



PÁZMÁNY PÉTER KATOLIKUS EGYETEM INFORMÁCIÓS
TECHNOLÓGIAI ÉS BIONIKAI KAR

37. OTDK Biológia Szekció

Fluoreszcens fehérjékkel jelölt élesztők vizsgálata mikrofluidikai eszközökkel

Szerző:

Kegyes-Brassai Eszter Kinga

Orvosi biotechnológia MSc

1.évfolyam

Témavezetők:

Gaizer Tünde Éva

Dr. Csikász-Nagy Attila

2024

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék.....	2
2.	Absztrakt	4
3.	Bevezetés.....	5
4.	Célkitűzés	6
5.	Irodalmi áttekintés.....	6
5.1.	A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mint modellorganizmus.....	6
5.2.	A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> életciklusa.....	7
5.3.	A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> öregedése.....	8
5.4.	Fluoreszcens fehérjék	9
5.5.	Mikrofluidika eszközök élesztők vizsgálatára	10
6.	A felhasznált módszerek részletes leírása	13
6.1.	Primer tervezés	13
6.2.	Molekuláris biológiai módszerek	14
6.2.1.	Polimeráz láncreakció	14
6.2.2.	DNS tisztítás.....	14
6.2.3.	Klónozás.....	14
6.2.4.	Transzformálás <i>E. coli</i> -ba	15
6.2.5.	Plazmid izolálás.....	16
6.3.	Élesztőkön végzett laboreljárások	16
6.3.1.	Törzsek	16
6.3.2.	Tárolás	16
6.3.3.	Tápközegek	16
6.3.4.	Élesztők transzformálása.....	17
6.3.5.	Sporuláció és zymolyase kezelés	18
6.3.6.	Haploid és diploid törzsek létrehozása.....	19
6.3.7.	Nyomásvizsgálat	20
6.4.	Mikrofluidikai protokoll.....	21
6.5.	Adatgyűjtési módszer	22
7.	Eredmények bemutatása.....	23
7.1.	Mikrofluidikai eszközök fejlesztése	23
7.2.	Mikrofluidikai mérések eredményei	25
7.2.1.	Morfológia.....	26

7.2.2.	Csapdázódás hatékonyságának vizsgálata	27
7.2.3.	Osztódás és fluoreszcens intenzitás kapcsolata.....	28
7.2.4.	Csatorna hosszának hatása a fluoreszcens intenzitásra	29
7.2.5.	Fluoreszcens fehérjék összehasonlítás	30
8.	Kutatási eredmények és jövőbeli irányok	30
8.1.	Eredmények összegzése	30
8.2.	Jövőbeli tervek	31
9.	Összefoglalás.....	32
10.	Köszönetnyilvánítás	32
11.	Irodalomjegyzék.....	33
12.	Mellékletek.....	35

2. Absztrakt

Az embereket régóta érdekli az öregedés. Sok kutatás irányul arra, hogy a sejtöregedés mechanizmusában még feltáratlan részeket jobban megértsük. A kutatások során szeretnénk mélyebb betekintést kapni, hogy milyen faktorok és mechanizmusok játszanak szerepet a sejtek öregedésében, milyen tényezők gyakorolnak hatást erre. Ennek vizsgálatára a Molekuláris és Celluláris Hálózatok Rendszerbiológiája Kutatólaborban *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzó élesztőket használunk modellorganizmusként, mert számos olyan gén van bennük, amelyeknek van humán megfelelője. Azt szeretném megfigyelni, hogy hogyan változik a fluoreszcens jel intenzitása az élesztők öregedése során. A fluoreszcens fehérjékkel történő jelölés egy sokrétűen hasznosítható technika. Ennek segítségével vizsgálják az élesztők interakcióját más élesztő törzsekkel, különböző fehérjék expresszióját, sejtciklusát és öregedését. Kutatócsoportunk többféle színnel jelölt élesztő törzseket használ. A fluoreszcensen jelölt élesztők életciklusa mikrofluidikai eszközök segítségével monitorozható, melynek segítségével követhetjük a sejtek életciklusát közel azonos körülmények között, több napon keresztül.

A projekt során először megterveztem és kiviteleztem két sarjadzó élesztőtörzs egyidejűleg *mCherry* és *GFP* fluoreszcens fehérjékkel történő jelölését. Ezt követően a Biomikrofluidikai Kutatócsoport által megtervezett mikrofluidikai eszközöket teszteltem. Minden konstrukciónál kezdetben megkerestem azokat a beállításokat, amelyek segítségével nagy hatékonysággal tudtam becsapdázni az élesztőket, hogy figyelemmel tudjuk követni őket. Ezek után kikísérleteztem, hogy milyen körülmények között osztódnak az élesztők, és melyek azok a tényezők, amelyek ezt korlátozzák. A mérési eredmények és a tapasztalatok alapján javaslatot tettem a mikrofluidikai eszköz konstrukciójának módosítására.

A dolgozatomban szeretnék először egy rövid irodalmi áttekintést bemutatni az élesztőkről, a szaporodásukról, a sejtciklusukról és az eddig használt sejtöregedés vizsgálatára kifejlesztett mikrofluidikai eszközökről. Ezután ismertetem a kísérlet részleteit, hogy hogyan jelöltem fluoreszcens fehérjével az élesztőket, milyen molekuláris biológiai módszereket használtam, és milyen eljárásokat alkalmaztam az élesztőkön.

Áttekintést adok, hogy milyen mikrofluidikai eszközöket használtam, és hogyan változott ezeknek a konstrukciója. Bemutatom az általam kidolgozott mikrofluidikai protokollt és a mérés során kapott eredményeket. Végül kitérek arra, hogy milyen módszerekkel lehetne javítani a mikrofluidikai kísérleteken, és kifejtem, hogy mik a jövőbeli terveim.

3. Bevezetés

A Molekuláris és Celluláris Hálózatok Rendszerbiológiája Kutatólaborban *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzó élesztő vad és laboratóriumi törzsein végeznek különböző kutatásokat, például a különböző törzsek közti kölcsönhatások vizsgálatát. Az élesztő, az élelmiszeriparban a sör, a bor, és a kenyér készítésében betöltött szerepe mellett a molekuláris biológiai laboratóriumoknak az egyik legkedveltebb modellorganizmusa [1]. Mivel számos, az emlőssejtekben lejátszódó folyamatban szerepet játszó génnek van megfelelője az élesztőkben, közelebb kerülhetünk a humánsejtekben lejátszódó folyamatok megértéséhez [2].

A fluoreszcens fehérjékkel történő jelölés egy sokoldalúan hasznosítható technika. Ennek segítségével vizsgálják az élesztők interakcióját más élesztő törzsekkel, különböző fehérjék expresszióját, sejtciklusát, öregedését. Az élesztők fluoreszcens jelének kvantitatív analízise során figyelembe kell venni a sejtek fiziológiai változásait és a fluoreszcens fehérje számos tulajdonságát, például mennyire élénk a színe, milyen a pH érzékenysége. Érdekes kérdés, hogy az élesztők öregedése során hogyan változik a fluoreszcens jel intenzitása, és ennek milyen okai lehetnek.

A mikrofluidikai eszközök segítségével számos kísérlet végezhető. Ezek segítségével képesek vagyunk az élesztősejtekben lejátszódó folyamatokat egyedi sejtszinten megfigyelni.

A projekt során megterveztem és kiviteleztem a BY4743 és a W303 sarjadzó élesztők egyidejűleg *mCherry* és *GFP* fluoreszcens fehérjékkel történő jelölését. Ehhez először a törzsek *mCherry*-vel történő jelölését végeztem el. Az így kapott diploid sejtekből sporuláltatás útján haploid élesztőket készítettem. Ezt követően *mCherry*-vel és *GFP*-vel jelölt haploid élesztőket párosítottam, hogy duplán jelöltet kapjak.

Ezután a Biomikrofluidikai Kutatócsoportja által megtervezett mikrofluidikai eszközök tesztelését végeztem. Minden konstrukciónál kezdetben megkerestem azokat a beállításokat, amelyek segítségével nagy hatékonysággal tudtam csapdázni élesztősejteket. Ezek után arra irányult a kísérletem, hogy milyen körülmények között osztódnak ezek a sejtek a csapdában, és melyek azok a tényezők, amelyek ezt korlátozzák. A mérési eredmények és a tapasztalatok alapján javaslatot tettem a mikrofluidikai eszköz konstrukciójának módosítására.

A dolgozatomban először a téma irodalmi háttérére térek ki. Ezután ismertetem a kísérlet részleteit: az élesztőket fluoreszcens fehérjékkel történő jelölését, a felhasznált molekuláris biológiai módszereket és az élesztőkön alkalmazott laboratóriumi eljárásokat. Bemutatom, hogy milyen mikrofluidikai eszközöket használtam, és hogyan változott ezeknek a

konstrukciója, valamint az általam kidolgozott mikrofluidikai protokollt és a mérés során kapott eredményeket. Végül kitérek a jövőbeli terveimre.

4. Célkitűzés

A projekt során azt szerettem volna megfigyelni mikrofluidikai eszköz segítségével, hogy hogyan változik az élesztőkben a fluoreszcens jel intenzitása az életciklus folyamán. Ennek vizsgálatához több részfeladatot végeztem el.

Először az élesztőket fluoreszcensen jelöltem, amely folyamat első lépése az élesztők transzformálása. A két színnel történő jelöléshez a diploid sejtekből sporuláltatás útján haploid élesztőket készítettem, majd a két különböző színű fluoreszcens fehérjével jelölt haploid élesztőt párosítottam, hogy duplán jelöltek legyenek.

A jelölt élesztőkkel már végezhető a különböző mikrofluidikai eszközök tesztelése, ami ahhoz szükséges, hogy megtaláljam a lehető legoptimálisabb konstrukciót, hogy hosszú távon lehessen mérni a fluoreszcens jel intenzitását.

A következő lényeges lépés a mérési protokoll kidolgozása a mérés sikerességének érdekében. A mérési folyamat végén nem maradhat el az adatokat feldolgozása és elemzése.

5. Irodalmi áttekintés

5.1. A *Saccharomyces cerevisiae*, mint modellorganizmus

Az élesztők a gombák országába tartozó eukarióta egysejtű élőlények. Jelenleg több mint 2000 különböző törzset tudunk megkülönböztetni, amelyek többségén már végeztek kiterjedt genetikai elemzést [3]. A kísérleteinkhez a Molekuláris és Celluláris Hálózatok Rendszerbiológiája Kutatólaborban *Saccharomyces cerevisiae* sarjadzó élesztő különböző vad és labor törzseit használjuk. Első eukariótaként 1996-ban térképezték fel a teljes genomjának szekvenciáját. [1]. Az élesztők az egyik legkedveltebb modellorganizmusok, mert gyors az osztódási képességük, és mivel nem patogének, nem kívánnak magas szintű biztonsági óvintézkedéseket [1].

Számos technika segítségével könnyen lehet befolyásolni a genomját [1]. Az élesztőknek mind a haploid, mind a diploid állapotuk stabil [1]. A fluoreszcens fehérjékkel történő jelölés egy új vizsgálati lehetőséget nyújtott a kutatók számára. Ennek a módszernek köszönhetően képesek voltak meghatározni sejten belül a fehérjék lokalizációját és interakcióját más fehérjékkel [2].

A *S. cerevisiae*-t gyakran használják emberi betegségek kutatásánál, többek között a rákkutatásban [2]. Magas fokú konzerváltsági fokot mutat az emlőssejtekkel, mint például a

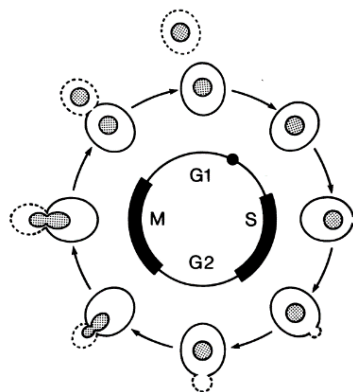
DNS károsodást helyreállító és sejtciklust szabályozó folyamatok [4]. Érdekes evolúciós szempontból is vizsgálni a tumorsejteket [5].

A fentiekből látható, hogy a különböző élesztő törzsek nemcsak az élelmiszeriparban játszanak fontos szerepet, hanem különböző kutatási területeken és az egészségügyben.

5.2.A *Saccharomyces cerevisiae* életciklusa

A sejtciklus során a három legfontosabb esemény az osztódás, a párosodás és meiózis [6].

A *S. cerevisiae* sarjadzással nő, ami azt jelenti, hogy az anyasejt megnövekedik, majd két ellipszoid leánysejtet hoz létre. Ezt hívjuk filamentes osztódásnak [6]. Az így keletkezett leánysejt kisebb, mint az anyasejt, ezért növekednie kell, mielőtt még osztódni lenne képes [6]. A mitotikus sejtciklus során az alábbi morfogenetikai események zajlanak le (1.ábra).



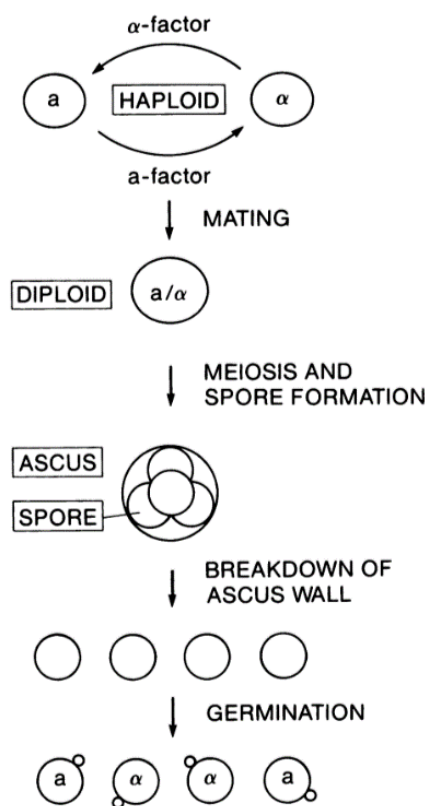
1. ábra *Saccharomyces cerevisiae* mitotikus sejtciklusa [6]

Az első, G1 fázisban elkezdődik a citoszkeleton polarizációja, a késői G1 fázisban a szekréció, ami sarjképződéséhez vezet [7]. A következő az apikális-izotróp csere a korai G2 fázisban, a sarjon belüli növekedésnek a depolarizációja, ami egyenletes sarj növekedéshez vezet. A mitózis késői szakaszában történik az anya és a sarj közötti növekedés aszimmetriájának a megszűnése [7]. Korábbi fázis folyamán a növekedés a sarj felé irányult, ezután a növekedés mértéke egyenlően lesz, megosztva az anya és a sarj között [7]. A mitotikus fázis végén a növekedés a nyakra összpontosul, ez az a rész, ami az anya és a sarj között van. Ez vezet a citokinézishez, és a sejt leválásához [7]. Az első, a második és a negyedik esemény összefüggésben áll a CDK Cdc28p aktivitásának változásával [7].

Vannak olyan tényezők, amelyek hatására az osztódás megáll; ilyen például a tápanyaghiány [6]. A sejtek G1 fázisban maradnak, és egy darabig még életképesek. Ha nem lesz tápanyag, meghalnak, ha időközben lesz tápanyag, akkor képesek elkezdni újra osztódni [6].

A másik fontos folyamat a párosodás. A *S. cerevisiae*-nek három féle speciális sejttypusát különböztetjük meg [6]. A haploid **a** és **α** sejtek, amelyeknek a párosodásának az eredménye az **a/α** sejttypus. Csak két különböző haploid sejt képes egymással párosodni. A párosodáshoz szükség van olyan jelző faktorokra, úgynevezett feromonokra, valamint receptorokra, amelyek elősegítik a párosodás folyamatát [6]. Az **a** és **α** sejtek különböző jelzőmolekulákat termelnek. Az **a** sejtek **a** faktort, az **α** sejtek **α** faktort termelnek. Ezek a feromonok meggátolják, hogy

továbbmenjen a sejt a G1 fázisból, azaz a növekedést gátolják, ezért nevezhetjük őket negatív növekedési faktoroknak [6].



2. ábra *S. cerevisiae* spóra képzés folyamata [6]

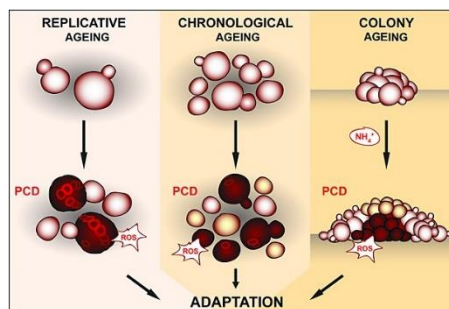
A feromonok felelősek a párosodni kívánó sejtek sejtciklusának összehangolásáért, és olyan fehérjék szintetizálását aktiválják, amelyek létfontosságúak a sikeres párosodáshoz [6]. Az **a** specifikus gének csak az **a** sejtekben aktívak, míg az **α** specifikus gének csak az **α** sejtekben [6]. A párosodást követően megszűnik ezeknek a specifikus géneknek az expressziója [6]. A mating-type locus (MAT) határozza meg, hogy mely gének aktívak [8].

A 2. ábra a meiózist és a spóráképzést mutatja be. Ehhez bizonyos feltételeknek teljesülniük kell, mint például megfelelő környezet, amely nitrogén- és szénhidráthiányos, és a sejt MAT**a**/MAT**α** diploid kell legyen [6].

5.3.A *Saccharomyces cerevisiae* öregedése

Az öregedés az élet velejárója. A sejtek csak véges számú osztódásra képesek, amit elérve a sejtek meghalnak [9]. Ez egy programozott sejthalál (PCD), ami létezik a többsejtes és az egysejtű élőlényeknél is. Ez biztosítja a populáció fittségét és túlélését azzal, hogy a gyenge és sérült sejteket eltávolítja a populációból [9]. Számos biológiai útvonalat és PCD-t indukáló exogén és endogén hatást azonosítottak.

Az élesztők esetében az öregedést három megközelítés mentén vizsgálják: replikatív, kronológiai és kolóniai élettartam szerint [9]. Ezeknek az ábrázolása látható a 3.ábrán. A replikatív élettartam (RLS) megmutatja a halál előtt keletkezett leánysejtek számát [9].



3. ábra Élesztősejtek öregedési típusai [9]

A halált a sejtben felgyülemelő károsodott fehérjék okozzák, amelyek az osztódás során aszimmetrikusan oszlanak szét a két sejt között. Általánosságban 25-35 osztódási ciklus után következik be a sejthalál [9]. Az élesztőgomba replikációs élettartama hasonlít a fibroblasztokban és limfocitákban megfigyelt RLS-re, amelyek tenyészetben tartva meghatározott számú populáció megduplázódáson mennek keresztül [10]. A kronológiai élettartam (CLS) azt mutatja, hogy mennyi ideig él egy nem osztódó sejt [9] [10]. A CLS alkalmas a posztmitózis szövetek és a nem osztódó emlőssejtek (például neuronok) öregedésének modellezésére [10]. A kolónia élettartam, az az időtartam, amíg van élő sejt a kolóniában. Az öregedő kolónia közepén lévő sejtek programozott sejthalállal meghalnak a tápanyag hiány miatt azzal a céllal, hogy a kolónia minél tovább életben maradjon [9]. Az anyasejtek sejtfalán minden osztódást követően egy heg alakul ki ott, ahol sarj levált. Ezek segítségével megállapítható egy sejt replikatív életkora [11]. Megfigyelhető, hogy a kor előrehaladtával észrevehetően nagyobb mértékben nő meg az anyasejt a halál előtti pár osztódás során. A leánysejtek is az anyasejt öregedésével nagyobbak lesznek, és az élettartamuk rövidül [11]. Ahogy a sejt öregszik, úgy növekszik meg drasztikusan a vakuólum mérete, és ezzel együtt csökken a savassága [11]. Eközben a citoszol pH-ja lecsökken [12]. A pH-beli változás hatással van többek között a fehérjék feltekeredésére, az enzimek aktivitására, a molekulák közötti kölcsönhatásokra. A fiatal és az öreg sejtek között átlagosan 0,5 pH egység a különbség, ami már okozhatja az előbb említett változásokat [12].

5.4. Fluoreszcens fehérjék

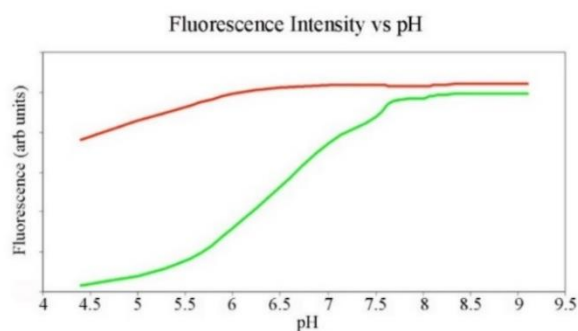
A Green Fluorescent Protein-t (GFP) *Aequorea victoria* nevű medúzából izolálták. Már az 1960-as években felfedezték a fehérjét, de csak az 1990-es években kezdték el használni a molekuláris biológiában, mint riporter fehérje [13]. Egy adott hullámhosszú fényelnyelés hatására magasabb energiaszintre kerül a molekula, majd fénykibocsátás folyamán az energia egy részét leadja, és visszakerül az eredeti energiaszintre. Ez az alapja a fluoreszcencia jelenségének. A GFP felfedezése óta már számos módosított variánsa létezik, mint például kéken vagy sárgán fluoreszkáló fehérjék [14]. Képesek vagyunk a fluoreszcens fehérjék számos tulajdonságát megváltoztatni, többek között a pH érzékenységet, fluoreszcencia intenzitását. Mindezek ellenére a mai napig a leggyakrabban használt variáns az Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) [14]. Kevesebb olyan fluoreszcens fehérje változatot ismerünk, amelyek narancssárga vagy piros fényt bocsátanak ki. Az egyik ilyen fajta az mFruit sorozat, amelyből a leggyakrabban használt az mCherry, aminek az intenzitása körülbelül a 75% az

EGFP-nek [14]. Az 4.ábrán lévő táblázatban néhány fluoreszcens fehérje különböző tulajdonságai szerepelnek.

Protein*	Color of spectral class	Excitation peak (nm)	Emission peak (nm)	Brightness ⁷	Photostability ²	pKa ¹	Association state ²	Chromophore	Filter set ¹	Reference
EBFP2	Blue	383	448	18	55	5.3	Weak dimer	SHG	DAPI/BFP	Ai et al., 2007
ECFP ²¹	Cyan	433/445	475/503	13	64	4.7	Weak dimer	TWG	CFP	Cubitt et al., 1995
mCerulean	Cyan	433/445	475/503	27/24	36	4.7	Monomer	TWG	CFP	Rizzo et al., 2004
mTFP1	Cyan-green	462	492	54	110	4.3	Monomer	AYG	CFP	Ai et al., 2006
mEGFP	Green	488	507	34	174	6.0	Monomer	TYG	FITC/GFP	Heim et al., 1995
mEmerald	Green	487	509	39	101 ⁵	6.0	Monomer	TYG	FITC/GFP	Cubitt et al., 1999
sEGFP	Green	485	510	54	157 ¹	5.5	Weak dimer	TYG	FITC/GFP	Pédélecq et al., 2006
EYFP ²¹	Yellow	514	527	51	60	6.9	Weak dimer	GYG	FIT/YFP	Miyawaki et al., 1999
mVenus	Yellow	515	528	53	15	6.0	Monomer	GYG	FITC/YFP	Nagai et al., 2002
mCitrine	Yellow	516	529	59	49	5.7	Monomer	GYG	FITC/YFP	Griesbeck et al., 2001
YPet	Yellow	517	530	80	49	5.6	Weak dimer	GYG	FITC/YFP	Nguyen and Daugherty, 2005
mKO	Orange	548	559	31	122	5.0	Monomer	CYG	TRITC/DsRed	Karasawa et al., 2004
tdTomato	Orange	554	581	95	98	4.7	T-dimer	MYG	TRITC/DsRed	Shaner et al., 2004
TagRFP	Orange	555	584	48	37**	<4.0	Monomer	MYG	TRITC/DsRed	Merzlyak et al., 2007
mRFP1 ¹¹	Red	584	607	12.5	8.7	4.5	Monomer	QYG	TsRed	Campbell et al., 2002
mCherry	Red	587	610	17 ¹¹	96	<4.5	Monomer	MYG	TsRed	Shaner et al., 2004
mKate	Far-red	588	635	15	166 ⁵	6.0	Monomer	MYG	TsRed	Shcherbo et al., 2007
mPlum	Far-red	590	649	3.2 ¹¹	53	<4.5	Monomer	MYG	TsRed	Wang et al., 2004

4. ábra Fluoreszcens fehérjék fizikai tulajdonságai [14]

Egy *Bacillus subtilis* baktériummal foglalkozó tanulmány használt GFP és mCherry jelölést egy sejten belül, mert a spektrumbeli különbségük lehetővé tesz, hogy egyidejűleg használják riportergénnek [15]. A mérések folyamán megfigyelték, hogy a sejtciklus különböző fázisaiban eltért a GFP és mCherry fluoreszcens jel intenzitása, hol az egyik, hol a másik volt nagyobb. Azt feltételezték, hogy a sejtben bekövetkező pH változás okozhatta az intenzitásbeli változást [15]. Megvizsgálták, hogy a pH hogyan hat a GFP és mCherry fluoreszcens jelének intenzitására. Azt találták, hogy az mCherry jobban bírja a pH változásokat, mint a GFP.



5. ábra Fluoreszcens jel intenzitás és pH kapcsolata [15]

A vizsgált spektrumban nem volt olyan pH érték, ami nagyban befolyásolta volna az mCherry jelének intenzitást, szemben a GFP-vel (5.ábra) [15]. Emiatt nagy körültekintéssel kell kezelni a kapott eredményeket, mert a sejtben belüli környezet pH-ja befolyásolhatja a kapott eredményeket [15].

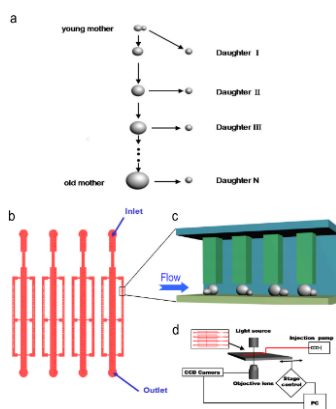
5.5. Mikrofluidika eszközök élesztők vizsgálatára

Az öregedés folyamatának vizsgálata egyre fontosabb lett, mert számos betegségben magas kockázati tényezőt jelent: a szív- és érrendszeri betegségek, a cukorbetegség és a neurodegeneratív betegségek [16]. Az ember egy viszonylag hosszú életű élőlény, de a rövid élettartamú élőlényeken (élesztők, férgek, egerek) végzett kutatások rövid idő alatt nagy mennyiségű megfigyelést és adatot eredményeznek [16].

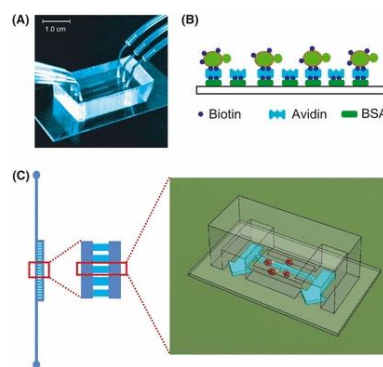
A kutatók próbálnak olyan módszert kifejleszteni, amellyel a leánysejtek automatikusan eltávolíthatóak az anyasejtről, például a méretkülönbség alapján. Ezt folyamatos tápoldat áramoltatással valósították meg [17]. A mikrofluidikai módszernek célja, hogy a csapdákban megfogják az anyasejteket. Így a hosszútávú mérés során megkülönböztethető lesz az anyasejt a leánysejtektől [17]. A PDMS alapú mikrofluidikai eszköz lehetővé teszi egyidejű mérések elvégzését nagyszámú élesztősejten, akár 1000 sarjadzó élesztősejtet is képesek vagyunk kvantitatívan monitorozni időzített mikroszkóppal [18] [19]. A tápoldat lamináris áramlása lehetővé teszi a környezet pontos szabályozását [19].

A PDMS eszközök szilíciumszelet sablonja lehetővé teszi a mikrofluidikai cellák gyors, reprodukálható előállítását viszonylag alacsony költséggel, mivel az előállított szilíciumlapkák ezután gyakorlatilag korlátlan számú PDMS-eszköz létrehozására felhasználhatóak [20].

Számos kutatócsoport dolgozik mikrofluidikai eszközök kidolgozásán. A legtöbb eszköz az anya és a leánysejt közötti méretbeli különbséget veszi alapul a szétválogatásnál. Már 2012-ben publikáltak ilyen módszeren alapuló eszközről, melynek cellája az alábbi 6. ábrán látható [17]. Az anyasejteket 'mikro-börtönökbe' csapdázzák be, és a leánysejteket az áramlat kimossa a nyílásokon keresztül [17]. Ez a konstrukció csak az első pár generációig működik rendeltetésszerűen, mert ahogy öregszik a sejt, megnő, és nagyobb leánysejteket képez, amelyek képesek eltorlaszolni a nyílásokat [17].

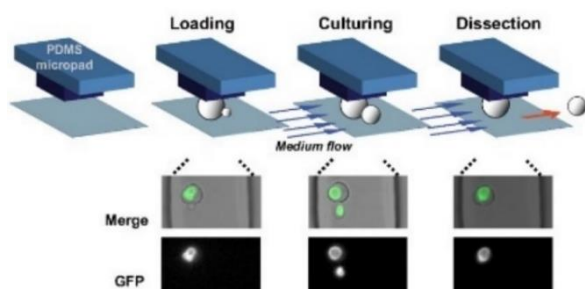


6. ábra Zhang féle mikrofluidikai eszköz [17]

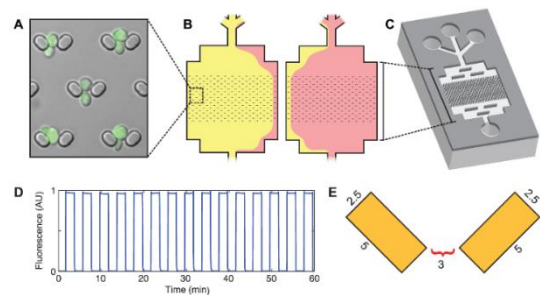


7. ábra Xie és kollégái által tervezett mikrofluidikai cella [21]

Egy másik megoldás során nemcsak a méret szerinti szétválasztáson alapult, hanem az anyasejtet kémiai kötésekkel is rögzítette [21]. A módszer a biotin-avidin affinitáson alapul [21]. Az anyasejtek sejtfalát biotinnal jelölték, ez nem öröklődik tovább a leánysejtekre [21]. Egy újabb módszer szerint, az élesztőket egy 'mikropad' alá szorítják be a nagysebességű betöltést követően [22]. A folyamat lépéseit a 8. ábra mutatja be, ahol jól látható a kézzel jelölt mikropad és az alá beszoruló sejt.



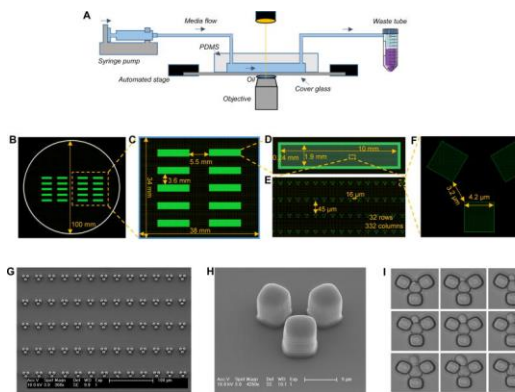
8. ábra Lee és társai által tervezett mikrofluidikai eszköz [22]



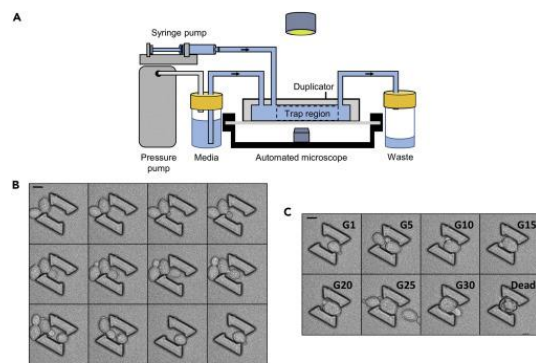
9. ábra Az ALCATRAS tervrajza [19]

Az ALCATRAS (A Long-term Culturing And TRApping System) nevű eszközt, amely több mint 1500 csapdát tartalmaz, így nagy számú sejt figyelhető meg egy mérés folyamán [19]. A csapdákat két oszlop V alakban való elhelyezkedése alakítja ki. Az áramoltatott tápoldat által kifejtett nyomás miatt maradnak a sejtek a csapdákból. A három bevezetésből a két szélsőn tápoldatot áramoltatnak, a középsőn töltik be az élesztőket a csatornába [19].

A Yeast Replicator nevű eszközben három oszlop alkot egy csapdát, amelyek egy egyenlőoldalú háromszög csúcsain helyezkednek el [23]. A betöltés során a két oszlop segítségével megfognak egy élesztősejtet, aminek a leánysejtje beleszületik a három oszlop közé, ahonnan nem tud kimosódni. Ez a sejt lesz az a szűz anyasejt, aminek a teljes replikatív élettartama figyelemmel kísérhető [23].



10. ábra Yeast Replicator [23]



11. ábra Duplicator nevű mikrofluidikai eszköz [24]

Sarnoski és társai is kifejlesztettek egy olyan mikrofluidikai eszközt, amely az előzőhöz képest más geometriájú megoldással fogja be a sejteket. Ez is alkalmas az élesztők teljes replikatív élelciklusának megfigyelésére [24].

6. A felhasznált módszerek részletes leírása

A munkám során a fő célom az volt, hogy megfigyeljem, hogyan változik az élesztők fluoreszcens jelölésének intenzitása az életciklusuk folyamán. A kísérletem két fő lépésből állt. Az egyik lépésben a BY4743 és W303 törzseket fluoreszcensen jelöltem, a másikban mikrofluidikai eszközök tesztelését végeztem, és kidolgoztam a hozzájuk tartozó mérési protokollt.

A jelölés folyamata során először egy primer párt terveztem, amely segítségével a HO-mCherry6- KanMx plazmidból kivágtam az mCherry-t tartalmazó génszakaszt. Ezt a szakaszt ligálás folyamán beleillesztettem a HO-hisG-URA3-hisG-poly-HO plazmidba. Az inzert irányának meghatározásához ellenőrző emésztést végeztem. A HO-hisG-URA3-hisG-poly-HO plazmidról készült PCR terméket integratív transzformálás segítségével betranszformáltam a BY4743 és W303 élesztő törzsekbe. Az így kapott mCherry-vel jelölt diploid sejtekből a sporuláltatás folyamán elkészítettem haploid α és a változatait. Az így kapott élesztőket GFP-vel jelölt haploid élesztőkkel pároztattam. A pároztatás végeredménye az egyidejűleg mCherry és GFP fluoreszcens fehérjékkel jelölt élesztők.

A következő munkafázis az egyetem Biomikrofluidikai Kutatócsoportja által megtervezett mikrofluidikai eszközök tesztelése. Minden új konstrukciónál kezdetben meg kellett találni azokat a beállításokat, amelyek segítségével nagy hatékonysággal lehet az élesztősejteket csapdázni. Ezek után azt kellett kikísérletezni, hogy milyen körülmények között osztódnak a sejtek, és melyek azok a tényezők, amelyek ezt korlátozzák. A mérési eredmények és a tapasztalatok alapján javaslatot tettem a mikrofluidikai eszköz felépítésének módosítására.

Ebben a fejezetben ezeket a lépéseket szeretném röviden bemutatni.

6.1. Primer tervezés

A kísérlet során olyan primer párra volt szükségem, amely segítségével az mCherry fluoreszcens fehérjét kódoló génszakasz, a *Tef1* promóterrel és a *Cyc* terminátorral együtt beilleszthető a *M4366_HO-hisG-URA3-hisG-poly_HO* plazmidba [25]. A HO locusba történő idegen DNS inzertálása nincs hatással az élesztők növekedésére [25]. Az általam használt vektor *URA3* szelekciós markert tartalmaz. A *URA3* gén képessé teszi az élesztőt arra, hogy uracil mentes környezetben is életképes maradjon. A későbbiekben erre lehet szelektálni.

Ehhez terveznem kellett egy primer párt. A primer egy olyan rövid, mesterséges, egyszálú DNS, ami meghatározza az amplifikálandó DNS szakasz elejét és végét, így a PCR során a DNS polimeráz a kívánt DNS szakaszt fogja szintetizálni. A primer olvadási hőmérséklet és a

másodlagos szerkezetek ellenőrzésére a PREMIER Biosoft Primer Design szoftvert használtam.

Az általam tervezett primer pár három szakaszt tartalmaz. Az egyik szakasz megegyezik mCherry-t tartalmazó plazmid (*p7 HO-mCherry6-KanMx*) szekvenciájával, a második szakasz a BglII restrikciós enzim hasítóhelye (AGATCT). Azért választottam a BglII restrikciós enzimet, mert ezzel linearizáltam a *M4366_HO-hisG-URA3-hisG-poly_HO* plazmidot. A primerek végére öt bázispár hosszúságú szakaszt terveztem annak érdekében, hogy az enzim megfelelően tudjon hasítani. Végeredmény képpen egy 27 bázis hosszú forward és egy 26 bázis hosszú reverse primert kaptam. A tervezett primerpár szekvenciája megtalálható az 1. számú mellékletben.

6.2. Molekuláris biológiai módszerek

6.2.1. Polimeráz láncreakció

A PCR-nek három fő lépése van: denaturálás, anellálás, polimerizáció. A használt enzimek a DreamTaq, Phusion Hot Start DNS polimeráz. Az általam tervezett primer párral és a HOplazmid_kulso_F5 HOplazmid_kulso_R5 primerpárral dolgoztam. Templátnak használtam a *HO-mCherry6-KanMx* és a *HO-hisG-URA3-hisG-poly-HO* plazmidot. A laborban használt PCR gép képes 3 féle hőmérsékleten végezni az anellálás lépését, így ki lehet próbálni, hogy mely hőmérsékleten a legeredményesebb a PCR. A PCR protokollok megtalálhatóak a 2. és 3. számú mellékletben.

6.2.2. DNS tisztítás

Az elvégzett PCR eredményt gélelektroforézis segítségével ellenőriztem. A PCR terméket gélfuttatást követően kivágtam a gélből. A kivágott gélkocka DNS tisztítását a Thermo Gel Extraction Kit segítségével végeztem. NanoDrop2000 műszerrel megmértem az eredmény DNS koncentrációját.

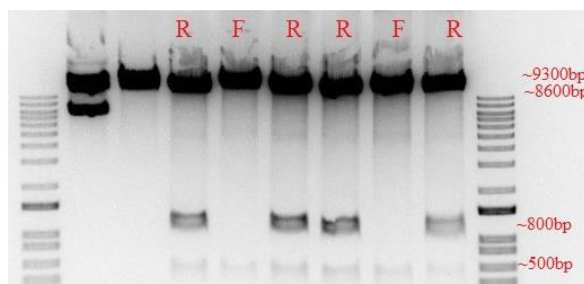
6.2.3. Klónozás

A tisztított PCR végeredményt és a plazmidot BglII restrikciós enzimmel emésztettem overnight, ami körülbelül 16 óráig tartott. A BglII emésztés eredménye ragados vég. Mivel mind a két primerbe BglII restrikciós emésztő helyet terveztem, ezért a ligálás során a plazmid könnyen összezáródhat anélkül, hogy az inzert bele kerülne. Az összezáródás elkerülése érdekében a plazmid overnight emésztését követően FastAP-t tettem az elegybe. A FastAP enzimet 10 percig hagytam működni, majd 75°C-on 5 percig inkubáltam, hogy inaktiválódjon.

A BglII egy olyan restrikciós enzim, amit nem lehet hővel inaktíválni, emiatt oszloptisztítással értem ezt el. A plazmid és az inzert ligálásához T4 DNA ligase enzimet használtam. A ligálás során három reakciót raktam össze. Az első tartalmazza a mintát, a második a negatív kontroll, ami nem tartalmaz inzertet, a harmadik a dupla negatív kontroll, ami nem tartalmaz se inzertet, se ligáz enzimet. Ennek az a célja, hogy ha nem a várt eredményt kapom, akkor vissza lehessen vezetni, hogy mi lehetett a hiba forrása.

6.2.4. Transzformálás *E. coli*-ba

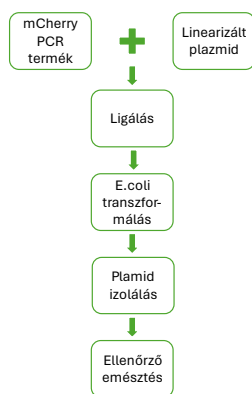
A ligálás eredményeit *E. coli* XL10Gold kompetens sejtekbe transzformáltam. A kompetens sejteket -80°C-os fagyasztóból veszem ki, majd 50µl kompetens sejthez 5µl plazmidot adok. Óvatosan, jégen pöckölve keverem. Ezt követő lépés a hősokk, amely során a keveréket 1,5 percig 42°C-on tartom. Ezután újra jégre helyezem a mintát, és hozzáadok 200µl ampicilinmentes LB-t, és 37°C-on inkubálom 5-10 percig. Végül 50µl-t szélesztek ki LB agar lemezre, és hagyom egy éjszakán át nőni 37°C-on az inkubátorban.



12. ábra BamHI restrikciós enzimmel történő ellenőrzőemésztés eredménye: F: inzert iránya megegyezik az URA3 irányával, R: ellenkező irányú az inzert

A sikeresen transzformált telepekből hatot szaporítottam fel folyékony tápoldatban.

Mivel a primer pár mindkét tagjába BglII restrikciós enzim hasítóhelyet terveztem, a ligálás során az inzert mind a két irányban képes a *M4366_HO-hisG-URA3-hisG-poly_HO* plazmidba beépülni.



13. ábra Folyamat áttekintése

Emiatt terveznem kellett egy ellenőrző emésztést, amely segítségével megállapíthattam az inzert irányát a kiválasztott telepek izolált plazmidjaiban. Ehhez a BamHI restrikciós enzimet használtam. A fragmenteket méret szerint szétválogattam. Az inzert irányától függően különböző méretű fragmenteket kaptam, így megállapíthattam az inzert irányát a plazmidba. A 13.ábrán az F-fel jelölt oszlop jelzi, hogy a mintában az inzert irányával megegyezik az URA3 irányával, míg az 'R' jelűben ellenkező irányú az inzert.

6.2.5. Plazmid izolálás

A különálló kolóniákból párat felvettem, majd ampicilines LB tápoldatba 5 ml előkultúrát készítettem, amit hagytam egy éjszakán keresztül nőni. Másnap az előkultúrát centrifugáltam, a LB tápoldatot leöntöttem. A pelletet Resuspension Solution-nal vettem fel. A plazmidot a GeneJet Plasmid Miniprep Kit segítségével izoláltam. Végül az eredmény DNS koncentrációját NanoDrop2000 segítségével megmértem.

6.3.Élesztőkön végzett laboreljárások

6.3.1. Törzsek

A kísérleteim során BY4743 és W303 és ezek transzformált törzseivel dolgoztam. Az alábbi táblázatban összefoglalom a már meglévő, az általam transzformált törzseket és a pároztatás eredményeit.

BY 73	BY4743 diploid
W303 92	W303 diploid
BY 706	706 BY_HO-URA mCh_forward 1 a
BY707	707 BY_HO-URA mCh_forward 1 alfa
W303 710	710 W303_HO-URA mCh_reverse 3 a
W303 711	711 W303_HO-URA mCh_reverse 3 alfa
BY 157	157 BY4743 GFP alfa
BY 154	154 BY4743 GFP a
W303 244	244 W303 GFP alfa
W303 241	241 W303 GFP a
BY 800	BY_URA_mCh_a_KanMX_GFP_alfa
BY 801	BY_URA_mCh_alfa_KanMX_GFP_a
W303 802	W303_URA_mCh_a_KanMX_GFP_alfa
W303 803	W303_URA_mCh_alfa_KanMX_GFP_a

1. táblázat Felhasznált élesztőtörzsek (Az általam transzformált törzseket és a pároztatás eredményeit zöld háttérrel jelöltem.)

6.3.2. Tárolás

Az élesztőket többféleképpen lehet tárolni. Pár hónapig +4°C-on hűtőben agar lemezen, néhány évig -80°C-on fagyasztócsövekben, glicerines oldatban. Az utóbbi tárolási módszerhez, oltókacs segítségével 150µl YPD-be belemostam az eltárolni kívánt élesztőtörzsből, majd hozzáadtam 150µl steril 50%-os glicerint, és alaposan összekevertem az elegyet.

A bemutatott mérésekhez főleg a +4°C-on tárolt élesztőket használtam. Szükség esetén a gyűjteményből újraoltottam őket.

6.3.3. Tápközegek

A laborban többféle tápközeget használunk az élesztők szaporításához. Az egyik a YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), ami 1% élesztő kivonatot (Duchefa Biochemie), 2% peptont

(Duchefa Biochemie) tartalmaz. Amennyiben szilárd táptalajként szeretnénk használni további 2% agart (Duchefa Biochemie) kell hozzáadni. Ehhez végül szükség szerint adunk glükózt és desztillált vizet. A tápközeget keveréket autoklávban sterilizáljuk.

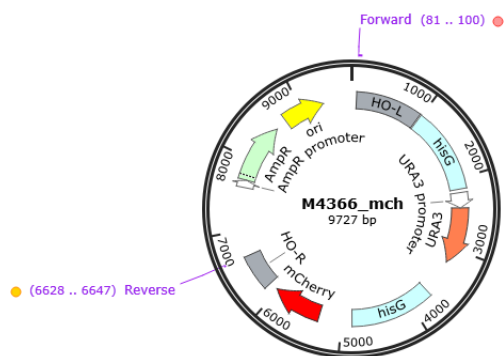
A fluoreszcens mikrofluidikai mérésekhez nem alkalmas a YPD, az élesztő tartalma miatt. Az élesztők természetes módon tartalmazznak olyan vegyületeket, amelyek képesek fluoreszcens jel kibocsátására, így hibás jelet adhatnak a mérés során [26]. Ezt a jelenséget nevezzük autofluoreszcenciának. Ennek elkerülése érdekében a mikrofluidikai mérésekhez SD (Synthetic Defined) tápközeget használtam. Ez a fajta tápközeget tartalmaz 0,17% YNB-t (Yeast Nitrogen Base, Fisher Scientific), 0,1107% MSG-t (L-glutamic acid monosodium salt dehydrate, Aldrich Chemistry), aminosav mixet (Sigma Aldrich) és szűrt vizet. Ha szilárd táptalajt szeretnénk, a felsoroltakon felül még 2% agart adok hozzá. Olyan aminosav mixet is lehet hozzáadni, amiből egy vagy több aminosav hiányzik, például az uracil, a leucin. Uracilmentes SD-t használtam az *URA3* szelekciós markerrel jelölt élesztők megkülönböztetéséhez, hogy megállapíthassam, hogy melyikükbe épült be sikeresen az *mCherry*-t kódoló génszakasz. A fent említetteken felül szükség esetén lehet az SD-hez 0,1% *geneticint* és 1% *adenint* adni. A mikrofluidikai kísérletekhez szűrt SD-t készítettem. A szűréshez Sarstedt Filtropur S 0.2 szűrőt használtam. A szűrő nem enged át 0,20µm-nél nagyobb részecskéket filteren, így az SD nem tartalmaz semmit, ami eltömíthetné a mikrofluidikai cellát. A mikrofluidikai méréshez szükségem volt másféle SD-re, ami azt jelenti, hogy másfélszer annyi YNB-t, MSG-t, kristályvizes cukrot, aminosav mixet tartalmaz, mint az egyszeres SD.

Az előkultúra készítése során a kívánt élesztő törzsből belemostam 2ml SD-be, ezt egy éjszakán át hagytam nőni szobahőmérsékleten, rázatón (210rpm).

6.3.4. Élesztők transzformálása

Az élesztők transzformálásához a módosított Gietz and Sciestl módszert használtam a 4.sz. mellékletben látható protokoll szerint [27].

Ehhez szükségem volt a plazmidról készült PCR termékre. A transzformálás során ez a PCR termék fog beépülni a genomba. A laboratórium törzsgyűjteményében már korábban tároltak BY4743 és W303 törzseket *GFP*-vel jelölve, ezért nekem csak az *mCherry*-vel való jelölést kellett elvégeznem, ami a DNS homológ rekombinációjával kerül be az élesztő kromoszómájába. A DNS-végek erősen rekombinogének, és közvetlenül kölcsönhatásba lépnek homológ szekvenciákkal.



14. ábra mCherry-t tartalmazó M4366_HO-hisG-URA3-hisG-poly_HO plazmid (Forward primer: HOplazmid_kulso_F5, Recerse primer: HOplazmid_kulso_R5)

A munkám során a laboratóriumban már korábban is használt HOplazmid_kulso_F5, HOplazmid_kulso_R5 (1.sz. melléklet) primer párt használtam a PCR során. A PCR protokollja megtalálható a 3.sz. mellékletben. A 14.ábrán látható, hogy a plazmid mely részéről készült a PCR termék.

Egy URA3-mal megegyező és egy ellenkező irányba beépült inzertet tartalmazó plazmidokkal végeztem PCR-t 58°C-on és 61°C-on. A végeredményt gélen megfuttattam, hogy ellenőrizzem a PCR sikerességét. A PCR terméket kivágtam a gélből és tisztítottam. Ezt használtam az élesztő transzformáláshoz.

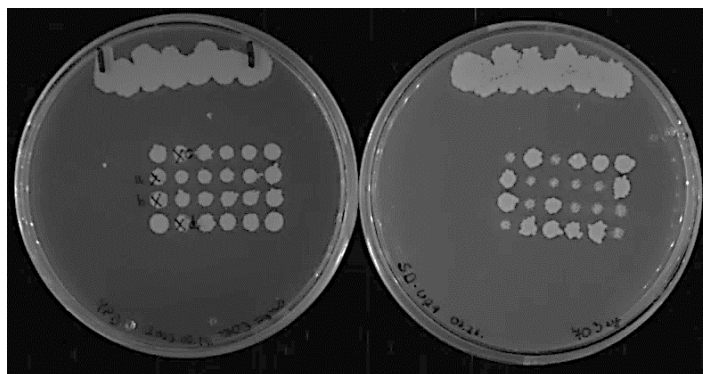
A transzformálás előtt ellenőriztem, hogy a használt élesztő biztosan ne tartalmazzon URA3 gént, mivel ez lesz a szelekciós markerünk a folyamat során. Ezzel a módszerrel tudtam kiválogatni, hogy mely élesztőkbe transzformáltuk sikeresen az URA3 gént. Uracilmentes táptalajra kiszélesztve, csak azok életképesek, amelyek tartalmazzák a betranszformált génszakaszt.

A transzformálás sikerességét a Tecan Spark 20M optikai denzitás és fluoreszcenciamérő lemezolvasóval ellenőriztem. –A BY4743-ba az mCherry-t forward irányban tartalmazó PCR terméket, míg a W303-ba az mCherry-t reverse irányban tartalmazó PCR terméket sikerült betranszformálnom. Ezt követően a sikeresen transzformált törzsekből néhány telepet betároltam.

6.3.5. Sporuláció és zymolyase kezelés

Az előkultúra készítést követően sporulációs lemezre szélesztettem az élesztőket. A sporulációs lemez tartalmaz 1% kálium-acetátot, 10% aminosav mixet és 2% agart. Négy nap növesztést követően fénymikroszkóp segítségével ellenőriztem a tetrádokat. A következő lépés a Zymolyase kezelés, amely során a tetrádokat körülvevő sejtfalat emésztjük el. A felnövesztett élesztők különálló kolóniáiból felvettem egy részt, és a Zymolyase oldatba elkevertem. A keveréket 15-30 percig 37°C-on inkubáltam, majd 20µl-t cseppentettem a YPD lemez egyik szélére. Ezt követően a spórákat mikromanipulátor segítségével szedtem szét, úgy, hogy egy spóra tetrádja egy oszlopba kerüljön. Ha megfelelően szedem szét a tetrádokat, akkor

oszloponként négy telep nő ki. Az élesztők a meiózis során négy leánysejtet hoznak létre, ebből csak kettőben fog az általunk betranszformált gén megmaradni. Ezt úgy tudom kiszűrni, hogy szelektív táptalajra bársony segítségével átnyomdázom a szétszedett spórák által létrehozott telepeket. Az átnyomdázás után oszloponként csak két telep nő ki. Végül a szelektív táptalajon kinőtt telepek párosodási típusát mating PCR segítségével határoztam meg. A 15. ábrán látható a BY 703 élesztő mikromanipulátorral szétszedett tetrádjai által kialakított telepek és a szelekciós táptalajra átnyomdázás eredménye.

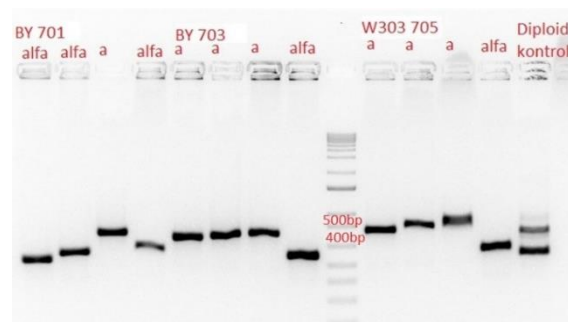


15. ábra BY 703 mikromanipulátorral szétszedett tetrádok(bal), átnyomdázás eredménye(jobb)

6.3.6. Haploid és diploid törzsek létrehozása

Az élesztőknek az MATa és MATα párosodási típusát PCR segítségével határoztam meg [28]. A PCR protokollja megtalálható a 5.sz. mellékletben.

Ezzel a módszerrel az is kideríthető, hogy az élesztő diploid-e vagy haploid. A PCR eredményeként MATa típusú élesztő esetén 492bp, míg MATα típusú esetén 369bp hosszú terméket kapunk. A 16. ábrán látható a párosodási típusokat meghatározó PCR eredménye. BY701, BY703 és W303 705 törzsekből betároltam MATa és MATα típust is.



16. ábra Élesztők MATa (492bp) és MATα (369bp) típusát meghatározó PCR eredménye

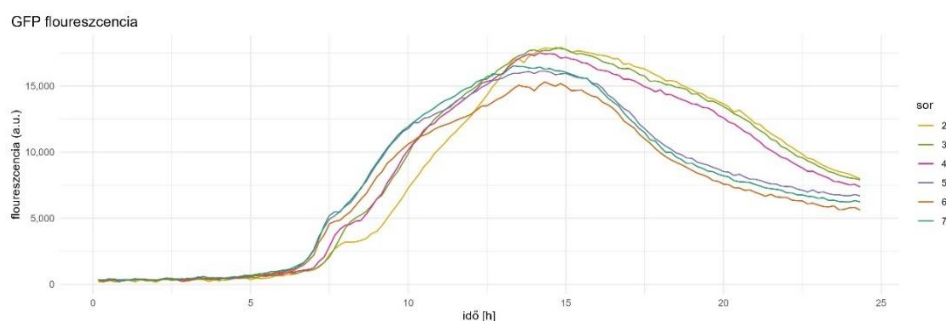
Ahhoz, hogy két színnel jelölt diploid élesztőket kapjak, pároztattam őket GFP-t tartalmazó haploid élesztőkkel. A pároztatás során egy Eppendorf-csőben lévő 500μl YPD-be belemostam egy MATa és egy MATα haploid törzset. A keveréket egy estére a rázón (210rpm) a 30°C inkubátorba raktam. Majd másnap geneticines és uracilmentes táptalajra szélesztettem. Ezen a lemezen csak azok az élesztők maradtak életben, amelyek sikeresen párosodtak és tartalmazták

mind a geneticin rezisztencia gént, mind az URA3 gént. A 2. táblázatba foglaltam össze, a törzsek pároztatását és milyen néven lettek eltárolva.

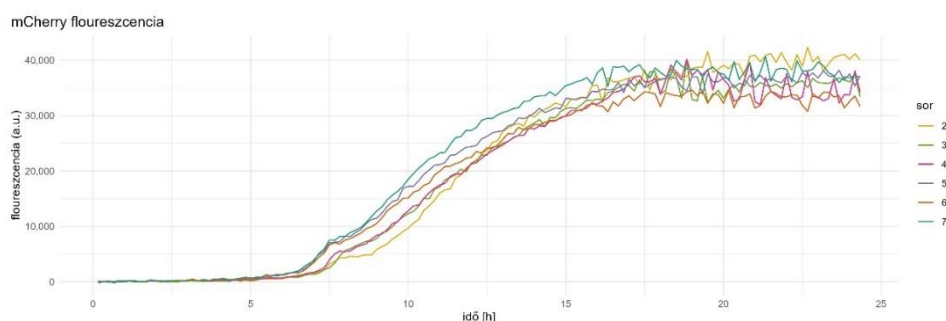
BY800	706 BY_HO-URA mCh_forward 1 a	157 BY4743 GFP alfa
BY801	707 BY_HO-URA mCh_forward 1 alfa	154 BY4743 GFP a
W303 802	710 W303_HO-URA mCh_reverse 3 a	244 W303 GFP alfa
W303 803	711 W303_HO-URA mCh_reverse 3 alfa	241 W303 GFP a

2. táblázat Élesztők pároztatás

A pároztatás eredményességét Tecannal való méréssel is ellenőriztem. A mérés előtt Optical Density-t mértünk 600nm-en, hogy mindegyik mintában a kihígítás után megközelítőleg 4×10^6 darab sejt legyen. Az overnight mérés során 10 percnként mértünk abszorbanciát, *mCherry* és *GFP* fluoreszcenciát. Az adatokat diagrammon ábrázoltam, amelyek a 17. és a 18. ábrán láthatóak.



17. ábra Tecan mérés: 6 telep GFP fluoreszcenciájának a mérési eredménye (2: BY GFP a mCh a 1, 3: BY GFP a mCh a 2; 4: BY GFP a mCh a 3; 5: BY GFP a mCh a 1, 6: BY GFP a mCh a, 7: BY GFP a mCh a)



18. ábra Tecan mérés: 6 telep mCherry fluoreszcenciájának a mérési eredménye (2: BY GFP a mCh a 1, 3: BY GFP a mCh a 2; 4: BY GFP a mCh a 3; 5: BY GFP a mCh a 1, 6: BY GFP a mCh a, 7: BY GFP a mCh a)

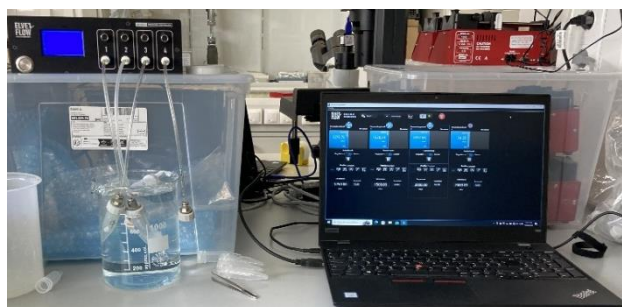
Az adatok alapján a legjobbnak ítélt törzsekből tároltam be törzsenként egyet-egyet.

6.3.7. Nyomásvizsgálat

A mikrofluidikai mérések során többször előfordult, hogy az élesztők a megfelelő becsapódást követően nem nőttek. Az egyik feltevés az volt, hogy a túl nagy nyomás okozta stressz miatt nem nőnek a csapdákban az élesztők. Ennek vizsgálatára nyomástartást vettem alá a BY800 törzset. A teszt során az előző nap készített előkultúrát százszorosára hígítottam,

majd abból 1-1ml-t mértem csövekbe. A kihígított előkultúra sejtszámát Bürker kamra segítségével határoztam meg.

A mérés előtt az üres csöveket víz alá helyeztem, hogy ellenőrizzem, eresztenek-e. A csöveket rászereztem a mérési összeállításra, majd bekapcsoltam a generátort, ami létrehozta a beállított nyomásokat. Az élesztőket két órán keresztül a beállított nyomásokon tartottam. A kontrollt 1 bar-nak tekintettem, ami a normál légköri nyomásnak felel meg. Emellett három különböző nyomáson teszteltem az élesztőket: 1,25 bar, 1,5 bar, 2 bar. A mérés idejéig mind a négy csövet víz alatt tartottam, hogy a lehetséges eresztést kizárjam. A víz 22°C-os volt, ami közel azonos volt a laboratórium hőmérsékletével. A mérési összeállítás a 19.ábrán látható.



19. ábra Nyomás teszt mérési összeállítása

A mérés eredményét úgy ellenőriztem, hogy a tesztet követően újra sejtszámolást végeztem Bürker kamra segítségével. Emellett 30µl ezerszeresre hígított mintákat szélesztettem YPD táptalajra, amelyeket két napig 30°C-os inkubátorban hagytam nőni, majd megszámláltam, hogy hány telep nőtt ki. Az eredményeket a 3.táblázatban foglaltam össze.

	1 bar (kontroll)	1,25 bar	1,5 bar	2 bar
Sejtszám	$4,25 \times 10^6$	$3,104 \times 10^6$	$3,4375 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$
Telepek száma	64	77	71	75

3. táblázat Nyomás teszt eredménye

Arra a konklúzióra jutottam, hogy a nyomás befolyásolja az élesztők osztódási képességét, de nem akadályozza meg, csak lelassítja. Az a feltevésem, hogy az élesztőknek nagyobb stresszt jelenthet az a nyíróerő, ami a folyadék áramlása során alakult ki. Ez lehet az egyik magyarázat arra, hogy egyes mérések során miért nem osztódnak az élesztősejtek.

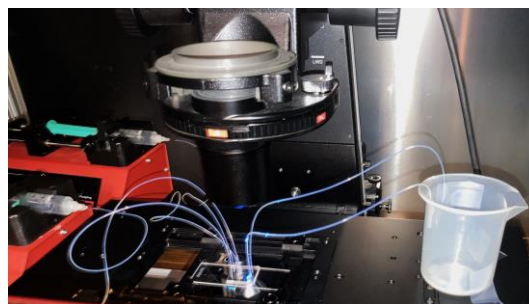
6.4. Mikrofluidikai protokoll

Minden új konstrukció esetén a protokollon kisebb változtatásokat kellett végrehajtani. A különböző élesztőtörzsekkel való mérés befolyásolja, hogy milyen hígítással, mekkora térfogatárammal lehet dolgozni, mivel vannak olyan élesztők, amelyek érzékenyebbek, és vannak, amelyeket kevésbé visel meg a nyomás és a nyíróerő.

Ez a mérési protokoll a Mother Machine V11i verzióhoz és a BY4743 élesztőtörzshöz lett optimalizálva. A részletesebb mikrofluidikai protokoll a 6.sz. mellékletben található.

A mérést megelőző nap 2ml szűrt SD-be előkultúrát készítettem a használni kívánt törzsekből. A mérés napján az előkultúrákból 50-szeres hígítást készítettem SD-be. Minden szükséges eszközt előkészítettem a méréshez. A mikrofluidikai cellát a tárgyasztalra helyeztem, majd hozzá szereltem a kivezetést. A 2ml-es fecskendőbe geneticines vizet szívtam fel, hogy így minimalizáljuk a csatorna befertőződésének esélyét. A 10ml-es fecskendőt pedig másfeles SD-vel töltöttem fel, mert a mérés teljes ideje alatt az SD mellett vizet is áramoltattam, hogy az élesztő ne okozzon dugulást a bemenetben. A víz pumpálása miatt felhígult az SD a csatornában. Ezt szeretném azzal kompenzálni, hogy másfeles SD-t használok. Ezt követően a csatornát feltöltöttem SD-vel, majd a pumpa segítségével felszívtam az élesztőt a 2ml-es fecskendővel. Azután betöltöttem az élesztőket a csatornába, aminek következtében élesztőt fogott be a csapdák nagyrésze. A pumpák áramát nagyobb sebességre állítottam, hogy kimossam a felesleges élesztőket a csatornából, hogy ne zavarják meg a mérést. Végül beállítottam azt a térfogatáramot, ami kellőképpen biztosított elegendő tápanyagot, de minimalizálta az élesztőkre ható stresszt. Kiválasztottam a mérési pontokat, beállítottam, milyen fluoreszcens képek készüljenek, és mekkora időközönként. Ezt követően elindítottam a mérést. A mérések általában 48 óra hosszúak. Minden nap érdemes legalább egyszer ellenőrizni, hogy minden megfelelően működik-e a mérés során.

Ha eldugult a csatorna, akkor átmosom óvatosan a csatornát, ügyelve, hogy ne mossam ki a csapdákból a sejteket. A mérés végén leállítottam a képek készítését, szétszedtem a mérési összeállítást, és kikapcsolom a mikroszkópot. A 20.ábrán látható a mérés összeállítása.



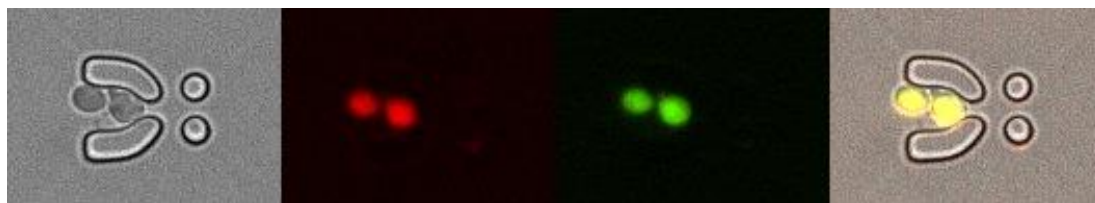
20. ábra Mikrofluidikai mérés összeállítása

6.5. Adatgyűjtési módszer

A képek készítéséhez Nikon Eclipse Ti2 mikroszkópot használtam FITC és TRICT szűrővel, Nikon Plan Apo λ 20x objektívet és Andor Zyla 4.0 sCmos kamerát. A mérések során a NIS-Elements AR (Advanced Research) programot használtam a mikroszkóp beállításához.

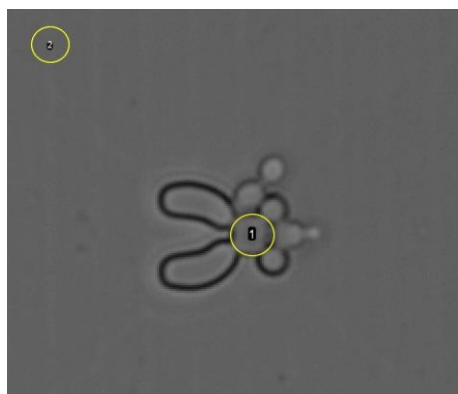
A mérési összeállítás után kiválasztottam azokat a pontokat, amelyeket meg akartam figyelni. A kiválasztott pontokról 15 percenként készült három kép, egy brightfield, egy TRICT és egy

FITC szűrővel. A 21. ábrán látható, hogy milyen képek készültek a megfigyelési pontokról, és hogy néznek ki az egymásra rakott képek.



21. ábra A mérési pontokról készített képek(balról jobbra haladva): Brightfield, TRICT szűrővel, FITC szűrővel, előző képek egymásra helyezése

A képeket FIJI software segítségével elemeztem. A fluoreszcencia intenzitás méréshez kiválasztottam egy csapdát, ami megfelelőnek tűnt: volt a szülőcsatornában sejt, és voltak nyomai az osztódásnak. Manuálisan kiválasztottam azt a részt, ahova a leánysejt beszületik. Ez az a rész, amit a 22. ábrán 1-essel jelöltem.



22. ábra Fluoreszcencia intenzitás mérési pontok:
1: élesztő, 2: háttér

A manuális kijelölés következtében előfordulhat, hogy a csapda beelöng a mérésre kiválasztott területbe, és befolyásolhatja a kapott eredményeket. A FIJI leméri az általam kijelölt területet, és egy átlagértékkel jellemzi. Minden képen ugyanazt a kijelölt részt fogja majd lemérni. Az életciklusa elején a sejt kisebb, nem tölti ki teljesen a kijelölt területet, és ez okozhat eltolódást az adatokban.

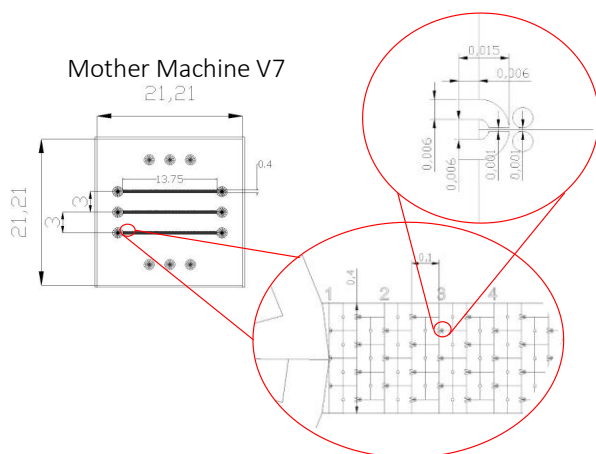
A 2-essel jelölt régióval a háttér fluoreszcencia intenzitását akartam megmérni. Erre azért volt szükség, hogy a háttér fluoreszcenciája ne zavarja a mérést. Ezt úgy értem el, hogy az 1-essel jelölt terület eredményéből kivontam a 2-es terület eredményét. A kijelölt területeknek az átlagos intenzitásával számoltam a későbbiekben. A kapott adatokat Microsoft Excel segítségével elemeztem.

7. Eredmények bemutatása

7.1. Mikrofluidikai eszközök fejlesztése

A projekt folyamán az egyetem Biomikrofluidikai Kutatócsoportjával dolgoztunk közösen. , az Az általunk tervezett és legyártott hét mikrofluidikai cellát teszteltem, és több mérést végeztem. Azt szeretném bemutatni, hogy milyen felépítésű mikrofluidikai eszközökkel végeztem mérést, milyen megfontolások mentén változtattunk a konstrukción.

A Mother Machine V7 az első típusú mikrofluidikai eszköz, amivel mérést végeztem. Három csatorna van benne. Mindegyiknek van egy bemenete és egy kimenete, ezért egyszerre három mérést lehet végezni. A csatorna $5\mu\text{m}$ magas, a hossza $13,75\text{mm}$. A csatorna teljes hosszában csapdák és oszlopok vannak. Az oszlopok arra szolgálnak, hogy a széles csatorna teteje ne omoljon be. A csapda egy újszerű konstrukció, U alakban elhelyezkedő oszlopok, amelynek közepéhez további 2 oszlop csatlakozik, amelyek megfogják a leánysejtet. A szülőcsatornába beszűlő leánysejt szűz, ezért számolható, hogy az élete során összesen hány osztódási ciklus megy végbe. Az összeállítás a 23. ábrán látható. Csatornánként egy bemenet van, ennek következménye, hogy ugyanott kell az élesztőt betölteni és áramoltatni a tápoldatot, emiatt a betöltés során a tefloncsövet többször cserélni kell. A mérések során azt lehetett megfigyelni, hogy a csatorna vége felé kevesebb tápanyag jut, mint az elejébe, emiatt a végén lévő sejtek éheztek. A hosszú csatorna miatt egy másik gond is felütötte a fejét, mégpedig, hogy nagy a nyomáskülönbség a csatorna eleje és vége között, emiatt nem azonos körülmények között figyelhetjük meg a sejteket. Újabb probléma, hogy a csatorna végén nincs elég nyomás, hogy az élesztőket a csapdába nyomja, és az osztódás nem a szülőcsatorna irányába történt. A nyomásesés következtében könnyebben bedugult a vége a csatornának. A Mother Machine V8 alapfelépítése megegyezik a Mother Machine V7-tel, de kétszer szélesebb a csatornája a V7-es modellnél.



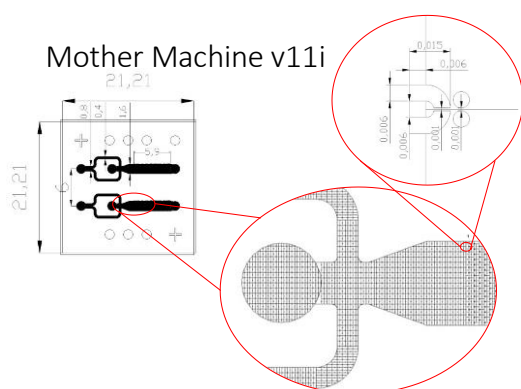
23. ábra Mother Machine V7 mikrofluidikai eszköz konstrukciója

Erre amiatt van szükség, hogy több élesztő esetében legyenek közel azonosak a körülmények. A V8 csatornái elején van egy szűrő, aminek az a rendeltetése, hogy a rendszerbe bekerülő esetleges szennyeződések felfogja, mint például a szöszöket. A Mother Machine V9-ben a csatornák magassága $10\mu\text{m}$ lett. A sejtek nem csak horizontális irányban, hanem vertikális irányban is képesek voltak osztódni, ami megnehezítette az élesztők osztódásának a nyomonkövetését.

Egymás fölé is becsapdázódhatnak, így a fluoreszcens intenzitás vizsgálata során nem lehet elkülöníteni a két sejt fluoreszcens jelét egymástól. A Mother Machine V10 modellben a

Mother Machine V8 beépített, szennyeződést megakadályozó szűrőjét kellett elhagyni, mert eltömődést okozott a bevezetéseknél.

Egy más megközelítéssel próbálkoztunk (Mother Machine 11), elhagytuk az egybetöltéses konstrukciót, és egy két betöltéses verziót próbáltunk ki. A csatorna magassága megmaradt, a csatorna hossza feleakkora, a szélessége pedig duplája lett, mint a Mother Machine V10-nél. Ebben a mikrofluidikai cellában két csatorna van. A baloldalon lévő betöltésen keresztül áramoltatjuk a tápoldatot a csatornában, míg a jobb oldali bemenet segítségével töltjük be az élesztőket a mikrofluidikai cellába. A betöltés elkülönítésére azért volt szükség, hogy minimalizáljuk annak a lehetőségét, hogy a bemenet elduguljon az elején elszaporodott élesztők miatt. A további védelem miatt az élesztők betöltésére vizet használtunk. A csatorna elején és a végén van egy-egy szakasz, ahol csak oszlopok vannak.



24. ábra Mother Machine V11i mikrofluidikai eszköz konstrukciója

Ennek kettős szerepe van: az egyik, hogy tartsa a csatorna tetejét, a másik, hogy egyfajta szűrőként viselkedjen és felfogja a rendszerbe kerülő nem kívánatos szennyeződéseket. Mother Machine V11i verziónál csak a bemenet és a kimenet kialakításán változtattunk. Áttértünk az oszlopos kialakításra. Az oszlopos kialakítás miatt kisebb eséllyel tömődik be a ki- és a bemenet.

Eltömődés estében, pedig nagyobb valószínűséggel lehet kimosni, így meghosszabbítva a mérés időtartamát. A Mother Machine V12 eszköz csatornái szélességét ismét megdupláztuk és a hosszúságát megfeleztük. Azt reméljük, hogy minimalizálni lehet a nyomásesés és a tápanyagmennyiség miatt kialakuló különbségeket, és közel azonos körülmények között lesznek az élesztősejtek a csatorna teljes hosszában. Ez amiatt fontos, hogy összehasonlíthatóak legyenek az elején és a végén becsapódzott sejtek.

7.2. Mikrofluidikai mérések eredményei

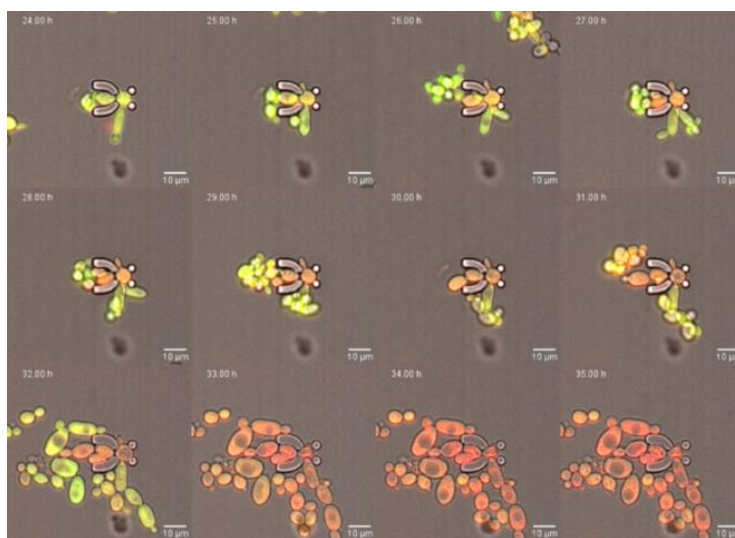
Két mikrofluidikai mérésnek az eredményeit mutatom be. Az első egy vékonylemez Mother Machine V7, a második egy vastaglemez Mother Machine V11i. A vékonylemez azt jelenti, hogy a PDMS egy fedőlemez vastagságú üveglaphoz, míg a vastag lemez egy tárgylemezhez lett hozzákötve. A vékony lemez előnye, hogy részletesebb és kevésbé zajos képeket kapunk,

de hátránya, hogy nehezebb a stabil befogása a mikroszkópba. A képkészítés során a kiválasztott résznek csak egy részét lehet élesen beállítani.

A Mother Machine V7 eszközzel egy csatornán végeztem mérést, amibe csak BY800 törzset töltöttem be. A Mother Machine V11i -vel 2 csatornán végeztem szimultán mérést. Az első csatornában BY800 GFP-vel és mCherry-vel duplán jelölt, BY151 GFP-vel jelölt, BY152 mCherry-vel jelölt élesztők elegyét, míg a második csatornába BY800, BY RFP, BY YFP keverékét töltöttem be.

7.2.1. Morfológia

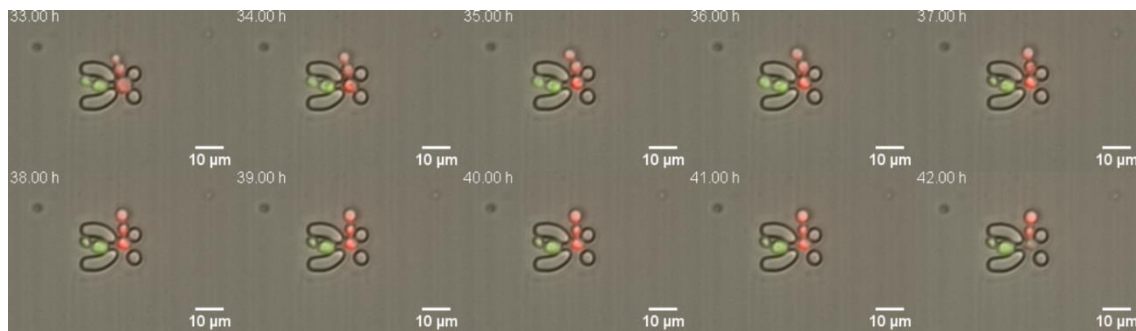
A mikrofluidikai mérések során az öregedés és a halál morfológiai jellemzőit tudtam megfigyelni. A vékonylemezes mérés folyamán készített nagyobb felbontású képeken jobban láthatóak ezek a jellemzők. Megfigyelhető a megnagyobbodott vakuólum, az anyasejt méretének növekedése, és az, hogy az öreg anyasejt nagyobb leánysejteket szül. A 25.ábrán látható, hogy a szülőcsatornában lévő sejt az idő előrehaladtával csökken a zöld fluoreszcens jel intenzitása



25. ábra Mother Machine V7 21a csapdába beleszületett élesztő morfológiai változásai az idő előrehaladtával

Ezt okozhatta az, hogy az öregedés során a citoszol pH-ja lecsökken. Egy tanulmányban az olvasható, hogy a GFP érzékenyebb a pH változására, savasabb közegben csökken a fluoreszcens jelének az intenzitása [15]. Míg az mCherry jobban visel ezt, kisebb méretekben csökken a fluoreszcens jelének az intenzitása [15]. Egy idő után a sejt összeesik. A mérés során a sejthalált a tápanyaghiány okozta.

A vastaglemezes mérésről készült képeken csak a sejt összeesése az, ami indikálja a sejthalált. Ez látható a 26.ábrának az utolsó képkockájában.



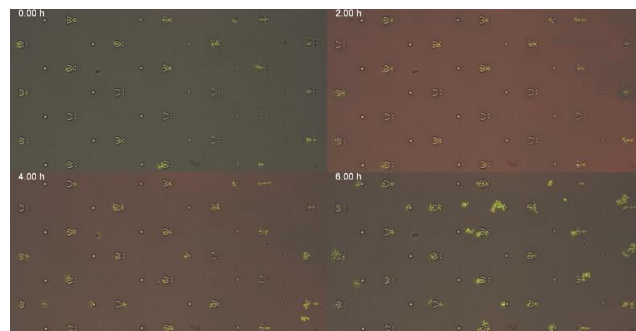
26. ábra Mother Machine V11i mérés során becsapdázódott BY RFP élesztő morfológiai változásai az idő előrehaladtával

Xie és munkatársai által végzett mikrofluidikai mérések során több sejthalál típust különítettek el különböző morfológia és stressz riporter szint alapján [21]. A két domináns típus közül az első típus az, amikor a halott sejt köralakú, és az utolsó pár osztódásban született leánysejtjei nem képesek osztódni. A második típusú halott sejtek hosszúkas formát vesznek fel, és az utolsó leánysejtje nem tud leválni az anyáról. További kutatás azt mutatta, hogy a két típus között eltért a stresszfehérjék szintje, a károsodás helye és mértéke [21]. A méréseim során mind a két típusú sejthalál előfordult.

7.2.2. Csapdázódás hatékonyságának vizsgálata

A csapdázódás hatékonyságát és a megtartó képességét azzal mértem meg, hogy körülbelül 100 csapda esetében vizsgáltam meg, hogy a mérés kezdetében hány sikeres csapdázás történt, valamint 4 és 6 óra múlva hány csapdába született be élesztő.

A Mother Machine V7 esetében 1 csatornából 5 megfigyelési pontról vettem mintát. A 27.ábrán látható, hogy milyen képek alapján számoltam ki az értékeket. Az figyelhető meg az értékekben, hogy ahogy haladunk a csatorna vége felé, a csapdába való beleszületés aránya csökkent.



27. ábra Mother Machine V7 3.méréspontról készült kép

Mérés helye a csatorna elejétől (Mérési pontok)	24 (3.)	28,5 (4.)	35 (5.)	43,5 (7.)	61 (10.)	Összesítés
Csapdák száma	24	21	24	25	24	118
Csapdázások száma 0h-kor	18	19	20	15	22	94
Beszületett sejtek száma 4h-kor	15	16	9	7	2	49
Beszületett sejtek száma 6h-kor	17	18	10	12	2	59
Csapdázódás aránya (%)	75%	90%	83%	60%	92%	80%
Beleszületés arány 6h (%)	94%	95%	50%	80%	9%	63%

4. táblázat Mother Machine V7 becsapdázódás vizsgálat eredménye

Ez azzal magyarázható, hogy a csatorna végén nem volt elég nyomás, hogy az élesztőket kellőképpen a csapdáka nyomja, és a szülőcsatorna irányába osztódjon.

Többek között ez az egyik ok, amiért a mikrofluidikai eszköz csatornájának a hosszát csökkentettük. A Mother Machine V11i eszközzel történő mérés során 2 csatornából 2-2 megfigyelési pontot választottam a csatorna elejéről és a végéről.

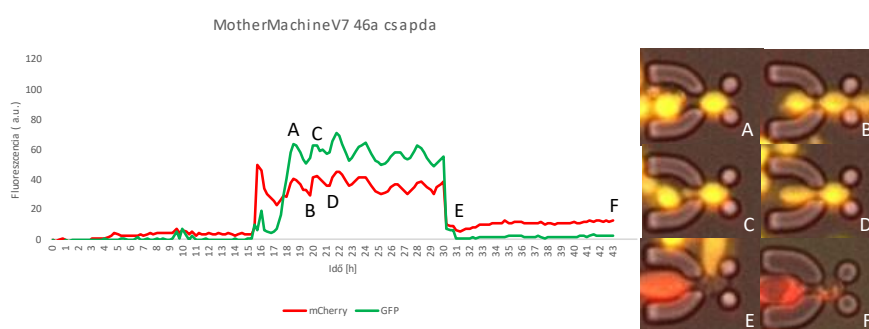
	1.csatorna			2. csatorna		
Mérés helye a csatorna elejétől (Mérési pontok)	5 (2.)	22 (7.)	Összesítés	5 (16.)	18 (12.)	Összesítés
Csapdák száma	45	46	91	46	45	91
Csapdázások száma 0h-kor	40	30	70	46	45	91
Beszületett sejtek száma 4h-kor	10	7	17	18	15	33
Beszületett sejtek száma 6h-kor	13	17	30	23	21	44
Csapdázódás aránya (%)	89%	65%	77%	100%	100%	100%
Beleszületés arány 6h (%)	33%	57%	43%	50%	47%	48%

5. táblázat Mother Machine V11i 1.csatorna és 2. csatorna becsapdázódás vizsgálatának eredménye

A mérés során mindkét csatornába belekerült buborék, amely következtében a csapdák egyrészből kimosta az élesztőket, a megmaradtaknak egyrésze pedig meghalt ennek következtében. Ennek ellenére általánosságban az élesztők közel fele sikeresen beszületett a szülőcsatornába. Az adatok alapján látható, hogy mind a két eszköz esetében 80% és e fölötti volt a sikeres becsapdázódás aránya.

7.2.3. Osztódás és fluoreszcens intenzitás kapcsolata

Az egyik kérdés amire kerestem a választ a kutatás folyamán, az az, hogy hogyan változik az élesztők fluoreszcens jelének az intenzitása a sejtciklus folyamán a Mother Machine V7-tel történő mérés során.



28. ábra Az osztódás és a fluoreszcens intenzitás kapcsolata: A: sarjképződés, B: sarjnövekedés, C: sarjképződés következő ciklus, D: sarjnövekedés következő ciklus, E: sejthalál (fluoreszcencia jel megszűnése), F: sejthalál után kb 10 órával (fluoreszcencia jel)

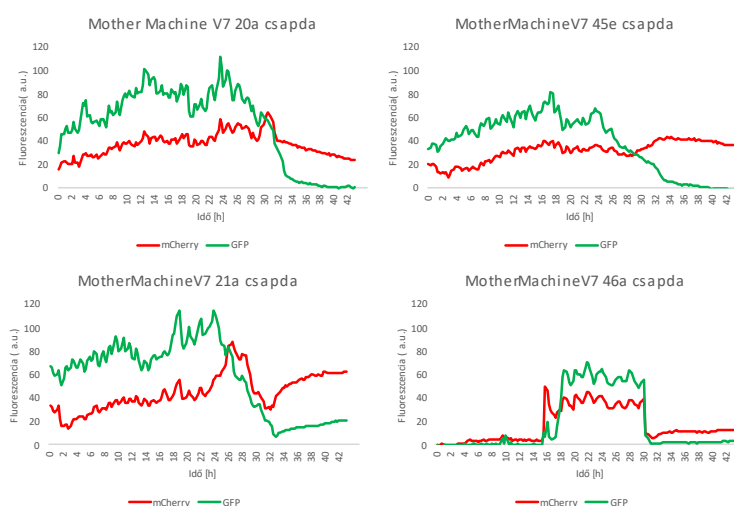
A 28.ábrán látható, hogy amikor az intenzitás magasabb, akkor az élesztő sarja éppen csak látszódik, amikor alacsonyabb, a leánysejt térfogata nő, és még nem vált le az anyasejtről. Ez a ciklus folytatódik addig, amíg a tápoldat áramlás leállása miatti sejthalál be nem következik.

Az intenzitásváltozás egyik oka lehet, hogy az osztódás során a különböző fázisokban változik a sejt pH értéke, ami befolyásolhatja a fluoreszcens fehérjék térszerkezetét.

Látható, hogy a halált követően több órával az mCherry és GFP fluoreszcens intenzitása megnő. Az intenzitás növekedését nem okozhatja az, hogy további fluoreszcens fehérjék szintetizálódnak. Egyik oka lehet, hogy a halál során a sejt pH-ja megváltozik. Lehet sejten belül a sejtszervecskék felbomlása miatt vagy a sejt felmelegedett permeabilitása miatt kiegyenlítődik a pH a sejt és SD médium között. Ezek az elméletek további vizsgálatot igényelnek.

7.2.4. Csatorna hosszának hatása a fluoreszcens intenzitásra

A Mother Machine V7 mérési adatok elemzése közben arra lettem figyelmes, hogy a csatorna elején becsapdázódott élesztők fluoreszcens jelének intenzitása nagyobb, mint a csatorna végén becsapdázódott élesztőké. A 29. ábra baloldalán kettő a csatorna elején (20a, 21a), a jobb oldalon kettő a csatorna vége felé becsapdázódott élesztő (45e, 46a) fluoreszcens jelölésének az intenzitását ábrázoló diagramok láthatóak.

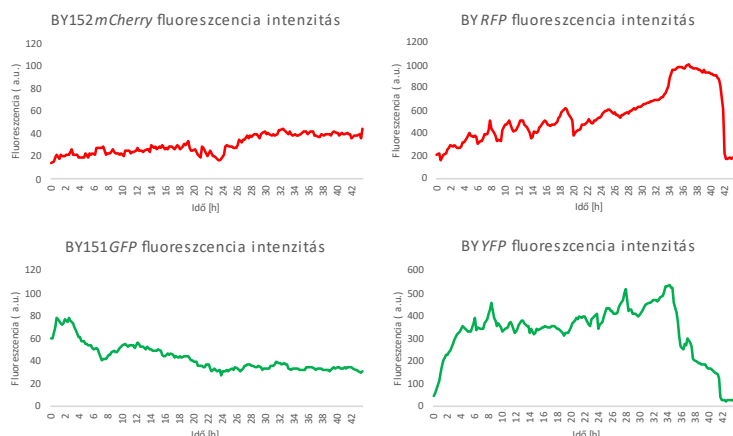


29. ábra Fluoreszcenciát összehasonlító diagrammok: A csatorna elején becsapdázott élesztők (20a, 21a) és a csatorna vége felé becsapdázódott élesztők (45e, 46a) fluoreszcens jelölésének intenzitásbeli különbségé 10-20%, az mCherry és GFP esetében egyaránt

Látható, hogy körülbelül 10-20% intenzitásbeli különbség van a csatorna eleje és vége között. Erre az lehet az egyik magyarázat, hogy a csatorna végére kevesebb tápanyag marad a tápoldatban, ezért az élesztő éheznek, emiatt kevesebb fluoreszcens fehérjét termel, és kisebb lesz a jel intenzitása. Ezen megfontolásból rövidítettük le a csatorna hosszát.

7.2.5. Fluoreszcens fehérjék összehasonlítás

A kutatólabor újonnan kapott élesztőre optimalizált RFP-t és YFP-t. A Mother Machine V11i eszközzel történő mérés során a második csatornában BY800, BY RFP, BY YFP élesztőket töltöttem be. Arra voltam kíváncsi, hogy milyen mértékű az intenzitásbeli különbség.



30. ábra Különböző fluoreszcens fehérjék intenzitásának összehasonlítása: Az RFP fluoreszcens jelének intenzitása megközelítőleg tízszerese az mCherry-ének. A YFP RFP fluoreszcens jelének intenzitása megközelítőleg ötszöröse a GFP-jének

Ahogy a 30. ábrán is látható, az RFP és mCherry, és a YFP és GFP intenzitásában nagyságrendbeli különbség van. Azt nem tudjuk, hogy a fluoreszcens fehérjék által kibocsátott fény miatt van ez a nagy eltérés, vagy amiatt, hogy a sejtek több fluoreszcens fehérjét termelnek. Ennek megállapítására további vizsgálatok szükségesek.

8. Kutatási eredmények és jövőbeli irányok

8.1. Eredmények összegzése

A munkám egyik eredménye, hogy lettek egyszerre mCherry-vel és GFP-vel is jelölt élesztő törzseim. Ehhez primer párt kellett terveznem, hogy az mCherry gént be tudjam illeszteni egy plazmidba. Erről a plazmidról készült PCR terméket. Az mCherry-t kódoló génszakaszt sikeresen transzformáltam több élesztő törzsbe. Ezeket az élesztőket sporuláltattam, hogy párosítani tudjam GFP-vel jelölt törzsekkel. Így kaptam a duplán jelölt élesztőket.

A mikrofluidikai protokoll finomításával elértem, hogy a mikrofluidikai cellákban a betöltés során a csapdázódás aránya minden esetben 80% felett volt.

A mikrofluidikai mérések eredményéből megállapíthattam, hogy az élesztők fluoreszcens jelének intenzitásbeli változása, és a sejtciklus fázisai között fennállhat a kapcsolat lehetősége. Továbbiakban ezt még vizsgálni kell. Az eredményekből megfigyelhető, hogy ha túl hosszú a csatorna, akkor a nem jut elég tápanyag a végére, ez okozza az élesztők fluoreszcencia

intenzitásának csökkenését. A nyomásesés miatt a csatorna végén nem volt elég nyomás, hogy az élesztők a szülőcsatorna irányába osztódjanak.

A mikrofluidikai mérések során számos nehézséggel kerültem szembe. Az egyik váratlan esemény az volt, hogy a sejtek a csapdákban nem nőttek. Ennek az okát keresve végeztem az élesztőkön a nyomástartást. Ebből az derült ki, hogy a nyomás csak lassítja sejtosztódást. Arra a következtetésre jutottam, hogy a nyíróerő okozta stressz miatt nem nőnek az élesztők. Másik akadály a csatorna eltömődése volt. A mikrofluidikai eszköz csatornájának rövidítésével javult a helyzet, de nem tudtam még teljesen kiküszöbölni a problémát. Ezek az eredmények jó támpontot adnak a további mikrofluidikai kísérleteimhez.

8.2.Jövőbeli tervek

A jövőbeli terveim köze tartozik a mikrofluidikai eszközök optimalizálása, és továbbiak fejlesztése, hogy az eddigi 2-3 nap helyett 4-5 napig tudjunk méréseket végezni, mivel a teljes életciklus csak akkor figyelhető meg, ha hosszú távon tudunk mérni.

Szeretném a mikrofluidikai protokollt különböző élesztőtörzsekre igazítani. Több mérést tervezek végezni a most használt BY4743 és W303 törzsekkel, hogy több adattal tudjak dolgozni, és így pontosabb következtetéseket tudjak levonni. Labor és vad törzseket egyaránt érdemes lenne bevonni a mérésekbe, hogy összehasonlíthassam a különböző törzsek életciklusát.

Az élesztőben található fehérjéket is jelölhetnénk fluoreszcensen, hogy azok expresszióját tudjam figyelni. Ilyen fehérjék lehetnek a különböző stresszfehérjék. Korábban jelöltek már többek között Whi5 fehérjét, ami a sejtciklus fázisait mutatja [29].

Érdekel az öregedés folyamatának vizsgálata. A későbbiekben olyan méréseket is végeznék, amelyek során a mikrofluidikai cellában lévő élesztőket különböző öregedést elősegítő hatásnak tennék ki, például hidrogénperoxid, UV fény, potenciális gyógyszer hatóanyagok. Ezzel figyelhetném, hogy ezek a behatások milyen változásokat eredményeznek az élesztősejtek életciklusában.

A folyamatok során keletkező nagy mennyiségű képanyag feldolgozása időigényes feladat, ezért hasznos lenne a képelemzés automatizálása.

9. Összefoglalás

A kutatásom folyamán áttekintést kaptam az élesztők életciklusáról, és a sejtöregedésről. Megismerkedtem, hogy az évek folyamán milyen mikrofluidikai eszközöket használtak az élesztők életciklusának megfigyelésére. A laborban végzett munka során tapasztalatot szereztem számos, élesztőkkel kapcsolatos molekuláris biológiai laboratóriumi folyamatban.

Az élesztősejtek kutatásának jelentőségét abban látom, hogy mint modellorganizmus, lehetővé teszi a sejtöregedés vizsgálatát.

A munkám főbb eredményei: élesztők jelölése egy illetve két fluoreszcens fehérjével (mCherry, GFP), élesztők megfigyeléséhez szükséges mikrofluidikai eszközök tesztelés és fejlesztés, mérési protokollok elkészítése, az élesztősejtek replikatív életciklusának megfigyelése és dokumentálása fotókkal.

Az egyetem Biomikrofluidikai Kutatócsoportja által tervezett eszközök közül hattal végeztem tesztelést. A tapasztalataim alapján tettem javaslatot a további módosítási lehetőségekre. A fejlesztések iránya pozitív, de még dolgozni kell azon, hogy hosszútávú méréseket tudjunk végezni. Ez azért fontos, hogy teljes replikatív élettartam vizsgálatára alkalmas legyen az eszköz.

Összességében elmondhatom, a kezdetben eltervezett lépéseket megvalósítottam, ami alapot ad a jövőbeli mikrofluidikai kísérleteimhez. A felmerülő technikai nehézségek ellenére a mikrofluidikai mérésekből kapott eredmények kutatás folytatására motiválnak.

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Gaizer Tünde Évának és Dr. Csikász-Nagy Attilának a témavezetést, a sok segítséget és biztatást a dolgozatom elkészítése közben. Szeretném még megköszönni Pillér Báborka és Szakadati Helga laboratóriumban nyújtott segítségét. Köszönettel tartozom Dr. Laki Andrásnak és Laki Máriának a mikrofluidikai eszközök tervezéséért és legyártásáért. Végül szeretném megköszönni a családomnak a folyamatos támogatást.

11. Irodalomjegyzék

- [1] F. Sherman, “Getting started with yeast,” *Methods Enzymol.*, vol. 350., p. 3–41., 2002.
- [2] D. Botstein and G. R. Fink, “Yeast: An experimental organism for 21st century biology,” *Genetics*, vol. 189., p. 695–704., 2011.
- [3] C. P. Kurtzman and J. Piškur, “Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts,” *Top. Curr. Genet.*, vol. 15., p. 29–46., 2006.
- [4] J. A. Simon, “Yeast as a model system for anticancer drug discovery.,” *Expert Opin Ther Targets*, 2001.
- [5] K. S. Korolev, J. B. Xavier and J. Gore, “Turning ecology and evolution against cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14., p. 371–380, 2014.
- [6] I. Herskowitz, “Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Microbiological reviews*, vol. 52, p. 536–553, 1988.
- [7] A. S. Howell and D. J. Lew, “Morphogenesis and the cell cycle,” *Genetics*, vol. 190, no. 1, pp. 51-77, 2012.
- [8] J. E. Haber, “Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Genetics*, 2012.
- [9] C.-G. D and B. S., “The many ways to age for a single yeast cell,” *Yeast*, vol. 31, 2014.
- [10] M. G. Mirisola, R. J. Braun and D. Petranovic, “Approaches to study yeast cell aging and death,” *FEMS Yeast Research*, 2014.
- [11] D. A. Lippuner, T. Julou and Y. Barral, “Budding yeast as a model organism to study the effects of age,” *FEMS Microbiol Rev.*, 2014.
- [12] S. N. Mouton, D. J. Thaller, M. M. Crane, I. L. Rempel, O. T. Terpstra, A. Steen, M. Kaeberlein, C. P. Lusk, A. J. Boersma and L. M. Veenhoff, “A physicochemical perspective of aging from single-cell analysis of pH, macromolecular and organellar crowding in yeast,” *Elife*, 2020.
- [13] T. N. Campbell and F. Y. Choy, “The Effect of pH on Green Fluorescent Protein: a Brief Review,” *Molecular Biology Today*, vol. 2., 2001.
- [14] N. C. Shaner, G. H. Patterson and M. W. Davidson, “Advances in fluorescent protein technology,” *Journal of cell science*, vol. 120, 2007.
- [15] G. P. Doherty, K. Bailey and P. J. Lewis, “Stage-specific fluorescence intensity of GFP and mCherry during sporulation In *Bacillus Subtilis*,” *BMC research notes*, vol. 3, 2010.
- [16] M. C. Jo and L. Qin, “Microfluidic Platforms for Yeast-Based Aging Studies,” *Small*, vol. 12., no. 42., p. 5787–5801, 2016.
- [17] Y. Zhang, C. Luo, K. Zou, Z. Xie and O. Brandman, “Single Cell Analysis of Yeast Replicative Aging Using a New Generation of Microfluidic Device,” *PLoS One*, vol. 7, 2012.
- [18] J. Ryley, P. Smith and M. Olivia, “Microfluidics device for single cell gene expression analysis in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Yeast*, 2006.

- [19] M. M. Crane, I. B. N. Clark, E. Bakker, S. Smith and P. S. Swain, “A Microfluidic System for Studying Ageing and Dynamic Single-Cell Responses in Budding Yeast,” 2014.
- [20] D. H. Huberts, S. S. Lee, J. Gonz  les, G. E. Janssens, I. A. Vizcarra and M. Heinemann, “Construction and use of a microfluidic dissection platform for long-term imaging of cellular processes in budding yeast,” *Nat Protoc.*, 2013.
- [21] Z. Xie, Y. Zhang, K. Zou, O. Brandman, C. Luo, Q. Ouyang and H. Li, “Molecular phenotyping of aging in single yeast cells using a novel microfluidic device,” *Aging Cell*, vol. 11, p. 599–606., 2012.
- [22] S. S. Lee, I. A. Vizcarra, D. H. E. W. Huberts, L. P. Lee and M. Heinemann, “Whole lifespan microscopic observation of budding yeast aging through a microfluidic dissection platform,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 109, p. 4916–4920., 2012.
- [23] P. Liu, T. Z. Young and M. Acar, “Yeast Replicator: A High-Throughput Multiplexed Microfluidics Platform for Automated Measurements of Single-Cell Aging,” *Cell Rep.*, vol. 13, p. 634–64, 2015.
- [24] E. A. Sarnoski, R. Song, E. Ertekin, N. Koonce and M. Acar, “Fundamental Characteristics of Single-Cell Aging in Diploid Yeast,” *iScience*, vol. 7, pp. 96-109, 2018.
- [25] W. P. Voth, J. D. Richards, J. M. Shaw and D. J. Stillman, “Yeast vectors for integration at the HO locus,” *Nucleic Acids Res.*, 2001.
- [26] R. Maslanka, M. Kwolek-Mirek and R. Zadrag-Tecza, “Autofluorescence of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells caused by glucose metabolism products and its methodological implications,” *Journal of Microbiological Methods*, vol. 146, pp. 55-60, 2018.
- [27] R. D. Gietz and R. H. Schiestl, “High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method,” *Natural*, 2007.
- [28] C. Huxley, E. D. Green and I. Dunham, “Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR,” *Trends Genet.*, 1990.
- [29] D. F. Moreno, K. Jenkins, S. Morlot, G. Charvin, A. Csikasz-Nagy and M. Aldea, “Proteostasis collapse, a hallmark of aging, hinders the chaperone-Start network and arrests cells in G1,” *Elife*, 2019.

12. Mellékletek

1.melléklet: Felhasznált primer pár szekvenciák

A tervezett primerpár:

HO_URA_fw	5' GCACGAGATCTGGATCCCATAGCTTCA 3'
HO_URA_rev	5' GCACGAGATCTGACGAGGCAAGCTAA 3'

Élesztő transzformálásához használt primerpár:

HOplazmid_kulso_F5	5' TGGGCACGAGTGAAACAAAG 3'
HOplazmid_kulso_R5	5' GCCACTGTAAGATTCCGCCA 3'

2. melléklet: PCR protokoll

HO-mCherry6-KanMx plazmiddal HO_URA_fw, HO_URA_rev primerekkel. Jégen dolgozunk. A megfelelő mennyiségű komponenseket keverjük bele a Master Mixbe

	50µl
Phusion Hot Start DNS polimeráz	0,5µl
dNTP (10 mM)	1µl
5xHF buffer	10µl
Primer mix	2µl
dH ₂ O	34,5µl
Templát	2µl

. A végén adjuk hozzá az enzimet. A PCR csőbe mérjük bele a megfelelő mennyiséget a Master Mixből. Helyezzük a PCR csöveket a PCR gépbe és indítsuk el a megfelelő programot.

3. melléklet: PCR protokoll

HO-hisG-URA3-hisG-poly-HO plazmiddal plazmid_kulso_F5, HOplazmid_kulso_R5 primerekkel. Jégen dolgozunk. A megfelelő mennyiségű komponenseket keverjük bele a Master Mixbe.

	50µl
DreamTaq enzim	0,25µl
dNTP (10 mM)	1µl
10x DreamTaq buffer	5µl
Primer mix	0,5µl
dH ₂ O	41,25µl
Templát	2µl

A végén adjuk hozzá az enzimet. A PCR csőbe mérjük bele a megfelelő mennyiséget a Master Mixből. Helyezzük a PCR csöveket a PCR gépbe és indítsuk el a megfelelő programot.

4.melléklet: Élesztő transzformáció protokoll

Yeast transformation [based on: Gietz and Sciestl Nature 2007, 2(1):31-34]

REAGENTS:

- YPD:
 - 60 ml x strains
 - 1% Yeast Extract, 2% Peptone, 2% glucose (only for few strains if necessary: add adenine hemisulfate 80mg/l)
- Lithium acetate (1.0M):

- Dissolve 10.2g of lithium acetate dihydrate in 100ml of water. Autoclave or filter. Store at RT.
- PEG MW 3350 (50% w/v):
 - Add 50g of PEG 3350 to about 30ml of distilled/deionized water in a 150ml beaker. Stir until it dissolves. Use a hot plate to gently warm the solution if necessary. Make up the volume to 100ml and mix thoroughly. Autoclave or filter. Store at RT well sealed to avoid evaporation. Prepare fresh liquid PEG every few months.
- Single-stranded carrier DNA (2mg/ml):
 - To prepare: Dissolve 200mg of salmon sperm DNA in 100ml of sterile TE (10mM Tris-HCl, 1mM Na₂EDTA, pH8.0) using a magnetic stir plate at 4°C. This should take up to a few hours. One can speed up the dissolution by drawing the DNA up and down a wide bore 25ml pipette until no visible DNA is seen. There is no need to sonicate the carrier DNA. Dispense 20 samples of 1.0ml into 1.5ml tubes and the remainder in 5ml samples. Store at -20°C. Denature the carrier before use. Denatured carrier DNA can be boiled three or four times without significant loss of activity.
 - **Before each use: boil a 1.0 ml sample of carrier DNA for 5 min** (benchtop thermostat 95°C) and chill in an ice/water bath while harvesting the cells. ****
Keep a small aliquot in your own freezer box and boil after 3-4 freeze-thaws.
But keep on ice when out.*****
- YPD plates

PROTOCOL:

PRECULTURE (DAY BEFORE TRAFO)

- Grow cells ON in 5ml YPD, shaking ~180 rpm

GROW TO EXPONENTIAL PHASE AND WASH CELLS

- Count cells and inoculate in 50ml YPD to have 5×10^6 cells/ml
 - (better work in duplicate)
 - Usually 1-1.5 ml to have 2.5×10^8 cells in total
- Count cells until they reach concentration= 2×10^7 cells/ml
 - Check after 2 hours, most strains need 2.5-3
- Centrifuge 5' RT 1000g in 50ml falcon,
- Remove supernatant and resuspend in 25ml sterile H₂O

- Centrifuge as before.

PREPARE FOR TRAFO

- Transfer in 2ml tubes
- Centrifuge 15'' at 6000-8000rpm. Remove ALL the supernatant
- Add 400ul sterile H₂O
 - or volume to have 2×10^9 cells/ml (if they grew to more than 2×10^7 cells/ml in step 2, add proportionally more water!)
- Resuspend and count cells
- Transfer 120ul cell suspension for each transformation in different tubes.
- Centrifuge 10'' at 6000-8000rpm and remove ALL the supernatant, do NOT touch the pellet
- In the meantime, prepare TRAFO solution. Prepare the benchtop thermostat to 42°C

	Stock concentration	x1 reaction (ul)
PEG 3600	50% w/v	240
LiAc	1M	36
Boiled HS-ssDNA	2mg/ml	50
(Sterile H₂O) optional		(29)
Total volume		355 (326)

TRAFO

- Add 355ul TRAFO to cell pellet
- Add the DNA to be transformed (volume up to 10ul or 39 if you left out water)
- Vortex at high speeds until pellet resuspension (#30''). Incubate 40' at 42°C
- Centrifuge 15'' at 6000-8000rpm. Remove ALL the supernatant
- Add 1ml pre-warmed YPAD and resuspend GENTLY
- Transfer in pre-warmed tube and keep in agitation at 28-30°C 2-3hours (or ON)

SPREAD CELLS

- Spread cells in YPD supplemented with the antibiotic (or drop-out plate as needed):
 - 100ul dilution 1:10 – works if transformed with plasmid
 - 200 ul if integrative transformation
 - Optional to also spread the 800ul TQ (concentrate before plating)
- Spread cells onto the plate VERY GENTLY!!!!. Incubate 2-3 days, RT or 30°C

5. melléklet: Mating PCR protokoll

Jégen dolgozunk. A megfelelő mennyiségű komponenseket belekeverjük a Master Mixbe. Az enzimet a legvégén adjuk hozzá. Abból a telepből, amelynek a párosodási típusát szeretném meghatározni egykeveset a PCR csőbe raktam.

Abból a telepből, amelynek a párosodási típusát szeretném meghatározni egykeveset a PCR csőbe raktam. Ezt követően az élesztőket a 1,5 percig mikróhullámú sütőbe helyeztem, hogy roncsoljam a sejteket.

	20µl
DreamTaq enzim	0,1µl
dNTP (10 mM)	0,4µl
10x DreamTaq buffer	2µl
Primer mix	1µl
dH2O	16,5µl

Mérjük rá 20µl-t a Master Mixből, majd helyezzük a PCR gépbe a csöveket és indítsuk el a megfelelő programot.

6.melléklet: Mikrofluidikai protokoll

Mikrofluidikai protokoll:

3-4 nappal korábban: törzseket vegyük fel -80°C-ról

Előző nap:

- 2 ml SD-ben (lehetőleg szűrt SD) előkultúrát kell készíteni törzsekből. Rázatón, ON inkubátorban (szobahőmérsékleten is jó) növesztjük.

Mérés napján:

- Szükséges eszközök előkészítése:
 - pumpa
 - 2db 10ml fecskendő tápnak, 2db 2ml fecskendő élesztőhöz
 - szűrt SD a méréshez
 - geneticines víz
 - főzőpohár(etanollal)
 - kuka
 - mikrofluidikai cella
- **50x hígítást készítünk** az előkultúrákból SD-vel, fülke alatt Eppendorf csőbe (1ml).
- 2ml fecskendőbe szívjuk fel a 1-1,5ml geneticines desztillált vizet (legyen hely a visszaszíváshoz)
- 10ml fecskendőbe szűrt SD-t szívunk fel (12ml-ig érdemes).
- **A fluoreszcens mikroszkóp indítsa** (204-es labor)

Sorrend: 1.számítógép + mikroszkóp programja,2.fekete doboz, 3.mikroszkóp oldalán lévő doboz,4.nagy fehér doboz, 5.lapos fehér doboz,6.magas fehér doboz + ignition, ha kell a fluoreszcencia is

- Alkohollal töröljük át a felületeket és a használandó tárgyakat (zöld vágódeszka, Gillette penge, csipesz...)

Mérés összeállítása:

- Vágjunk megfelelő számú és hosszú **teflon csöveket** a zöld vágódeszkán Gillette pengével.
- Illesszük be a mikrofluidikai cella végébe a kivezető tefloncsöveket, amit hozzárögzítünk és **főzőpohárhoz**. A főzőpoharat rögzítsük a tárgyasztalhoz.
- Helyezzük be a mikrofluidikai cellát a mikroszkópba.
- Keressük meg szemmel, majd állítsuk át a jobboldali kamerára, hogy a gépen élőképet lássuk (Dia2) (fedőlemezes megoldás esetén óvatosan törjük le a szélélt befogás előtt).
- Ellenőrizzük, hogy a cella megfelelő-e, nincsenek-e hibák benne.
- Szükség esetén a cellát is rögzítsük a mikroszkóp tárgyasztalához.
- Állítsuk be pumpákon a diamétert: 2ml-es fecskendőnél: 9.68mm, 5ml-es fecskendőnél: 12.6mm, 10ml-es fecskendőnél: 16.0mm.

Tápoldat betöltése:

- A vizes és a tápoldatos fecskendőket helyezzük a pumpákba. Ügyelni kell, hogy a lehető legkevesebb buborék legyen a rendszerben.
- Kössük össze tefloncsövekkel a fecskendőket a mikrofluidikai cellával, ne maradjon kimenet vagy bemenet üresen.
- Indítsuk el a tápoldatos fecskendők pumpáját 40-50µl/min térfogatárammal.
- Várjunk addig, míg a tápoldat teljesen kitölti a csatornát, és a kimenet tefloncsövén elkezd kicsepegni a tápoldat.
- Szükség esetén növeljük a térfogatáramot. Végül állítsuk le a pumpákat.

Élesztők betöltése:

- Húzzuk ki a vizes fecskendő tefloncsövét a mikrofluidikai cellából. Állítsuk be a vizes fecskendők pumpáját 'withdraw' üzemmódba.
- Szívjuk fel a 50x-re kihígított előkultúrát 30µl/min árammal a tefloncső kb ¾-ig, majd állítsuk vissza a pumpát az eredeti módba.
- Dugjuk vissza a tefloncsövet a bemenetbe, ügyelve, hogy a lehető legkevesebb buborék kerüljön a rendszerbe.
- Állítsuk be a tápoldat áramát 5µl/min-re, az élesztő áramát 30µl/min-re. Indítsuk el a pumpákat (először a tápoldatosat). Hagyjuk így 2-3 percig és figyeljük a csapdák töltöttségét.

- Ezután állítsuk a tápoldat áramát 20 μ l/min-re, az élesztő áramát 30 μ l/min-re, hogy kimossuk a felesleges élesztőket 5-10 percig.

Mérés elindítása:

- Állítsuk be az ON térfogatáram tápoldat: 1 μ l/min, vizes: 0.1 μ l/min
- Engedjük le a fekete függönyöket. Állítsuk be a mérési pontokat és a fókuszt (próbáljunk a pontok között ugrálni, hogy lássuk, nem megy-e el a fókuszt vagy a csatorna), a dia és a fluoreszcens beállításokat és azt, hogy milyen időközönként szeretnénk képet csinálni. Nézzünk meg próbának 1 loop.
- Indítsuk el a mérést. Nézzünk a mérésre rá 3-4 loop után.
- Windows update pause-olása a mérés során.
- Ha több napig futtatjuk a mérést, akkor minden nap rá kell nézni. Ha eldugultak a csatornák akkor kb. 50 μ l/min térfogatárammal (5-10 percig) mossuk át.
- Jegyzeteljünk le mindent a méréssel kapcsolatban. (főleg, ha eltérünk a protokolltól).

Mérés szétzúzása:

- Állítsuk le a mérést és mentjük le a fájlok közé. Kapcsoljuk ki a gépet.
- Állítsuk le és kapcsoljuk ki a pumpákat.
- Kapcsoljuk ki a mikroszkóp minden részét. Takarjuk le a mikroszkópot.
- Szedjük szét a mérési összeállítást. Dobjuk ki a részeket.
- Pakoljunk el minden használt eszközt. Alkoholos kendővel töröljük át a felületeket.
- Forraljuk ki a főzőpoharat és mossuk el.