezzel szemben a Flo1 fenotípusú törzsek esetében a flokkuláció mértéke nem függ az erjedés állapotától [14]. A Flo1 fenotípus esetén a flokkok kialakulásához a sejtfelszíni flokkulinok mannóz maradványokhoz kötnek, ezért a flokkulációt ilyen esetekben a mannóz képes gátolni [14].

Az élesztősejtek közt megvalósuló kötődéshez mindkét esetben Ca^{2+} ionokra van szükség [14]. Sörkésztetés szempontjából egy kevésbé lényeges (vagy ismert) fenotípus esetén az élesztősejtek Ca^{2+} jelenléte nélkül, illetve mannóz jelenlétében is képesek flokkulálni [1].

Mind a Flo1, mind a NewFlo fenotípusok coming together módon képeznek flokkokat.

Sörgyártás során kedvező tulajdonságaik miatt elsősorban NewFlo fenotípusú élesztőtörzseket alkalmaznak [1].

2.5.2. Genetikai háttér

A flokkulációban részt vevő fehérjéket (flokkulineket) a FLO gének kódolják [1]. Közülük kettőt emelnék ki, ezek a FLO1 és a FLO11. A FLO1 és közeli rokonai (FLO5, FLO9 stb.) felelősek a coming together csoport képződésért Flo1 fenotípus esetén [1]. A FLO1 nagy számban tartalmaz tandem ismétlődő szekvenciákat, ennek következtében több variánsa létezik, melyek a hosszukban különböznek [1]. A FLO11 elsősorban a staying together csoport képződésben játszik szerepet [2].

Ezt a két gént ún. zöldszakáll génként azonosították, mivel nem csak a csoport képződésért - így a kooperáció kialakításáért - felelősek, de lehetővé teszik a rokon felismerést is [3]. Zöldszakáll² génnek az olyan géneket nevezik, amelyek segítségével nem csak felismerhető a másik, ilyen gént hordozó egyed, de együttműködésbe is tud lépni vele [2] [3]. Különlegességük, hogy egyetlen allél megléte alapján történik a felismerés és a megkülönböztető bánásmód, azaz az együttműködésben részt vevő egyedek közt a genetikai hasonlóság valójában csak e gén tekintetében számít [3].

Amint említettem, a labortörzsek jelentős része teljesen elveszítette a flokkulációra való képességét [4]. Ennek hátterében sok esetben egy harmadik lényeges FLO gén, a FLO8 mutációja vagy elvesztése áll, ugyanis ez a FLO gén nem egy flokkulint, hanem a többi FLO gén átíródásához szükséges transzkripció faktorát kódolja [3].

2.5.3. Heterofil kötődés Flo1p-vel

Annak ellenére, hogy a FLO1-et zöldszakáll génként azonosították, a róla átíródó Flo1p flokkulin nem kizárólag olyan sejtekhez képes kapcsolódni, amelyek szintén hordozzák, a rokonfelismerés tehát megengedő [2]. Feltételezik, hogy minél hosszabb a FLO1 gén (és ennek következtében az átíródó Flo1p), annál erősebb kötést képes létrehozni, mindemellett annál kevésbé szelektíven kötődik a Flo1p-t szintén kifejező sejtekhez [2].

Ez az oka annak, hogy egy nem flokkulens, azaz nem együttműködő (ebben a helyzetben csaló) sejt képes bekerülni a flokkba és kihasználni az általa nyújtott előnyöket - miközben az együttműködés árát, a flokkulinok szintézisének metabolikus költségét nem fizeti meg, ezért potenciálisan képes túlnőni a flokkulens törzset [2].

Ezzel szemben úgy tűnik, hogy a FLO1 gén hosszának változékonysága lehetővé teszi, hogy az adott környezethez alkalmazkodjon a flokkulens törzs, így módon tehát a flokkulens fenotípus változó környezetekben stabil maradhat, és megfelelő körülmények között stabil együttélés jöhet létre flokkulens és nem flokkulens törzsek közt [2].

A sörgyártásban ismert jelenség, hogy nem flokkulens törzsekből is képződhetnek flokkok flokkulens törzs jelenlétében [15]. Ezt a jelenséget ko-flokkulációnak nevezik.

²A név eredete: R. Dawkins, *The Selfish Gene*. Oxford: Oxford University Press, 1976.

2.5.4. Adhéziós erők a flokkban

A flokkulinok általános felépítése az alábbi: az N-terminális a sejten kívül helyezkedik el és tartalmazza a szénhidrát (mannóz) kötő domént, a C-terminális a sejtfalhoz kötődik, a kettő között pedig szerintben és treoninban gazdag tandem ismételt szekvenciák vannak, hosszú, hidrofób részt eredményezve [16]. Mechanikai behatások következtében a vizes oldatban alapvetően összetekeredve jelen levő középső, hidrofób szakasz képes kitekerni [16]. Úgy tűnik, hogy a sejtek közti adhézió létrehozásában nem kizárólag a lektin-szerű kötések vesznek részt, hanem a mechanikai behatásokra széttelkeredő és egymással összekapcsolódó hidrofób fehérjerészek is [16]. Ezt igazolni látszik, hogy a médium bizonyos mértékű agitációja növeli a flokkulációt [15]

Ez a kötődési mechanizmus magyarázattal szolgálhat arra, hogyan lehetséges a Flo1p által megvalósított megengedő rokonfelismerés, de némileg ellentmond annak a feltevésnek, miszerint a fehérje középső szakaszában levő nagyobb számú tandem ismétlődő szekvencia ugyan erősebb kötődést biztosít, de kevésbé szelektív kötődést eredményez.

2.5.5. A ploidia szerepe a flokkuláció szabályozásában

A kísérletek során alkalmazott UWOPS87.242.1 törzs esetén vizsgálták a ploidia szerepét egyes, a biofilm képzéssel kapcsolatos fenotípusok esetén. A törzs haploid formában különösen nagy mértékben flokkulál és tapad felületekhez [17]. Az előbbi tulajdonság inkább a FLO1, az utóbbi inkább a FLO11 gén termékének jelenlétében jellemző [18].

Érdekes módon a törzs irodalmi adatok [17] és saját megfigyeléseink alapján diploid formában csak enyhén flokkulál. Ezen túlmenően, egyes esetekben flokkulens törzsekre jellemző, hogy szilárd táptalajon egyenetlen telepeket képeznek, de az UWOPS87.242.1-re ez nem jellemző.

2.5.6. A flokkuláció mérése

A flokkuláció mérése sokáig csak az ipari alkalmazásokban volt fontos [15]. Ennek oka, hogy míg a jelenség a sörgyártásban hasznos és nagy jelentőséggel bír, addig a laboratóriumi felhasználás során bizonyos fokú nehézségeket vet fel, így a labortörzsek közül a flokkulensek kisselektálódtak [17].

Sörélesztők esetén a flokkulációt Észak-Amerikában pl. az alábbi módszerrel mérik: a nyers sörléhez hasonló médiumban inkubálják a törzseket, majd két mintát vesznek a folyadékból. Az egyikben a tápoldatot olyan pufferre cserélik, amely a flokkulációhoz ideális környezetet teremt

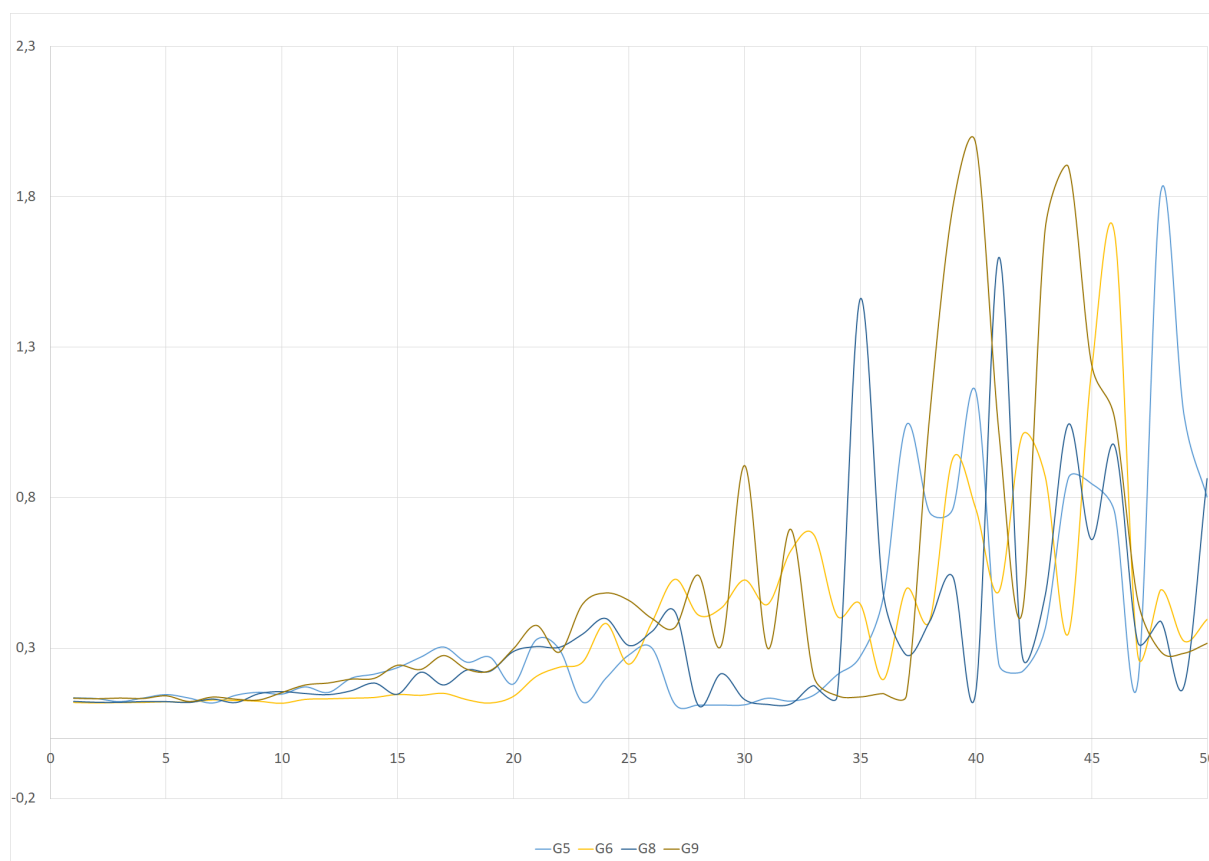
(Ca^{2+} ionokban gazdag), a másikban pedig olyanra, amely akadályozza a flokkulációt, végül egy adott ülepedési időt követően spektrofotometria segítségével megméri a még oldatban levő sejteket mindkét mintában, majd az arányuk alapján a törzseket három kategóriába osztják: nem flokkulens, flokkulens, erősen flokkulens [15].

3. Tervezés

A kutatómunka folyamán olyan élesztőtörzsek együttes növekedését szerettem volna vizsgálni (lemezolvasó segítségével), melyek hajlamosak flokkulálásra. Ez a tulajdonság megnehezíti a populáció növekedésének lemezolvasóval történő mérését, ugyanis a mért optikai denzitás a sejtszámmal nem feltétlenül lesz arányos, mivel a sejtek nem homogén módon helyezkednek el a médiumban, ahogy azt a 6. ábrán is láthatjuk.

Ahhoz, hogy lemezolvasó segítségével megbízható eredményekhez jussunk, optimalizálni fogom a jelenlegi protokollt flokkulens törzsek növekedésének méréséhez.

Az előkészületek során a használni kívánt törzsek rendelkezésre álló transzformált diploid-jaiból transzformált haploidokat hoztam létre mindkét féle párosodási típusban. Ezt követően különböző paraméterek és beállítások mellett növekedésvizsgálatokat végeztem.



6. ábra. A lemezolvasó "szokásos" beállítások mellett erősen flokkuláló törzsekre ehhez hasonló, lényegében használhatatlan eredményt ad. A vízszintes tengelyen a ciklusszám, a függőleges tengelyen az optikai denzitás látható.

4. Módszerek és előkészületek

Ebben a fejezetben a megvalósítás előkészületeit és a kísérletek folyamán felhasznált módszereket fogom bemutatni.

A kitűzött cél érdekében a mérésekhez olyan élesztőtörzseket válogattunk össze, amelyek különböző mértékben hajlamosak flokkulálásra, illetve lehetőleg rendelkezésre áll fluoreszcensen jelölt kolóniájuk.

4.1. Felhasznált törzsek

- UWOPS87.242.1: Hawaii kaktuszból izolált törzs, haploid formában erősen flokkulál [17]
- M28-1B: szőlőből izolált törzs, megfelelő körülmények közt képes flokkulációra
- Sigma1728b: labortörzs, pszeudohifa³ növekedésre képes [19]
- BY4743: labortörzs, nem flokkulens

Mind a négy törzs esetén rendelkezésre állt háromféle transzformált populáció:

- HO::KanMx::HO
- HO::Tef1p-GFP-Cyc1t-KanMx::HO
- HO::Tef1p-mCherry-Cyc1t-KanMx::HO

Az egyes transzformációkat a dolgozat folyamán rövidíteni fogom, rendre: KanMx, GFP, mCherry.

A megfelelően transzformált haploidok létrehozását és szelektálását követően a lemezoltatással végzett kísérletekhez főként fluoreszcensen jelölt, haploid **a** párosodási típusú élesztőket használtam.

³Ennek során a létrejövő leánysejtek az anyasejthez tapadva maradnak az osztódás befejezését követően is. A sarj az anyasejten olyan területen fog képződni, hogy a kolónia növekedése szál-szerű lesz [18].

4.2. Tápközegek

4.2.1. YPD (yeast peptone dextrose)

Tartalma: 1% élesztő kivonat, 2% pepton, 2% mikro agar (csak szilárd táptalajhoz), 2% glükóz⁴, 200 µg/ml geneticin, desztillált víz.

4.2.2. SD (synthetic defined)

200 ml tápközeg elkészítéséhez először 170 ml desztillált vízhez 4 g mikro agart (szükség esetén), illetve 0,34 g YNB-t (yeast nitrogen base) és 0,2213 g MSG-t (mono-sodium-glutamate) adunk, majd autoklávval sterilizáljuk. Ezt követően 20 ml aminosav mixet és 10 ml, autoklávozott 40%-os glükóz oldatot adunk hozzá, így 2% glükózos SD-t kapunk. Felhasználás előtt a céljainknak megfelelően 0,1% geneticint keverünk a tápközegbe.

Az aminosav mix (AA mix) az alábbi összetevőkből áll: 1,46 g dropout mix⁵, 0,38 g leucin, 0,076 g triptofán, 0,076 g uracil, 100 ml desztillált víz.

Az SD - a YPD-vel ellentétben - szintelen, így a lemezolvasóval történő méréseket ilyen tápközegben végezzük.

4.2.3. Sporulációs táptalaj

Tartalma: 88 ml víz, 2 g mikro agar, 10 ml aminosav mix, 2 ml 5M kálium-acetát.

4.3. Tárolás

Az élesztőtörzseket hosszú távon -80°C-on, 50%-os glicerinben tároljuk, így biztosítható, hogy megőrzik a minőségüket [20].

A rövid távú tárolás 4°C-on történt, szilárd, 2% glükóz (rezisztens törzsek esetén geneticines) YPD-n.

4.4. Sporuláltatás

A *Saccharomyces cerevisiae* kedvezőtlen körülmények között meiotikus osztódással spórákat képez. Ennek eléréséhez a korábban YPD-n felnevesztett élesztőket sporulációs táptalajra

⁴A legtöbb célnak megfelel a 2% glükóz tartalom, de egyes esetekben más glükóz koncentrációval vagy 2% etanollal helyettesítjük.

⁵Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements (Y1771-20G)

kenjük át. Az autoklávval sterilizált táptalajon szobahőmérsékleten legalább 5 napig hagyjuk nőni őket. A tetrádok létrejöttéről mikroszkóp segítségével bizonyosodunk meg.

4.5. Spórák szétszedése mikromanipulátoros mikroszkóppal

A spórák szétszedéséhez először le kell emésztetni a tetrádot körülvevő burkot. Ehhez 200 μl (desztillált vízzel) 200-szorosára hígított, 5 unit/ μl -es zymolase-ba pipettahegy segítségével kis mennyiségű élesztőt oldottunk bele. Az elegyet vortexeltük, majd 30 percen át 30°C-on inkubáltuk. Felrázás után a keverékből 30 μl -t geneticin nélküli YPD lemez szélére kentünk, majd a lemezt elhelyeztük a mikromanipulátoros mikroszkóp alatt. A tű segítségével a tetrádokat a lemez addig nem használt területeire vittük, ahol szétráztuk őket és egyenként elhelyeztük a spórákat. A folyamatot minden kiindulási élesztőfajta esetében hatszor elvégeztük, hogy az inszerteket tartalmazó egysejt kolóniák közt nagy valószínűséggel találjunk mindkét párosodási típusból. Ez azért szükséges, mert az inszert és a párosodási típust kódoló MAT gén különböző kromoszómán helyezedik el.

4.6. Nyomdázás

Miután felnőttek, a telepeket geneticint is tartalmazó táptalajra nyomdáztuk steril, szőszmentes kendő és nyomdázó segítségével.

4.7. Kolónia PCR

Az *S. cerevisiae* párosodási típusát a MAT gén kódolja [10], ezért a párosodási típus megállapításához ezt a DNS szakaszt sokszoroztuk fel PCR segítségével.

A PCR keveréket (master mix) jégen, szűrős pipettaheggyel készítjük el. Tartalma 1 reakcióra (50 μl keverék): 39,25 μl víz, 5 μl 1x DreamTaq puffer, 2,5 μl MAT primer mix ⁶, 1 μl 10 mM dNTP, 0,25 μl 5U/ μl DreamTaq enzim. Az enzimet adjuk hozzá utoljára, előtte az elegyet vortexeljük.

A kiszemelt kolóniákból kis mennyiségű élesztőt pipettahegy segítségével PCR stripbe tettünk, majd mikrohullámú sütővel roncsoltuk a sejteket (másfél percen át, 750 W-on). Ezt követően a

⁶A MAT primer mix 10 μM koncentrációjú a MAT1, MAT2 és MAT3 primerekre.

MAT1: AGTCACATCAAGATCGTTTATGG

MAT2: GCACGGAATATGGGACTACTTCG

MAT3: ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG

master mixből 50-50 μl -t pipettáztunk az egyes csövekbe, és elhelyeztük őket a PCR gépben. A reakciót az alábbi beállításokkal futtattuk:

95°C	3 perc	1 ciklus
95°C	30 sec	30 ciklus
58 °C	30 sec	
72 °C	60 sec	
72 °C	5 perc	1 ciklus

1. táblázat. A PCR reakció beállításai

4.8. Gélelektroforézis

A párosodási típust meghatározó MAT allélokról képződő PCR termékek hossza különböző (MAT α - 492, MAT α 369 bp) így gélelektroforézissel megállapítható, hogy a felszorzott MAT gén milyen párosodási típust kódol.

A mintákat 1,5%-os agaróz gélen, 1xTAE pufferben futtattuk. A minták gélbe töltése előtt 6 μl loading puffert (75 μl víz, 30 μl 1:33 SybrGreen DMSO, 75 μl BlueJuice LB) adtunk hozzájuk. A keverékből 20 μl betöltését követően 100 V-on, kb. 90 percig (amíg megfelelő mértékben szétváltak) futtattuk a mintákat.

A gél UV fény segítségével értékeltük ki.

4.9. Előkultúra készítés

A növekedésvizsgálatokat megelőzően előkultúrát készítünk, olyan folyadék tápközegben, ami-
ben a mérést szeretnénk végezni (általában 2% glükóz) SD, lehetőség szerint geneticinnel, hogy a mérés során minimalizáljuk a befertőződés kockázatát).

Ehhez steril fülke alatt 2 ml tápközegbe élesztőt oltunk. A sejteket egy éjszakán át, 30°C-on, rázatás (200 rpm, orbital) mellett hagyjuk nőni. Ez a rázatás megakadályozza a sejtek ülepedését, de a fokok kialakulásának kedvez.

4.10. Növekedésvizsgálat

Először a már felnövesztett előkultúrákon optikai denzitás mérést végzünk. A flokkulens törzseket ezt megelőzően vortexeljük és szuszpendáljuk, hogy a lehető leghomogénebb szuszpenzió tudjuk az előzetes mérést elvégezni.

Az optikai denzitás értékből kiindulva azonos töménységűre hígítjuk az előkultúrákat, majd 96 lyukú lemezbe⁷, 190 μ l SD tápoldatba (4.2.2) mérünk a sejtes oldatból 10 μ l, az előzetesen megalkotott elrendezésben. A minták optikai denzitása így a mérés elején 0,1 lesz.

A bemérés után a Tecan Spark 20M készülékkel mérjük (továbbiakban: lemezolvasó) az élesztők növekedésének a mértékét abszorbancia és fluoreszcencia alapján, 24 óra alatt (vagy amíg stationer állapotba nem kerülnek).

Különböző lemezolvasó beállításokkal kísérleteztünk, annak érdekében, hogy a flokkulens törzsek méréséhez legalkalmasabbat megtaláljuk.

4.10.1. Kevert kultúrák esetén

Két élesztőtörzs (a példában A és B) növekedésének együttes vizsgálatát az alábbi módon végezzük:

Adott arányban összekeverjük az előzetesen kihígított két fluoreszcensen (különbözően) jelölt törzset, mindkét módon (A GFP - B mCherry, és A mCherry - B GFP).

Ugyanilyen arányban keverjük a törzseket önmagukhoz, tehát ha eredetileg 1:1 arányban kevertük össze A-t és B-t, akkor 1:1 arányban összekeverük A GFP-t és A mCherryt, illetve B GFP-t és B mCherry-t. Ezeket kontrollnak fogjuk használni.

Végül azt vizsgáljuk, hogy a fluoreszcens jel változása mennyiben különböző A és B keverékében a kontrollhoz képest.

4.11. A lemezolvasó beállításai

4.11.1. Általános esetben

A mérés alatt a lemezt 29°C-on tartjuk, és a kiolvasások között rázatjuk (körkörösén, 5mm-es amplitúdóval).

Egy ciklus alatt a műszer megméri az egyes lyukakban az optikai denzitást 600 nm-en, és a fluoreszcenciát GFP illetve mCherry tartományon (GFP esetén: gerjesztés 485 ± 5 nm, emisszió

⁷Greiner 96 Flat Black Ref: 655976

520 $\pm$ 5nm, mCherry esetén: gerjesztés 585 $\pm$ 5nm, emisszió 620 $\pm$ 7,5 nm).

Az egyes lyukak mérése során a kiolvasás alapértelmezetten egy ponton, a lyuk közepén történik. Egy mintával általában 3-5 párhuzamos mérést futtatunk, annak érdekében, hogy hiba esetén is elégséges információhoz jussunk. Emellett feltételezhető, hogy az adott minta a különböző lyukakban azonosan növekszik, így az egyes lyukakban levő minták átlagolásával általános leírást kaphatunk az adott mintáról.

4.11.2. Flokkulens törzsekre

Úgy találtuk, hogy flokkulens törzsek esetén több mérési pont figyelembe vétele javít a mérési eredményeken, ezért a lemezolvasó beállításait így módosítottuk.

Az bizonyult a legjobbnak, hogy öt darab, kereszt alakban elhelyezkedő kiolvasás alapján a kiolvasott értékek átlagát feltételezzük helyesnek. Több mérési pont felvétele természetesen tovább javítja az eredményeket, de a mérés idejét is nagyban megnöveli.

A mérések közötti rázatás paramétereinek megváltoztatásával is javulást szerettünk volna elérni.

Annak érdekében, hogy a görbéket megfelelő mértékben "kisimítsuk", mozgóátlagot számoltunk. Azt tapasztaltuk, hogy az egy pontot körbevevő 1-1 érték figyelembe vételével már olyan görbét kapunk, amin a jel-zaj arány kedvező.

4.12. Kiértékelés

A lemezolvasó a mérési eredményeket .xlsx file-ba exportálja. Az adatok utófeldolgozását Microsoft Excel segítségével végeztem el.

Ehhez a tápoldat által keltett háttér jelet levontam.

A kevert kultúrák növekedésének vizsgálatához 4 grafikont készítünk, ezek mindegyikén 2 görbével.

A fenti (4.10.1) példát folytatva A és B együttes növekedésének vizsgálatához először az A GFP - B mCherry keverék fluoreszcenciáját ábrázoljuk a GFP spektrumában, majd ugyanezen a grafikonon ábrázoljuk a GFP jelet az A GFP - A mCherry lyukban. Hasonlóan, egy másik grafikonon ábrázoljuk az A GFP - B mCherry keverék fluoreszcenciáját az mCherry spektrumon és a B GFP - B mCherry keverék mCherry jelét.

Az eljárást ismételjük az A mCherry - B GFP keverékre.

4.13. Felvételek készítése fluoreszcens mikroszkóppal

A felvételeket olyan, egy napig növesztett folyadékkultúrákról készítettük, amelyekbe kezdetben azonos mennyiségű élesztősejtet oltottunk a kétféle törzs előkultúrájából. A keverék egy részét tárgylemezre pipettáztuk, ügyelve arra, hogy kerüljenek bele makroszkopikus flocok.

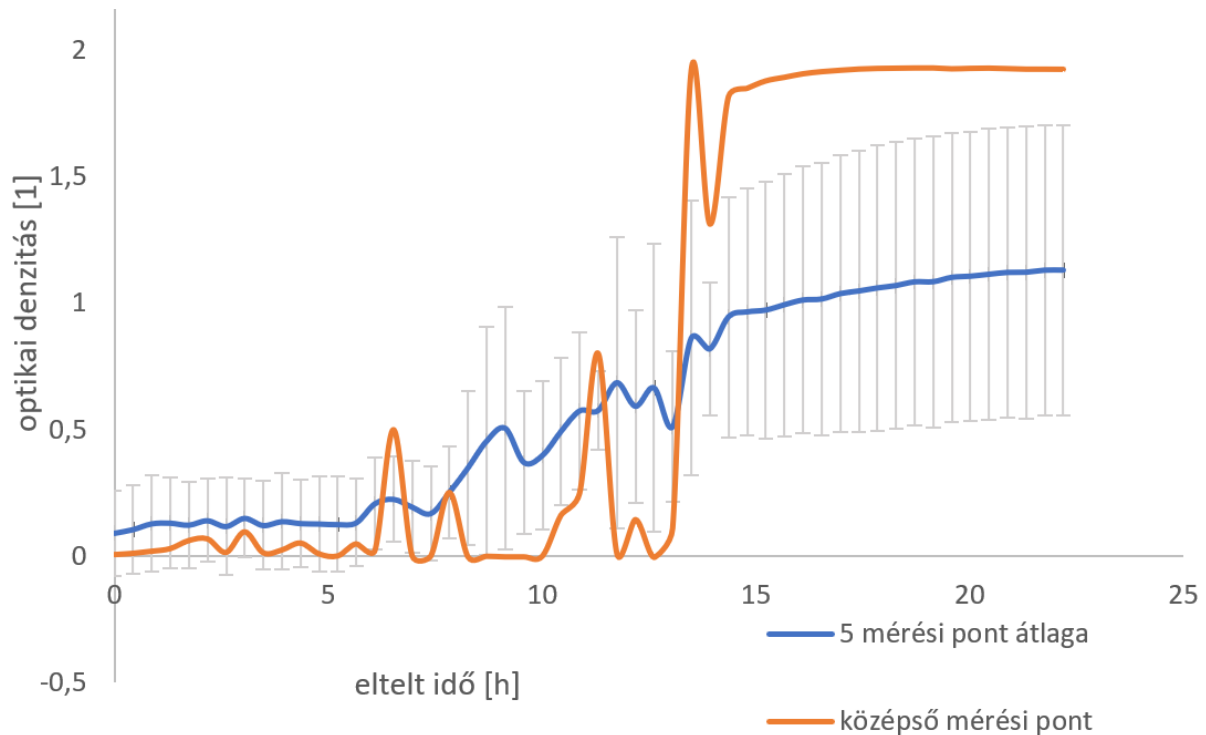
A felvétel készítéséhez a kar esztergomi laborjában található Nikon Eclipse Ti2 inverz biológiai mikroszkópot használtam. Jellemzően három csatornán készítettünk képeket: a GFP jelről (FITC), az mCherry jelről (TRITC) és normál fénymikroszkóppal. Az előbbi kettő segítségével a sejtekről megállapítható, hogy melyik törzshöz tartoznak, az utóbbival pedig jól láthatóvá válnak a sejtfalak.

A készült felvételeket Image J segítségével exportáltam.

5. Eredmények

5.1. Több ponton mérés

A jobb mérési eredmények elérése érdekében egy adott lyukból több ponton történt az optikai denzitás és a fluoreszcencia mérése.

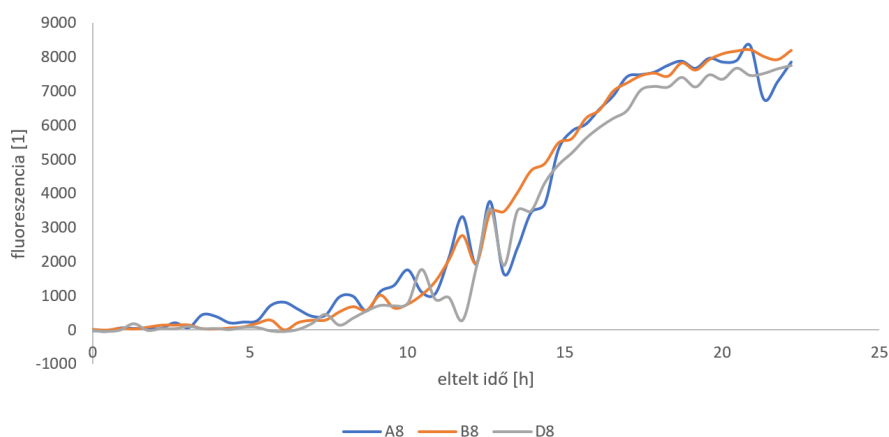


7. ábra. Erősen flokkulens törzs (UWOPS87.242.1 GFP haploid a) optikai denzitása az eltelt idő függvényében. Az egy lyukon belül történő több mérés (kék) jobb növekedési görbét eredményez, mint kizárólag a középső pont figyelembe vétele (narancssárga). A hibasávok az 5 mérési pont szórását mutatják.

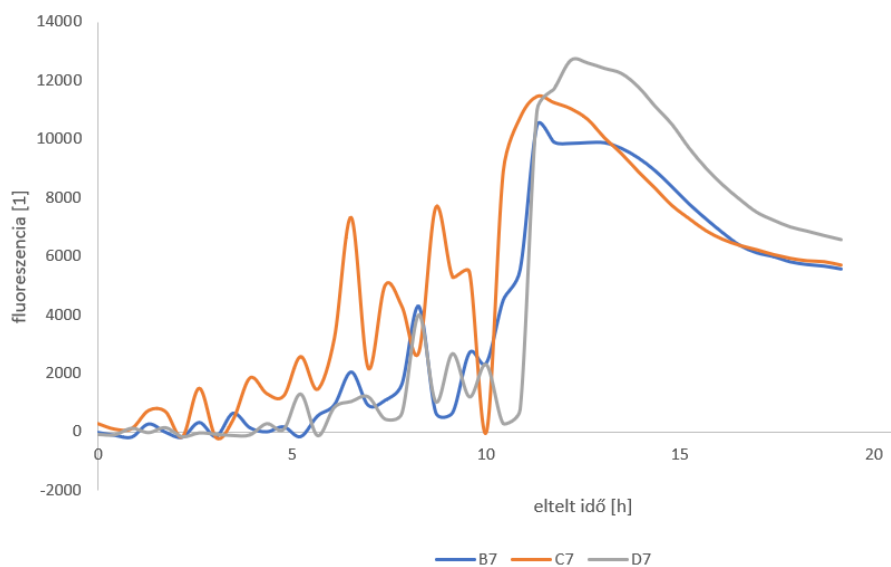
Látható, hogy a kb. 15. órában kezdődő stacioner állapotban a középső ponton történő kiolvasás jóval magasabb optikai denzitást mér, mint az átlag. Ennek legvalószínűbb oka, hogy az ekkorra már makroszkopikus méretű flokkok a középső területen ülepednek leginkább ilyen rázatás mellett (Típus: orbital, amplitúdó: 5mm).

5.2. Fluoreszcencia mérés

Megfelelő tartományban nem csak az optikai denzitás, de a fluoreszcencia is arányos a sejtszámmal. Kezdeti megfigyeléseink alapján úgy gondoltuk, hogy a fluoreszcencia mérése jobb növekedési görbét fog eredményezni, mint az optikai denzitásé, ezen kívül a populációk kölcsönhatásának mérésekor csak erre tudunk hagyatkozni.



(a) UWOPS87.242.1 mCherry haploid a fluoreszcenciája az mCherry tartományban az egyes időben, mintánként 5 mérési pont átlaga alapján.



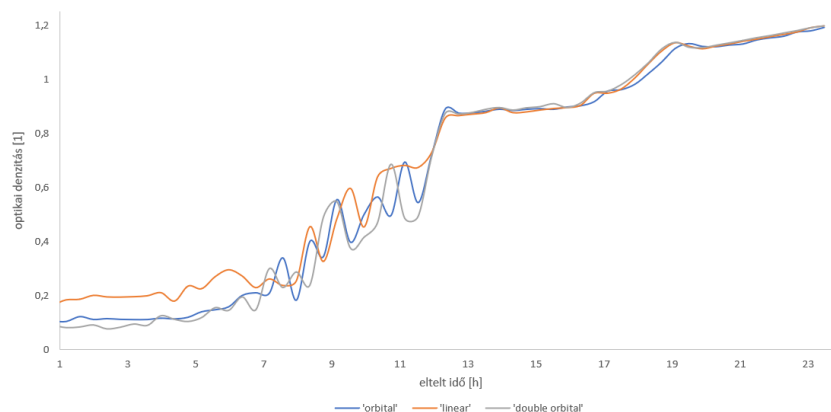
(b) UWOPS87.242.1 GFP haploid a fluoreszcenciája GFP tartományban az időben, mintánként 5 mérési pont átlaga alapján.

8. ábra. Az erősen flokkulens UWOPS87.242.1 haploidok esetén az mCherry-vel jelölt törzs fluoreszcenciája az adott tartományon szebb növekedési görbét eredményez, mint a GFP-vel jelölt törzs az adott tartományban.

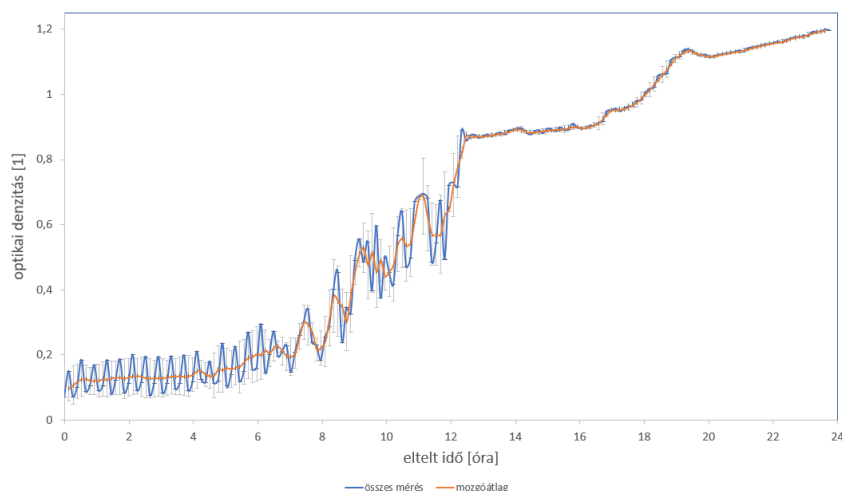
Emellett az mCherry görbe az optikai denzitásnál is jobb növekedési görbét mutat

5.3. Különböző rázatások

A lemezolvasó többféle rázatásra képes. Általános esetben is erős rázatást alkalmazunk, de abban reménykedtünk, hogy más típusú rázatás javítani fog az eredményeinken.



(a) Az UWOPS87.242.1 GFP a-t tartalmazó lyuk optikai denzitása az eltelt idő függvényében, különböző típusú rázatások mellett. A kezdeti szakaszban lineáris rázatás mellett egyértelműen magasabbak a kiolvasott értékek, de a stacioner fázisban ez a különbség már nem jelenik meg.

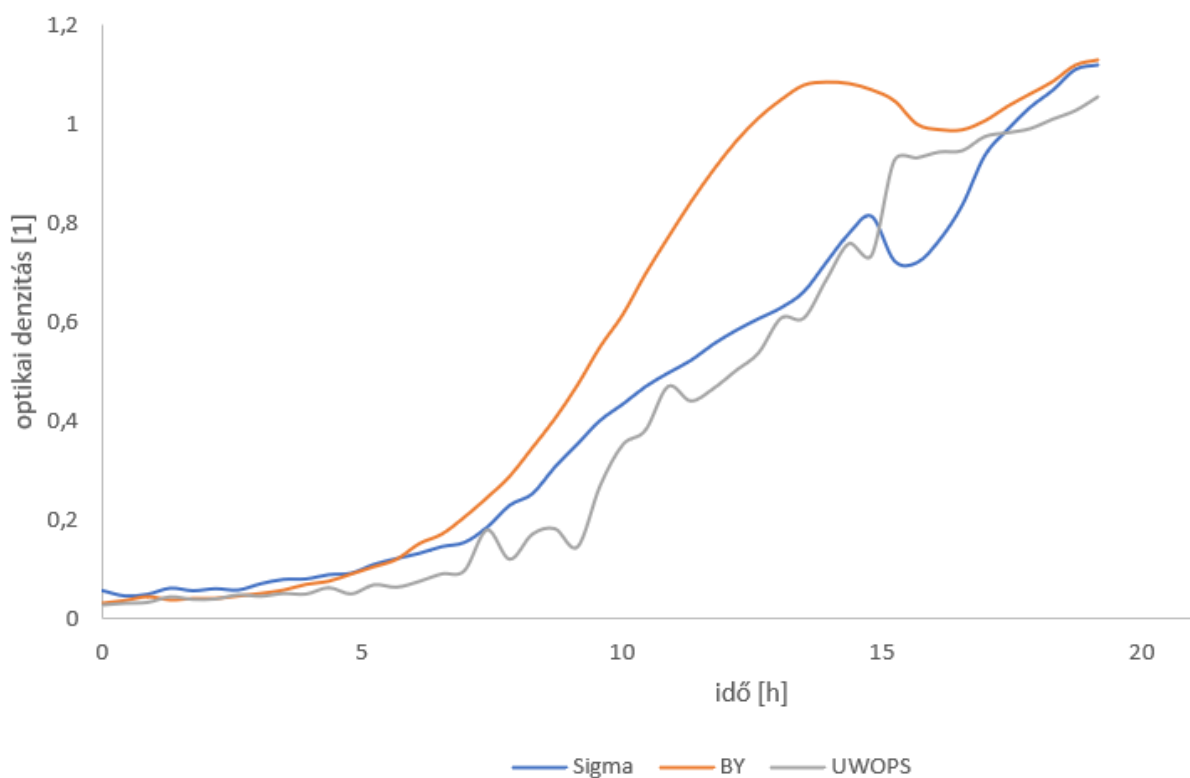


(b) Az UWOPS87.242.1 GFP a-t tartalmazó lyuk optikai denzitása az idő függvényében, illetve az adatsor mozgóátlaga az egy adatpontot környező 1-1 mérés alapján.

9. ábra. Erősen flokkulens törzset tartalmazó lyuk optikai denzitásának változása a mérés alatt. A mérés folyamán egy cikluson belül (nagyjából 30 perc) először 10 perc 'orbital' rázatást követően történik egy kiolvasás, majd 10 perc 'double orbital' rázatás után egy újabb kiolvasás, végül 10 perc 'linear' rázatás és még egy kiolvasás. Minden kiolvasás a lyukon belüli 5 mérési pont átlaga.

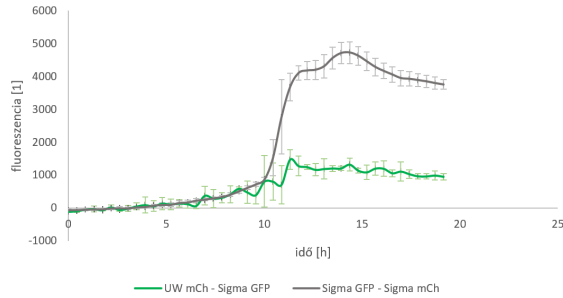
5.4. Kölcsönhatások

A kölcsönhatások vizsgálatához összehasonlítottuk az egyes törzsek növekedését.

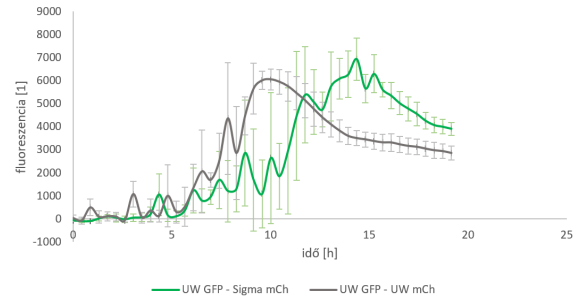


10. ábra. Az egyes törzsek esetén jellemző optikai densitás változás. Ez alapján a nem flokkulens BY4743 a növekszik leggyorsabban, és az erősen flokkulens UWOPS87.242.1 a leglassabban. Ez alapján azt várhatjuk, hogy a kevert kultúrákban az UWOPS87.242.1-el szemben a többi törzs teret fog nyerni.

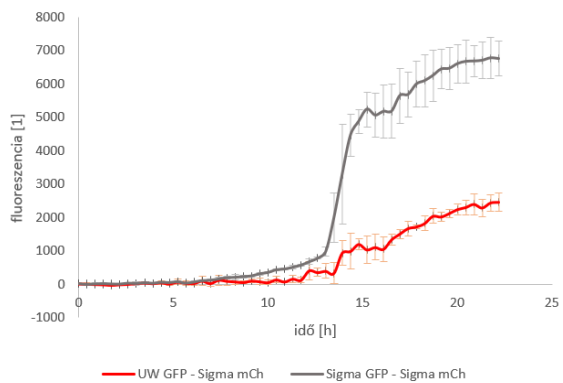
A nagyjából 15 óránál két törzsnél bekövetkező esés legvalószínűbb magyarázata, hogy a lemezen belül nem volt egyenletes a rázatás, ezért azon a területen, ahol ez a két törzs helyezkedett el, rendellenes ülepedés következett be.



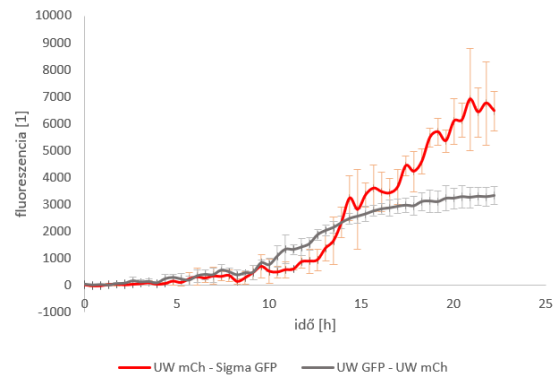
(a) GFP fluoreszcencia a keverék (zöld) és a kontroll (szürke) lyukban, amennyiben a Sigma1278b GFP a jelölt



(b) GFP fluoreszcencia a keverék (zöld) és a kontroll (szürke) lyukban amennyiben az UWOPS 87.242.1 GFP a jelölt



(c) mCherry fluoreszcencia a keverék (piros) és a kontroll (szürke) lyukban, amennyiben a Sigma1278b mCherry a jelölt

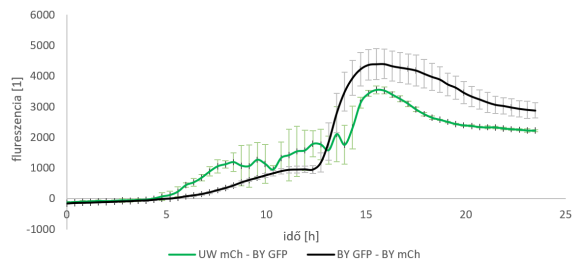


(d) mCherry fluoreszcencia a keverék (piros) és a kontroll (szürke) lyukban, amennyiben az UWOPS 87.242.1 mCherry a jelölt

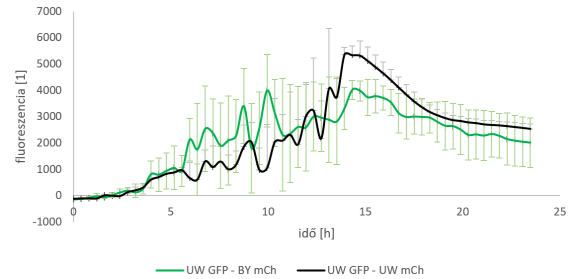
11. ábra. Az UWOPS 87.242.1 haploid a és Sigma1278b haploid a együttes növekedése 1:1 arányú keverés esetén. A grafikonokon a törzsek rövidítését tüntettem fel.

Az egyedi törzsek méréséhez hasonlóan az mCherry jel jobb növekedési görbét eredményez.

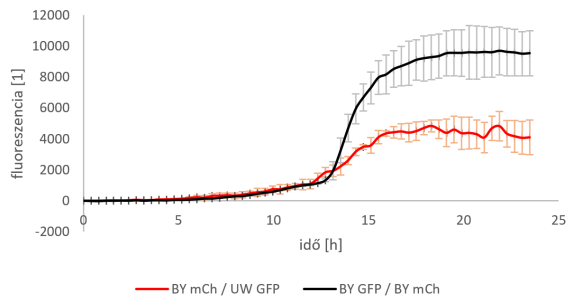
Látható, hogy a keverékek esetében a fluoreszcens jel akkor is ugrálni kezd, ha a fluoreszcens jelen az eredetileg enyhén flokkulens Sigma1278b a bocsátja ki (a és c). Ez alapján elképzelhető, hogy az UWOPS 87.242.1 flocokba ezek is bekerültek.



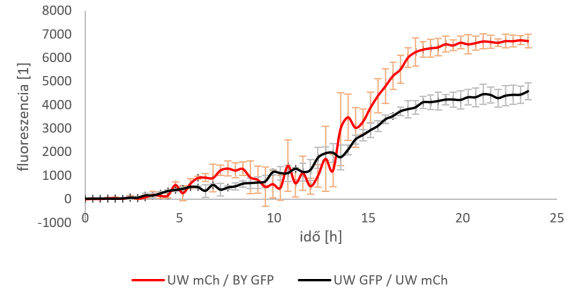
(a) GFP fluoreszcencia a keverék (zöld) és a kontroll (szürke) lyukban, amennyiben a BY 4743 GFP a jelölt



(b) GFP fluoreszcencia a keverék (zöld) és a kontroll (szürke) lyukban amennyiben az UWOPS 87.242.1 GFP a jelölt



(c) mCherry fluoreszcencia a keverék (piros) és a kontroll (szürke) lyukban amennyiben a BY 4743 mCherry a jelölt

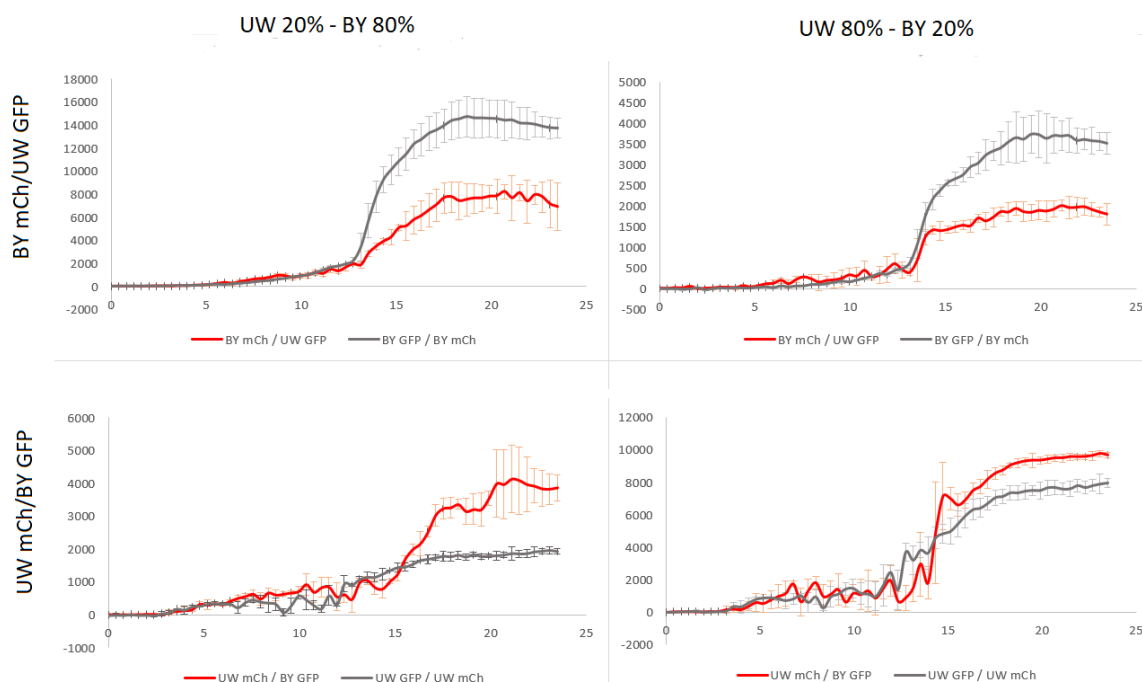


(d) mCherry fluoreszcencia a keverék (piros) és a kontroll (szürke) lyukban amennyiben az UWOPS 87.242.1 mCherry a jelölt

12. ábra. Az UWOPS 87.242.1 haploid a és BY4743 haploid a együttes növekedése 1:1 arányú keverés esetén. A grafikonokon a törzseket első két betűjükkel rövidítettem.

Az egyedi törzsek méréséhez hasonlóan az mCherry jel jobb növekedési görbét eredményez.

Látható, hogy a keverékek esetében a fluoreszcens jel akkor is ugrálni kezd, ha a fluoreszcens jelen az eredetileg nem flokkulens BY4743 a bocsátja ki (a és c). Ez alapján elképzelhető, hogy az UWOPS 87.242.1 flokkokba ezek is bekerültek.

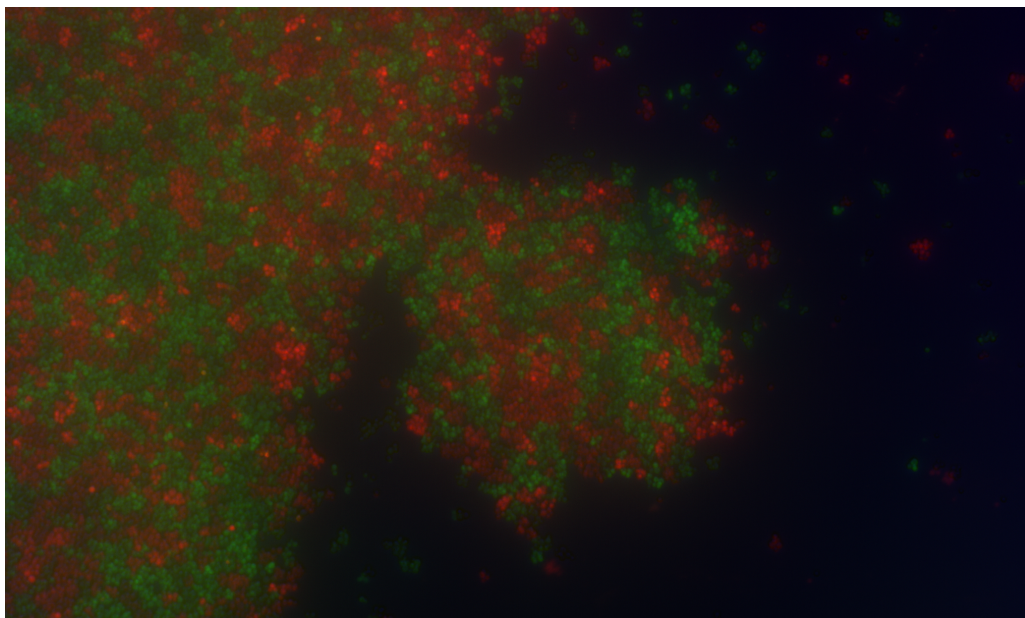


13. ábra. Az mCherry tartományban mért fluoreszcencia az UWOPS87.242.1 a és a BY4743 a aránya a különböző arányú keverékeiben. A vízszintes tengelyen mindig az időt ábrázoltam órában, a függőleges tengelyen pedig a fluoreszcenciát. A piros görbék ábrázolják az mCherry jelet a keverékben, a szürkék pedig a kontrollban.

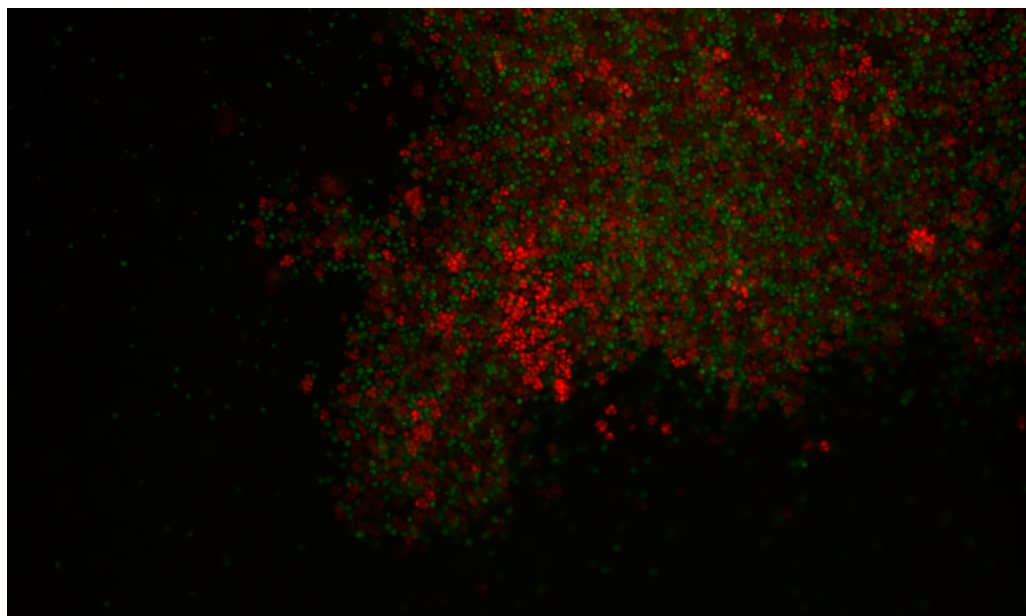
Az 1:1 arányú keverékről készült méréshez hasonlóan az UWOPS87.242.1 látszólag ezekben az esetekben is teret nyer a BY4743-al szemben.

5.5. Fluoreszcens mikroszkópos képek

A fluoreszcens mikroszkópos felvételekkel a létrejövő flocok szerkezetét szeretnénk volna vizsgálni. Az eredmények alapján úgy tűnt, hogy a flocokba az eredendően nem flokulens törzsek sejtjei is képesek beépülni, ezt a feltevést szeretnénk volna megalapozni.



(a) UWOPS 87.242.1 mCherry a (piros) és UWOPS 87.242.1 GFP a (zöld) keveréke



(b) UWOPS 87.242.1 mCherry a (piros) és BY4743 GFP a (zöld) keveréke

14. ábra. Egy napon át együtt növesztett kultúrából nyert flocok mikroszkópos képei. Mind a kontroll, mind a kevert esetben előfordul mindkét féle jelölt élesztő a flocokon belül.

A képek fluoreszcens mikroszkóppal készültek, 20-szoros nagyításon (4.13).

6. Eredmények értékelése

6.1. Növekedési görbék erősen flokkulens törzsek esetén

A mérési eredmények javítására úgy tűnik, hogy az egyik hatékony megoldás több kiolvasást végezni mind térben (7), mind időben (9). Ez azonban növeli a mérés erőforrás igényét, illetve az átlagolás(ok) miatt információvesztés is bekövetkezhet, a módszer tehát fenntartásokkal alkalmazandó.

Másrészt úgy tűnik, hogy az mCherry jel erősen flokkulens törzsek esetén jobb növekedési görbét mutat, mint akár az optikai denzitás, akár a GFP tartomány beli fluoreszcencia (8). Ezek alapján a jövőben erősen flokkulens törzsek növekedés vizsgálatához erre fogok támaszkodni.

A populációk közötti kölcsönhatások megfigyeléséhez erősen flokkulens törzs esetén szintén az mCherry-vel jelölt típusokat fogom elsődlegesen használni. Ennek az egyik hátránya, hogy két (az UWOPS87.242.1 haploidjaihoz hasonló mértékben) flokkulens törzs esetén nem alkalmazható, hiszen a törzsek jelentős hányada csak fluoreszcensen jelöletlenül, illetve GFP-vel és mCherry-vel jelölten áll rendelkezésre.

6.2. A rázatás hatása a mérési eredményekre

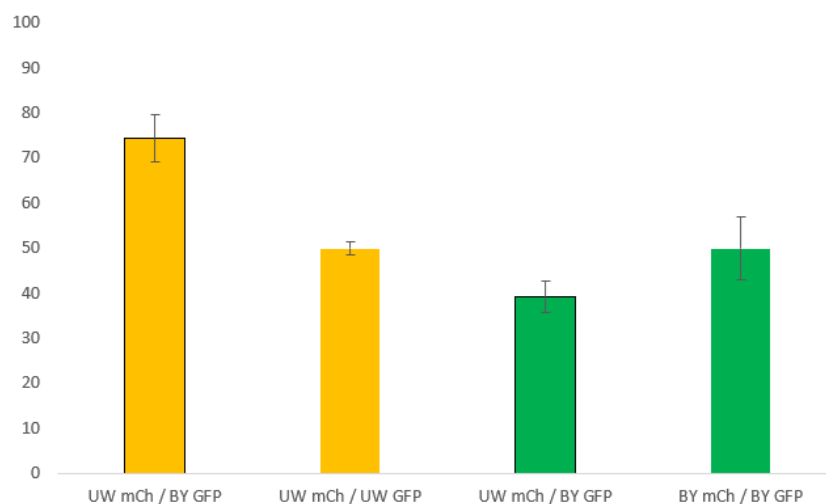
A lemezolvasó három típusú rázatásra képes. A nem-, illetve enyhén flokkulens törzsek felrázásához szükséges amplitúdó és frekvencia mellett erősen flokkulens törzsek esetén nem mutatkozik lényegi különbség az egyes rázatások mellett kapott eredményekben (9a).

A kezdeti (nagyraérett irreleváns) szakaszban lineáris rázatás mellett következetesen nagyobb értékeket mér a műszer, de ez a különbség az exponenciális szakaszban megszűnik. Az exponenciális szakasz végét követően az egyes rázatások mellett lényegében ugyanolyan eredményeket kapunk. Ennek vélhetően az az oka, hogy a lyuk aljában egy olyan nagy, biofilm-szerű fókusz jött létre, amelyet már egyik típusú rázás sem tud megmozdítani.

Mindez nem bír nagy jelentőséggel, hiszen a számunkra legérdekesebb exponenciális szakaszban nem mutatkozik számottevő különbség az egyes rázatások közt.

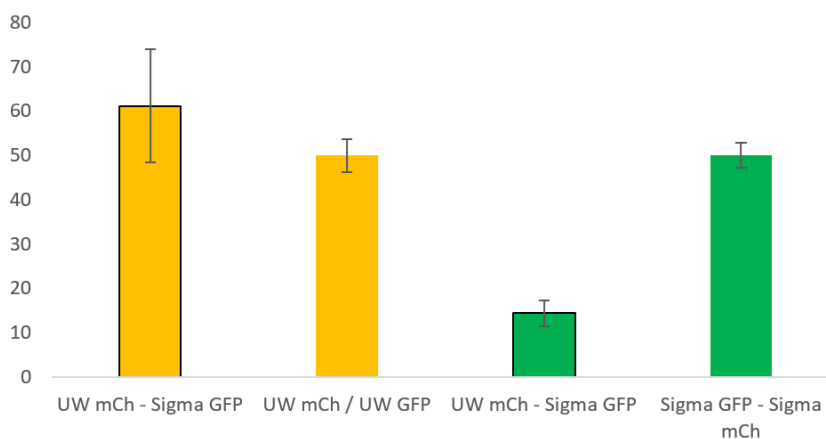
6.3. Kölcsönhatások vizsgálata

Pusztán a külön-külön mért optikai denzitások alapján azt feltételeznénk, hogy mind a Sigma1728b, mind a BY4743 haploidjai gyorsabban nőnek az UWOPS87.242.1 haploidoknál.



15. ábra. Az egyes fluoreszcensen jelölt törzsek százalékos aránya az UWOPS87.242.1 mCherry a és a BY4743 GFP a keverékében 16 óra elteltével. Sárgával az átlagos mCherry, zölddel az átlagos GFP érték. Az azonos színű, keret nélküli oszlop a kontroll. A hibasávok a szórást mutatják.

Az UWOPS87.242.1 és a BY4743 aránya a kezdeti 1:1-ről eltolódott, az UWOPS87.242.1 javára. Ez éppen ellentétes azzal, amit a növekedési görbék alapján várnánk.



16. ábra. Az egyes fluoreszcensen jelölt törzsek százalékos aránya az UWOPS87.242.1 mCherry a és a Sigma1278b GFP a keverékében 16 óra elteltével. Sárgával az átlagos mCherry, zölddel az átlagos GFP érték. Az azonos színű, keret nélküli oszlop a kontroll. A hibasávok a szórást mutatják.

Látható, hogy a Sigma1278b aránya a keverékben jóval alacsonyabb, mint a kontrollban, de az UWOPS87.242.1-nál nem figyelhető meg ilyen nagy különbség.

Ezzel szemben az első kevert kultúrák mérések azt mutatják, hogy nagyjából a 16. órára az UWOPS87.242.1 mindkét másik törzzsel szemben teret tudott nyerni (11. és 12. ábra). Ezt az eredményt viszont - a továbbra is nagyfokú mérési bizonytalanság miatt - fenntartásokkal kell kezelni.

UWOPS87.242.1 jelenlétében a nem-, illetve kevésbé flokkulens törzsek fluoreszcencia jele is ugrálni kezdett. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy a jelen levő flokkok inhomogén módon árnyékolják az egyébként homogénen jelen levő fluoreszcencia jelet. Egy másik potenciális magyarázat, hogy a flokkokba az egyébként nem flokkulens élesztők is képesek bekerülni, és a flokkon belül uralkodó oxigénszegény közegben [3] kevésbé képesek gyorsan nőni. Az is lehetséges, hogy a flokkokba bekerült nem flokkulens élesztők fluoreszcenciája a flokk belsejéből kijutva gyengül, és ez okozza a mért érték változását.

A 15. és a 16. ábrákon az egyes keverékekben a különböző törzsek arányát láthatjuk a mérés kezdetét követően 16 órával. Azért választottam épp ezt az időpontot, mert itt már megkezdődött a stacioner állapot, de még nem indult meg a GFP jelre jellemző, a 24 órás mérések végén bekövetkező csökkenés.

A diagramokon látható, hogy a keverékben az egyes törzsek százalékos arányának összege - az elvárattal szemben - nem száz. A 15. ábrán szereplő keverékben az élesztők kb. 40%-a GFP jelölt, és nagyjából 75%-uk mCherry jelölt, ez természetesen nem lehetséges, csakúgy, mint a 16. ábra esetében fennálló 15%-os, illetve 65%-os arány.

Megfigyelhető, hogy az UWOPS87.242.1 a és a BY4743 a keverékeinek esetében a mérések az UWOPS87.242.1 a arányának nagyobb növekedését mutatják, mint amekkora csökkenés a BY4743 a arányában bekövetkezik (15. ábra). Ezzel szemben az UWOPS87.242.1 a és a Sigma1278b a esetében éppen fordított a helyzet: a Sigma1278b a aránya határozottan nagyobb mértékben csökken, mint amennyire az UWOPS87.242.1 a aránya megnő. A flokkulációból adódó, fent említett potenciális mérési nehézségeken túl akár az is előfordulhat, hogy a két törzs tagjai nem ugyanolyan módon épülnek be az UWOPS87.242.1 a által alkotott flokkokba.

6.4. Fluoreszcencia mikroszkóppal készült képek

A fluoreszcencia mikroszkóppal készített képek alapján az UWOPS87.242.1 haploidok flokkjaiba mind a BY4743, mind a Sigma1278b haploidjai bekerülnek.

Ez is mérési bizonytalansághoz vezethet a fluoreszcencia mérések során, ugyanis az UWOPS87.242.1

kontrollok flokkban vannak, míg a másik törzshöz tartozó kontroll a médiumban szabadon helyezkedik el. Előfordulhat, hogy az UWOPS87.242.1-hez tartozó fluoreszcencia térnyerésének oka nem az, hogy a törzs túlnövi a másikat, hanem az, hogy a flokkokba a másik törzs tagjai is bekerülnek, így a fluoreszcens jelük "leárnýékolódik". Épp ezért a kölcsönhatás fennállásának igazolásához további kísérleteket kell végeznünk.

7. Összefoglalás

A célkitűzésnek megfelelően javítottunk erősen flokkulens törzsek esetén a lemezolvasóval történő méréseken. Sajnos a számunkra kritikus exponenciális szakaszban a leginkább zajosak a mérések, ezt a zajt sok esetben csak mozgóátlag számítással tudtuk kielégítően csökkenteni.

Az eddigi kísérletek alapján erősen flokkulens törzsek esetén érdemes egy lyukon belül több mérési pontot figyelembe venni, és a sejtszámmal korreláló három mérték (optikai denzitás és fluoreszcencia a GFP, illetve az mCherry tartományban) közül elsődlegesen az mCherry fluoreszcenciára támaszkodni.

Az első kevert kultúras mérések alapján lehetséges, hogy a vizsgált törzsek befolyásolják egymás növekedését, de ennek igazolására további kísérletekre van szükség.

A fluoreszcens mikroszkóppal készült felvételek alapján az UWOPS87.242.1 által képzett flokkokba más törzsek tagjai is bekerülnek. Ez a kölcsönhatás tehát nagy valószínűséggel fennáll a törzsek közt.

8. Jövőbeli tervek

Szeretnénk a méréseken tovább javítani, ehhez az egyes rázatásoknál kiüledett sejtréteget alaposan feltérképezni. A mérések leállításával és sejtek megszámlálásával validálni a méréseinket.

Az együttes növekedés és az interakciók további vizsgálatához először további méréseket szeretnénk végezni, szintén lemezolvasóval, majd az eredményeket a fentiekhez hasonlóan sejtszámlálással alátámasztani, megkülönböztetve a flokkokat és a flokkokon kívüli sejteket.

Az interakciókat továbbá szeretném sorozatos átoltságok folyamán is vizsgálni.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek, Gaizer Tündének, Pillér Bíborkának és Dr. Csikász-Nagy Attilának a kísérletes- és utómunkákban való segítségüket, iránymutatásukat. Hálás vagyok mindazon tudásért és képességekért, amelyet a segítségükkel tudtam elsajátítani a közös munka folyamán. Valamint köszönet illeti Dr. Pongor Csabát a fluoreszcens mikroszkópos felvételek készítésében nyújtott segítségéért.

„A KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS MINISZTERIUM ÚNKP-22-1 KÓDSZÁMÚ ÚJ NEMZETI KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK A NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS ALAPBÓL FINANSZÍROZOTT SZAKMAI TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT.”



Hivatkozások

- [1] V. Vidgren and J. Londesborough, „125th anniversary review: Yeast flocculation and sedimentation in brewing,” *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 117, pp. 475–487, 2011.
- [2] T. E. R. Belpaire, J. Pešek, B. Lories, K. J. Verstrepen, H. P. Steenackers, H. Ramon, and B. Smeets, „Permissive aggregative group formation favors coexistence between cooperators and defectors in yeast,” *The ISME Journal*, vol. 16, p. 2305–2312, 10 2022.
- [3] S. Smukalla, M. Caldara, N. Pochet, A. Beauvais, S. Guadagnini, C. Yan, M. D. Vincés, A. Jansen, M. C. Prevost, J.-P. Latgé, G. R. Fink, K. R. Foster, and K. J. Verstrepen, „Flo1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast,” *Cell*, vol. 135, pp. 726–737, 11 2008.
- [4] D. C. Queller, „The social side of wild yeast,” *Nature*, vol. 456, pp. 589–590, 12 2008.
- [5] F. Sherman, „Getting started with yeast,” in *Methods in enzymology*, vol. 350, pp. 3–41, Elsevier, 2002.
- [6] J. Steensels, E. Meersman, T. Snoek, V. Saels, and K. J. Verstrepen, „Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production,” *Applied and environmental microbiology*, vol. 80, no. 22, pp. 6965–6975, 2014.
- [7] C. Boulton, „Provocation: all yeast cells are born equal, but some grow to be more equal than others,” *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 127, no. 2, pp. 83–106, 2021.
- [8] J. Jiménez, S. Bru, M. Ribeiro, and J. Clotet, „Live fast, die soon: Cell cycle progression and lifespan in yeast cells,” Mar 2015.
- [9] B. Pillér, „Fluoreszcensen jelölt élesztőkolóniák vizsgálata,” *dipl., Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Kar*, 2018.
- [10] J. E. Haber, „Mating-type genes and mat switching in *saccharomyces cerevisiae*,” *Genetics*, vol. 191, no. 1, pp. 33–64, 2012.
- [11] B. G. Hall, H. Acar, A. Nandipati, and M. Barlow, „Growth rates made easy,” *Molecular biology and evolution*, vol. 31, no. 1, pp. 232–238, 2014.

- [12] L. Vermeersch, G. Perez-Samper, B. Cerulus, A. Jariani, B. Gallone, K. Voordeckers, J. Steensels, and K. J. Verstrepen, „On the duration of the microbial lag phase,” *Current genetics*, vol. 65, no. 3, pp. 721–727, 2019.
- [13] M. Bony, D. Thines-Sempoux, P. Barre, and B. Blondin, „Localization and cell surface anchoring of the *saccharomyces cerevisiae* flocculation protein flo1p,” *Journal of Bacteriology*, vol. 179, pp. 4929–4936, 08 1997.
- [14] M. Stratford and S. Assinder, „Yeast flocculation: Flo1 and newflo phenotypes and receptor structure,” *Yeast*, vol. 7, pp. 559–574, 08 1991.
- [15] D. V. Mehta, S. J. Curtis, A. B. Rudolph, C. S. Mary, R. Goodrich, K. R. Schneider, and A. J. MacIntosh, „A mini review: The history of yeast flocculation with an emphasis on measurement techniques,” *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 79, pp. 333–339, 09 2020.
- [16] S. El-Kirat-Chatel, A. Beaussart, S. P. Vincent, M. A. Flos, P. Hols, P. N. Lipke, and Y. F. Dufrêne, „Forces in yeast flocculation,” *Nanoscale*, vol. 7, p. 1760–1767, 02 2015.
- [17] E. A. Hope and M. J. Dunham, „Ploidy-regulated variation in biofilm-related phenotypes in natural isolates of *saccharomyces cerevisiae*,” *G3: Genes—Genomes—Genetics*, vol. 4, pp. 1773–1786, 07 2014.
- [18] J. Kim and M. D. Rose, „Stable pseudohyphal growth in budding yeast induced by synergism between septin defects and altered map-kinase signaling,” *PLOS Genetics*, vol. 11, p. e1005684, 12 2015.
- [19] *Saccharomyces* genome database, „Sigma1278b.” <https://www.yeastgenome.org/strain/S000203450>. A 2022.05.08-i állapot szerint.
- [20] I. Clontech Laboratories, „Yeast protocols handbook,” 2009.