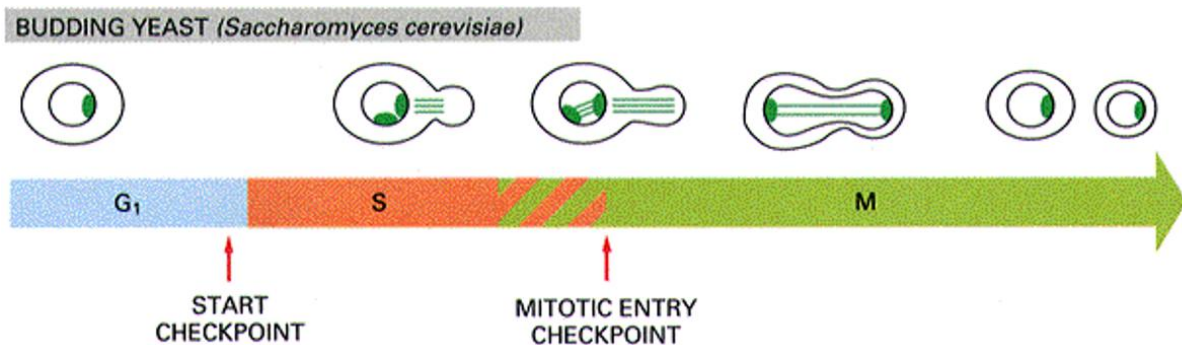


Az élesztőgombák, mint a sejtciklus modellorganizmusai; szinkronizálási eljárások.

A közöséges pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*)

Az *S. cerevisiae* a legismertebb eukarióta modellszervezet, ipari felhasználása is jelentős: az élelmiszeriparban élesztőként használják kenyér- illetve szeszesitalgyártásban.

A pékélesztő a **sarjadzó élesztők** közé tartozik. Alakja **ovális**, osztódásakor egy az anyasejtnél jóval kisebb **sarjsejt** válik le (**aszimmetrikus** osztódás), aminek lényegesen **hosszabb G₁-fázisa** van, mint az anyasejtné, hiszen meg kell nőnie. Az anyasejten **osztódási heg** marad, a hegek száma a sejt korát jelzi, és ha sokat osztódott az anyasejt, elpusztul.



From The Art of MBoC³ © 1995 Garland Publishing, Inc.

A sejt **G₁-fázisban méretellenőrzést** tart (startpont).

S-fázis alatt szeptin fehérjék kijelölik a sarjsejt helyét, ahonnan elkezdi kinőni a sarj.

A *S. cerevisiae*, mint a gombák általában, **zárt mitózissal** osztódik. Ez azt jelenti, hogy az **M-fázis alatt nem bomlik fel a sejtmag**, hanem benne válik ketté a genom. Ehhez egy speciális centroszómára van szükség, ami beágyazódik a sejtmagburokba, így képes a magon belül is mikrotubulusokat növeszteni. Ezt a speciális centroszómát **magorsótestnek** nevezzük.

Nincs G₂-fázis, sőt az **S- és az M-fázis átlapolnak kicsit**. Ez azért lehetséges, mert a mitózis zárt, a magorsórendszer kialakulhat miközben az S-fázis még folyik, hiszen nem kell lebontani a sejtmagot.

Először a sejtmag osztódik, utána a sejt.

Hartwell kísérlete:

Feltételes mutánsokat hozott létre, melyek a környezettől függően tudnak osztódni. **Lederberg-féle replika módszerrel** (steril bársonylappal) kétfelé választotta, majd különböző hőmérsékleten szaporította őket.

Bizonyos sejtekből mindkét esetben fejlődtek telepek, ezek hőmérséklettűrés szempontjából nem tekinthetők mutánsnak. A másik csoport csak (magyarázat lent) permisszív hőmérsékleten voltak képesek telepet képezni.

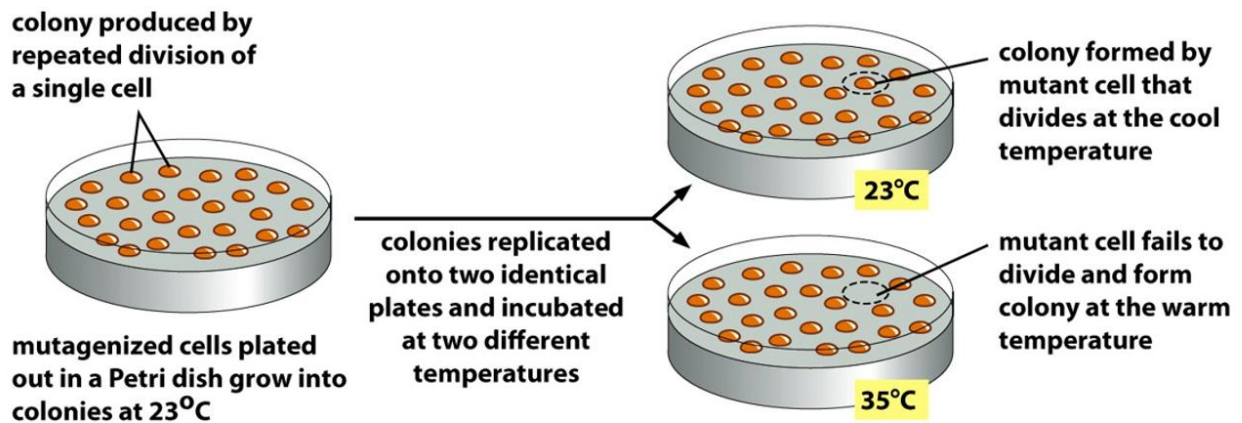


Figure 1-35 *Essential Cell Biology* (© Garland Science 2010)

Az egyik mintát $\sim 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tenyésztette, így tudtak osztódni (**permisszív hőmérséklet**).

A másikat $\sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tenyésztette, ebben a környezetben a mutáns sejtek nem tudnak osztódni, addig nőnek, míg ki nem hasadnak (**restriktív hőmérséklet**).

A mutánsokat **cdc-mutánsok**nak nevezte el, és mivel **hőmérsékletérzékenyek** így jelölte őket pl.: cdc1^{ts} (temperature sensitive).

Tranzíciós pont: az a pontja a sejtciklusnak, ahol a **permisszív** hőmérsékletet **restriktív**re emelve **megreked** a **sejtciklus**. A pont egy **0 és 1 közötti arányszám**, a ciklus azon hányada, ahol elakad.

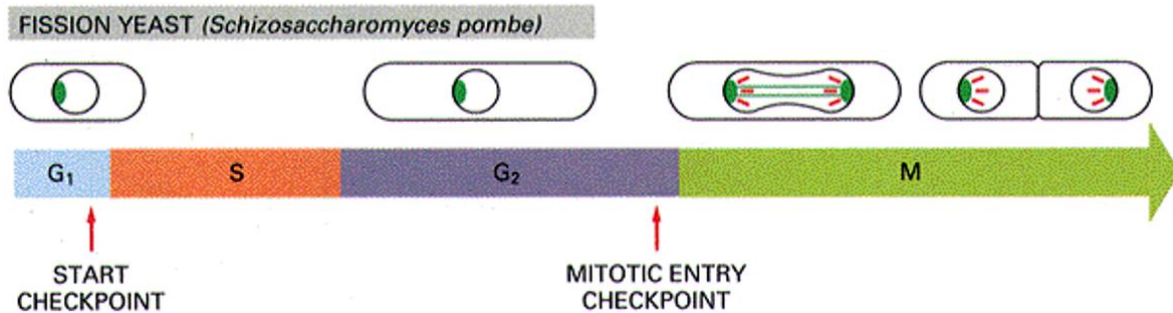
Bizonyos fehérjéknek **több tranzíciós pontja** van (többször van rájuk szükség a ciklus során).

Aszinkron tenyésztésnél (a fogalom magyarázata alább) bizonyos sejtek a startpont előtt tartottak ciklusukban, mások már elhagyták azt, tehát két generációs idő után a sejtciklus ugyanazon pontjába érkeznek meg a sejtek, mert megáll a sejtciklusuk.

Ezután a **vadtípus** genomját egyes géneket tartalmazó plazmidokra bontotta fel, majd ezeket egyesével beadta mutánsoknak. Ez a **fajon belüli komplementációs kísérlet** (a faj más egyedéből visz be gént a megmentéséhez). Kb. **30** olyan **gént** azonosított, amik valamelyik mutáns sejtciklusát **újraindította** a restriktív hőmérsékleten is, ezeket **cdc-knek** nevezte el. Ezekből, a pékésztő sejtciklusszabályozó génjeiből egy **plazmidkönyvtár**at állított össze, hogy mindig legyen kéznél cdc a kutatásokhoz.

A hasadó élesztő (*Schizosaccharomyces pombe*)

A gombákra nem jellemző módon ez az élesztő hasadással, **szimmetrikus osztódással** szaporodik. Legömbölyített végű pálca alakú sejtjei vannak, a bacillusokhoz hasonló sejtalakkal. A sejt az egyik végén **megnyúlik** (csak a végein tud nőni), majd **elosztódik**. A két utód ezután azonos ciklusban lesz (tehát jól szinkronizálható).



G₁-fázisa rövid, a végén nincs méretellenőrzés.

A **G₂-fázis** hosszú, a méretellenőrzés ennek a végén van.

Nurse kísérlete:

Nurse megcsinálta **Hartwell kísérletét hasadó élesztőkkel**. Az ő élesztőmutánsai jellemzően nagyon megnyúltak és nem tudtak osztódni, de olyat is talált, ami feleakkora méretű lett és úgy osztódott. Az apró mutánt **Wee mutánsnak** nevezte el.

Hartwellhez képest az volt az újítása, hogy a **hasadó élesztő mutánt pékélesztő plazmiddal próbált megmenteni** és vissza (fajok közötti **komplementáció**), és ez néhány esetben sikerült. Ennek tanulsága: különböző eukariótákban azonos néhány sejtciklusfehérje (pl.: Cdk1), nemcsak élesztőkben, de az eukariótákban **általában**. Tehát **univerzálisan konzervált**.

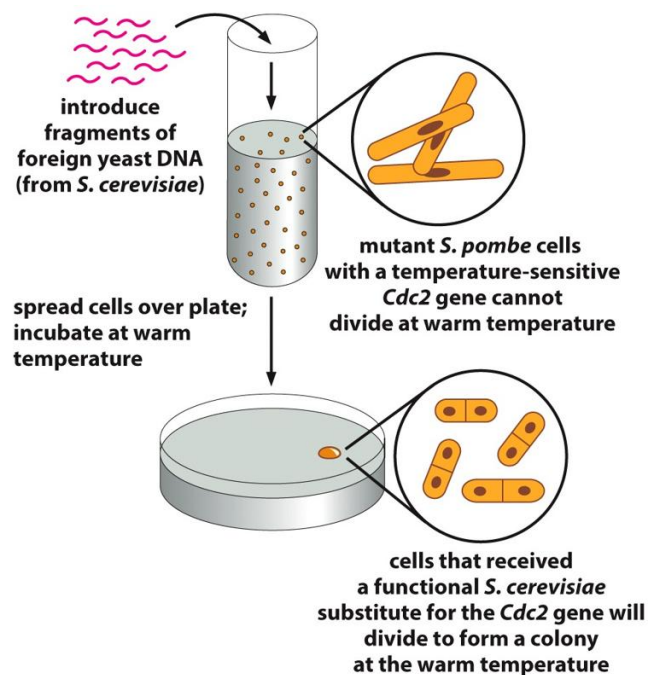


Figure 1-35 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

DNS kódfejtéses kutatások alapján különböző fajok **Cdk1**-ei között **legalább 60% azonosság** van.

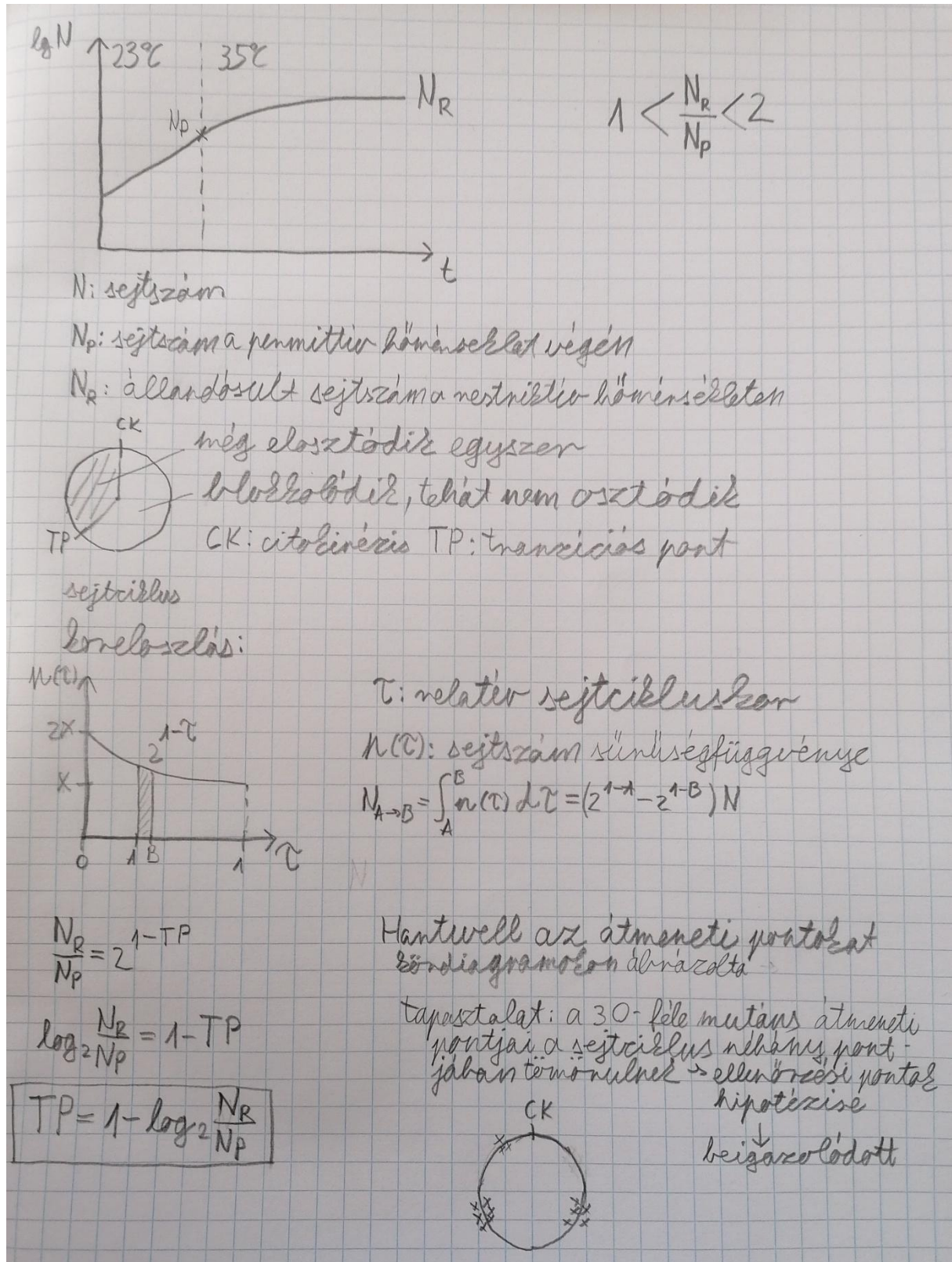
```

human    ...FGLARAFGIPIRVYTHEVVTLWYRSPEVLLGSARYSTPVDIWSIGTIFAELATKLPFLPHGDSEIDQLFRIPRALGTPNNEVWPEVESLQDYKNTFP...
S. pombe ...FGLARSPGVPLRNYTHEIVTLWYRAPEVLLGSRHYSTGVDIWSVGCIFAENIRRSPLFPDSEIDEIFKIPQVLGTPNEEVWPGVTLQDYKSTFP...
S. cerevisiae ...FGLARAFGVPLRAYTHEIVTLWYRAPEVLLGQKRYSTGVDTWISIGCIFAHECNRLPIFSGDSEIDQIFKIPRVLGTPNEAIWPDIVYLPDFKPSFP...
    
```

Figure 1-36 Essential Cell Biology, 4th ed. (© Garland Science 2014)

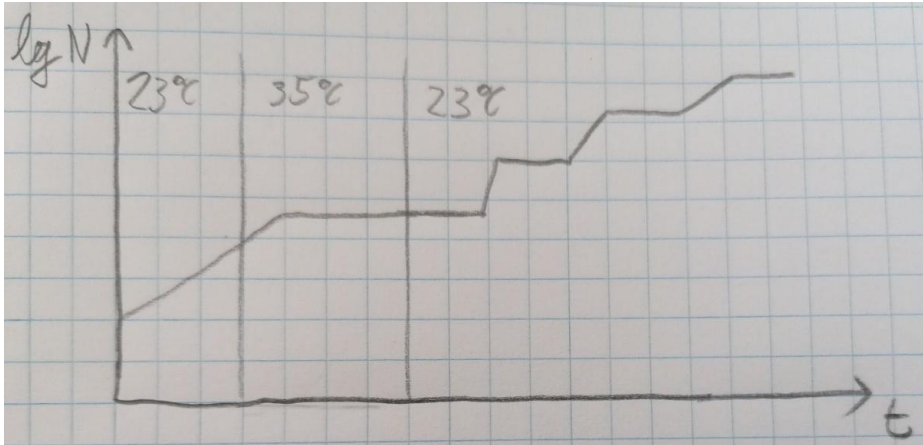
Átmeneti pont meghatározása

Egy exponenciális fázisú aszinkron tenyésztésben:



Szinkronizálási technikák

Szinkrontenyészet: a sejtek sejtciklusuk ugyanazon pontján tartanak (vö.: korai embriók). Ha alapvetően nem szinkron sejteket akarunk szinkronizálni, a szinkronizált sejtek néhány cikluson keresztül nagyjából egyszerre fognak osztódni, majd újra **aszinkronizálódnak** a ciklusidők közötti kis eltérések miatt.



Aszinkron tenyészet: a sejtek sejtciklusuk bármely pontján lehetnek.

Indukciós:

A ciklust meghatározott ideig (kb. **1,5-2 generációs időn keresztül**) blokkoljuk egy ponton, majd engedjük a további szaporodást (túl hosszú T_g -jű sejtek belepesztulnak). Ezt megtehetjük pl.: hőmérsékletmutásokkal, S-fázis gátlással (hidroxikarbamid), a sejtciklus valamely pontján szükséges tápanyag megvonásával vagy inhibítorral.

A módszer hátránya, hogy nincs aszinkron kontroll, nem tudjuk ugyanannak a csoportnak a másik felét aszinkron módon ellenőrizni. Ezenkívül nagy a sejtekre gyakorolt élettani hatása.

Szelekciós:

Ilyenkor kiválogatjuk az azonos korú sejteket. Mivel ez legegyszerűbben méret alapján történik, a szinkrontenyészetbe jellemzően a legfiatalabb sejtek kerülnek, a maradék alkalmas aszinkron kontrollnak. A művelet végezhető szűréssel, centrifugálással vagy **elutriációval**.

