

SZAKMAI ZÁRÓJELENTÉS

(OTKA K-76229)

A K-76229 sz. OTKA projekt (KM2 zsűri) teljes futamideje kétszeri hosszabbítás után 2008. december 1-től 2014. március 31-ig tartott. E hosszú periódus alatt számos (többször kényszerű) személyi változás történt, ami a kutatási projekt témaköreiben is jelentős változásokat okozott. A szakmai zárójelentésben először ezeket a folyamatokat ismertetjük, majd részletesen beszámolunk az egyes kutatott témakörökben elért eredményekről, végül felsoroljuk a kutatás támogatásával készített vagy folyamatban levő szakkikket és könyvfejezeteket.

A projekt személyi állománya és a kutatott témakörök

2008 decemberében a projekt indulásakor három kutató dolgozott a témán: a témavezető mellett Kapuy Orsolya és Tóth Attila. 2009-ben kutatócsoportunkból utóbbiak mindketten eltávoztak: Kapuy Orsolya az Oxfordi Egyetemen Novák Béla professzor mellett lett posztdoktor, Tóth Attila pedig szintén munkahelyet változtatott. Kettőjük helyett a korábban egyetemi hallgatóként is már részt vevő Rácz-Mónus Annát sikerült 2009 őszén doktoránsként is bevonni a pályázatba, azonban a hallgatókat nem számítva ez azt jelentette, hogy mindjárt az első évben háromról kettőre csökkent a kutatói létszám. Ez így is maradt Rácz-Mónus Anna doktori ösztöndíjának lejártáig, pontosabban Anna gyermekvállalása miatt 2012 májusig. Az azt követő 8 hónapban kutatóként egyedül a témavezető dolgozott ezen a projekten. 2013 februárjától Horváth Anna (korábban hallgatói résztvevő) lett doktoráns, ezáltal a kutatói létszám ismét kettő lett, és annyi is maradt végig a zárásig. Az eddig felsoroltakon kívül hallgatóként hosszabb-rövidebb ideig az alábbi BME biomérnök diákok vettek még részt kutatásainkban: Árokszállási László, Mészáros Csilla, Németh Márton, Vida Nóra, Vörös Eszter.

A csoporton belüli többszöri személyi átrendeződések mellett az induláskor meglévő külső (többnyire nemzetközi) kapcsolatok is jelentős változásokon mentek keresztül. Folyamatosan együttműködtünk Buchwald Péterrel (University of Miami, Florida, USA) a tervek szerint, ezzel szemben sajnos Novák Bélával (University of Oxford, UK), és Csikász-Nagy Attilával (University of Trento, Olaszország) fokozatosan megszűnt a szakmai kapcsolat. Murdoch Mitchison (University of Edinburgh, UK) pedig megbetegedett, majd 2011-ben elhunyt. Új együttműködést sikerült viszont kialakítanunk Sipiczki Mátyással és Gálné Miklós Idával (Debreceni Egyetem, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék). Ennek keretében a hasadó élesztő sejtosztódásában résztvevő egyes proteinek bioinformatikai analízisével is foglalkozni kezdtünk, részben már egy következő OTKA pályázat előkészítése céljából.

A fenti változások kutatócsoportunk szerkezetében és külső kapcsolatainkban jelentősen módosították a kutatási területeket is. A hasadó élesztőgomba sejtciklusának

matematikai modellezése lett volna a domináns terület az eredeti elképzelések szerint, ez azonban jelentősen visszaszorult. Helyette legfontosabb eredményeinket az eredeti tervekben a második helyen szereplő téma vette át, azaz a hasadó élesztő mikroszkópos filmjein a sejtek növekedésének vizsgálata modell illesztések és statisztikai alapú modellszelekció segítségével, valamint a sejtekben működő méretkontroll mechanizmusok tanulmányozása regressziós analízisek révén. Fontos eredménynek tekinthető, hogy felkérésre írhattunk két könyvfejezetet a Springer kiadó által megjelentetett Encyclopedia of Systems Biology c. kötetbe [1], [2]. Ezek a közlemények az OTKA támogatásával készültek el, de nem rendelhetők hozzá egyértelműen valamelyik alább ismertető témához. A pályázat futamideje alatt eredményeinket számos hazai és nemzetközi konferencián prezentáltuk előadás vagy poszter formájában, illetve azok rövid absztraktjai folyóiratokban is megjelentek. Az ilyen jellegű közleményeink száma harminc, és a teljes publikációs jegyzékben valamennyi megtalálható.

(1) A hasadó élesztőgomba sejthosszának ciklus alatti növekedése (modell illesztés)

Az egysejtű haploid hasadó élesztőgomba sejthossza monoton nő a mitózisos ciklus első 70-80%-ában. A henger alakú sejtek átmérője első közelítésben konstansnak tekinthető, ezért a sejthossz egyenesen arányos a térfogattal, így time-lapse mikroszkópos filmekben jól tanulmányozható a sejt méret alakulása egy adott sejt két egymást követő osztódása között. A mikrobapopuláció homeosztatisztikus állapota esetén a méret tipikusan megduplázódik a ciklus során, bár azt fontos hangsúlyozni, hogy ez csak a tenyészet „átlagos” sejtjének viselkedésére jellemző, nem minden egyes egyedi sejtre. Ilyen filmeket készített az 1990-es években Murdoch Mitchison (University of Edinburgh, UK) a hasadó élesztő vad típusú tenyészetéről és számos sejt ciklus mutánsáról, és azok analíziseiből abban az időben több közleményünk is született. Mivel a sejtnövekedés módjára nincs univerzális szabály, de a hasadó élesztő egy kiváló modellorganizmus ezekben a kutatásokban, fontosnak tartottuk a korábbi munkáinkat a módszer fejlesztése mellett újra elvégezni. Egyrészt a filmkockákat sokkal jobban kinagyítottuk, ezáltal a mérési bizonytalanságok jelentősen csökkentek, másrészt a kapott növekedési mintázatokat a Minitab nevű szoftver segítségével futóátlag képzéssel simítottuk is. Ezek után a sejthossz mintázatokra háromféle (lineáris, bilineáris, exponenciális) függvényt illesztettünk, és az egyes függvények paramétereit az Excel program Solver funkciója határozta meg, az optimumot a négyzetes hibaösszeg (SSE) minimuma alapján megkeresve. A lineáris és exponenciális függvények egyaránt kétparaméteresek, míg a bilineáris függvény öt paramétert alkalmaz. Utóbbi ugyanis két lineáris szegmenst jelent, amelyeket egy sebességváltási pont (RCP) választ el egymástól, és az optimalizandó paraméterek között megtalálható az RCP pozíciója is, valamint egy a törés élességére jellemző adat. Kvantitatív modellszelekciós kritériumok segítségével döntöttük el minden egyes sejt esetében, hogy melyik modell a legadekvátabb. Ezek a kritériumok nemcsak az illeszkedés jóságát vizsgálják, mint az SSE, hanem a modellek paraméterszámának eltéréseit

is figyelembe veszik. A használt háromféle kritérium közül a legjobban alkalmazhatónak az Akaike Információs Kritérium (AIC) tűnt, ugyanis vizsgálataink szerint a Schwarz Bayes Információs Kritérium (SBIC) túlzottan szigorú, míg a reziduális szórás (s) pedig nem eléggé szigorú a paraméterek számának súlyozásánál. A bilineárisnak adódott mintázatokra egy kiegészítő analízist végeztünk: a Statistica szoftver Homogeneity of slopes funkciója segítségével igazolni tudtuk, hogy az esetek mintegy 95%-ánál az RCP előtti ill. utáni növekedési sebességek között szignifikáns a különbség (t-próba).

Eredményeink szerint a vad típusú sejtek (60 db) hossznövekedésének mintegy 2/3-a írható le egyértelműen az ötparaméteres bilineáris függvénnyel a legjobban. A többi sejt növekedésére zömmel a lineáris függvény adódott a legadekvátabbnak, míg az exponenciális modell csak nagyon ritkán tűnik alkalmazhatónak. A bilineáris mintázatok mintegy fele élesnek volt tekinthető, a másik fele viszont simának az RCP körüli átmeneti tartomány hosszának elemzése alapján [3]. A populáción belül az egyes sejtek növekedéseinek különbségét véletlen hibák is eredményezhetik, ezért a jövőben további, még precízebb technikákat és vizsgálatokat igényel ennek eldöntése [4]. A diploid vad típusú sejtek nagyobbak ugyan, de növekedési mintázatuk eloszlása hasonló a haploid tenyészetéhez képest, sőt ugyanez az általános következtetés vonható le az általunk vizsgált kis méretű (ún. wee fenotípusú) sejtek populációi kapcsán is, mint pl. a *wee1Δ* és a *cdc2-3w* mutánsok. A vad típusú sejteknél nagyobb haploid mutánsok esetében (*cdc2-3w cdc25Δ* dupla mutáns és *cdc2-3w cdc25Δ pyp3Δ* tripla mutáns) viszont azt figyeltük meg, hogy a lineáris mintázatok aránya a tenyészetben megközelítette a bilineárisokét [5]. Úgy tűnik tehát, hogy a méretnek diszkrimináló hatása van: a nagyobb sejtek a lineáris mintázatot kezdik preferálni, de ez még további vizsgálatokat igényel a jövőben, ezért tervezzük széles mérettartományú indukciós szinkron populációk elemzését is.

(2) A hasadó élesztő sejtciklusában működő méretkontroll mechanizmusok vizsgálata a növekedési mintázatok segítségével

Egy steady-state sejtpopulációban a méret homeosztázisát az biztosítja, hogy a ciklusban létezik minimum egy méretkontrollált esemény, amely csak akkor mehet végbe, ha a sejt a ciklusa során elér egy kritikus méretet. Ez egy kompenzációs mechanizmust eredményez, amely szerint a születéskor nagyobb méretű sejtek ciklusideje rövidebb lesz, mint kisebb társaiké, és ezen rövidebb ciklus alatt kevesebbet is növekednek [1]. Ily módon a sejtek elvileg ugyanannál a méretnél osztódnának, de valójában már csak véletlenszerű hatások miatt is az osztódáskori méretnek kialakul egy jellegzetes eloszlása, amely generációról generációra öröklődik. Az előző (1) pontban ismertetett hasadó élesztőgomba törzsek esetében ábrázoltuk a 60-62 vizsgált sejtre a ciklusidőt (CT), valamint a ciklus alatti hossznövekedést (Ext) a születéskori sejthossz (BL) függvényében, és valamennyi esetben igazolni tudtuk regressziós analízis révén a negatív korrelációt e paraméterek között, ami a méretkontroll létét igazolja [5].

Azon sejtek esetében, amelyek növekedésére a bilineáris függvény adódott a legadekvátabbnak (ld. **(1)** pont), további analízisekre nyílt lehetőség. A sebességváltási pont (RCP) mint marker segítségével a sejtciklus kettébontható egy ún. pre-RCP (első) és egy post-RCP (második) szakaszra. Ezek után mindkét szakaszban külön-külön meg tudtuk vizsgálni, hogy az ottani időtartam (T_1 , ill. T_2) és a hossznövekedés (Ext_1 , ill. Ext_2) negatívan korrelál-e a születéskori sejthosszal (BL). Ahol a negatív korrelációk fennállnak, ott a sejtméretnek hatása van (sizer szakasz), ahol viszont nincs negatív korreláció, ott a méret nem befolyásolja az események lejátszódását (timer szakasz). Tehát ha ismerjük az egyes sejtciklus fázisok helyzetét is, akkor a méretkontroll ilyen módon pozícionálható. A vad típusú (haploid és diploid) sejtek esetében azt tapasztaltuk, hogy a méretkontroll az RCP előtt hat, ami a G2 fázis közepének felel meg, míg a G2 második fele és az M fázisok látszólag timersek. A *wee1Δ* mutánsban is az RCP előtti szakaszra volt tehető a méretkontroll, de ezekben a kis sejtekben ez a G1 fázis végét jelenti, mert teljesen más a ciklus fázisok szerinti felbontása [2]. A *cdc25* gén hiányában kialakuló nagy méretű sejteknél (*cdc2-3w cdc25Δ* dupla mutáns és *cdc2-3w cdc25Δ pyp3Δ* tripla mutáns) viszont a méretkontroll az RCP utáninak adódott, ami késői G2 fázist jelent. Mindezek az eredmények [5] megerősítik és pontosítják a korábbiakat.

Figyelemre méltó újdonságot fedeztünk fel ugyanakkor azáltal, hogy a post-RCP szakaszban az idő- és növekedés adatokat regressziós analízisnek vetettük alá az RCP-kori sejthossz (L_{RCP}) függvényében is. Ez az újszerű megközelítés azt igazolta, hogy a post-RCP szakasz egyik törzsben sem timer (mint eddig gondoltuk a tenyészetek jelentős részénél), hanem ott is működik a sejtméretre nézve kompenzációs mechanizmus [5]. Más szavakkal ez azt jelenti, hogy az eddig ismert kétféle méretkontrollal szemben a hasadó élesztő mitózisos ciklusában háromféle ilyen mechanizmus is működik, még hozzá sorrendben a G1 fázis végén, a G2 fázis közepén, és végül a G2 fázis végén. A sejtek méretétől és genetikai háttérétől függően egyes mechanizmusok dominálhatnak a többi fölött, mások pedig rejtetté válhatnak. Az általunk vizsgált sejtciklus mutánsok segítségével egy egységes képbe tudtuk foglalni mindezeket a jelenségeket.

(3) A hasadó élesztő sejtciklusában működő méretkontroll mechanizmusok tanulmányozása számítógépes szimulációval

A hasadó élesztő sejtciklusában működő méretkontroll mechanizmusokat számítógépes szimulációkkal is vizsgáltuk, egy korábban általunk készített és publikált matematikai modelltől kiindulva. A modell a sejtciklus regulációjában és végrehajtásában legfontosabbnak ítélt komponenseket biokémiai reakciók hálózataként fogja fel, ahol az egyes proteinek szintetizálódnak, egymással kölcsönhatásba lépnek (ezáltal aktiválódnak vagy inaktiválódnak), illetve degradálódnak. Minden egyes komponensre felírtunk egy közös differenciálegyenletet, és a paraméterek becslése azon az alapon történt, hogy a kapott numerikus szimulációk minél jobban összhangban legyenek a leírt kísérletes adatokkal. A sejtek növekedése ebben a modellben az egyszerűség kedvéért exponenciális, és a

méretkontrollt az ún. ciklinfüggő kinázok, mint az MPF (M fázis serkentő faktor) és az SPF (S fázis serkentő faktor) sejtmagi akkumulációja biztosította. Néhány évvel ezelőtt azonban kiderült, hogy a hasadó élesztőben a sejtmag a ciklus során tágul, méghozzá arányosan a sejt térfogatával, ami a méretkontrollra adott fenti elképzelést eléggé valószínűtlenné tette. Arra is fény derült azonban, hogy a hengeres sejtek végén a kortexhez kapcsolódva akkumulálódik egy mitózis inhibitor, a Pom1 fehérje, amely térbeli gradienst mutat a sejtben, azaz lokális koncentrációja csökken a sejt közepe felé. Mivel a zárt mitózis a sejt közepén található nukleuszban játszódik le, adódik egy kézenfekvő magyarázat a sejtméret és a ciklus eseményeinek összehangolásáról. Nevezetesen a ciklus eleji kis méretű sejtekben a sejt közepén is van még annyi Pom1, ami az MPF-et indirekten gátolva akadályozza a mitózis elkezdését. Ellenben ahogy növekszik a sejt a G2 fázis során, elér egy olyan kritikus méretet, amelynél a Pom1 már annyira felhígul a nukleusz környezetében, hogy az MPF aktívvá válik, majd pedig a mitózis is elkezdődhet.

A G2 fázisú méretkontroll működésére adott fenti új eredményeket átültettük a matematikai modell nyelvére. Megszüntettük a korábbi nukleáris MPF akkumulációs hatást, helyette pedig beépítettük a Pom1 fehérjét, valamint a Pom1 és az MPF közötti ismert biokémiai kölcsönhatásokat. A Pom1 hígulását a sejt közepén fordítottan arányosnak tételeztük fel a sejtmérettel. A vad típusú sejtekre történt szimulációink a kísérletekkel kvantitatív módon egyezően mutatták, hogy a nagyobbak született sejtek lerövidítik ciklusidejüket, de ez a negatív korreláció egy kritikus születéskori méret (sejthosszra vetítve kb. 11 μm) felett megszűnik. A modell egyes paramétereinek megváltoztatásával sikerült a vad típusú sejtekből indukciós szinkronizálással készíthető nagy méretű sejtek viselkedését is leírni. A modell a kísérletekkel összhangban széles mérettartományban nagy pontossággal leírja, hogy a sejtek születéskori mérete hogyan hat a ciklusidőre és a ciklus alatti méretnövekedésre.

A szimulációkat a hasadó élesztő *wee1 Δ* mutánsának modellezésére is kiterjesztettük, ahol a méretkontroll a G2 helyett a G1 fázisban hat, ld. a (2) pont alatt. A vad típushoz hasonlóan e mutánsnál is érvényes, hogy a nagyobbak született sejtek ciklusideje rövidebb, és ez a negatív korreláció egy kritikus születéskori méret felett éppúgy megszűnik, ami indukciós szinkron kísérletek tanúsága szerint kb. 6 μm -es sejthossz jelent. Mivel a G1 fázisú méretkontroll pontos molekuláris mechanizmusával kapcsolatban a megfelelő kísérletes adatok nem állnak még rendelkezésre, a modell segítségével megpróbáltunk jóslásokat tenni ennek működésére. Feltételezéseink szerint a G1 fázisban az SPF-et is egy térbeli gradienssel rendelkező protein gátolja, amíg a sejt el nem ér egy megfelelő méretet, majd pedig ha ez bekövetkezik, az ismeretlen inhibitor felhígul, az SPF így aktívvá válik, és a sejt az S fázisba lép. Az SPF-nek ismeretes egy sztöchiometrikus inhibitora, a Rum1 protein, ezért ennek tulajdonítottuk a modellben ezt a szerepet. Szimulációs eredményeink a kísérleteknek megfelelően megerősítik, hogy a hasadó élesztő G1 fázisú méretkontrollja akár az általunk feltételezett mechanizmus szerint is működhet. A következő lépés a kísérletes biológusoké, hogy mérések révén megerősítsék vagy elveszék ezt a hipotézist.

Elkészítettük a modell egyparaméteres bifurkációs diagramját is, mind a vad típusú sejtekre, mind pedig a *wee1Δ* mutánsra. A fixált születés kori sejt méret függvényében az állandósuló MPF aktivitások várakozásainknak megfelelően mutatják, hogy a sejtek méretük szerint melyik fázisban stabilak. A G2/M átmenetet pedig egy SNIC típusú bifurkáció jellemzi: ennek bifurkációs pontjában a stabil G2 állapotot egy végtelen periódusú, véges amplitúdójú oszcilláció váltja fel, ami a mitózist jelenti. A modell tudományos szakcikkből történő publikálása jelenleg előkészületben van [6].

(4) A hasadó élesztő sejtátmérőjének változásai a ciklus során

A hasadó élesztő sejt méretének ciklus alatti növekedését és a méretkontroll jelenségét kísérletesen és szimulációkkal vizsgálva, eddig természetesnek vettük, hogy a sejtek átmérője konstansnak tekinthető, azaz a hengeres sejtek mérete egyszerűen a hosszukkal jellemezhető. Ezt a szakirodalomban is mindenki evidensnek szokta tekinteni, pedig olyan átfogó elemzés tudtunkkal nem készült még, amely ezt minden kétséget kizáróan bizonyította volna. Ezért ugyanazokon a mikroszkópos filmekken, amelyekről az (1) és (2) pontokban szó esett, erre irányuló vizsgálatokat végeztünk. Problémát okozott, hogy a sejtek átmérője még az alkalmazott legnagyobb nagyítás mellett is túlzottan kicsi, ezért nagy a mérés relatív hibája és az esetleges változások észlelése sem könnyű. Filmenként 100-150 sejt esetén meghatároztuk a születés kori és osztódás kori hossz és átmérő értékeket, és azt vizsgáltuk, hogy van-e vastagodás a ciklus alatt, azaz az osztódás kori átmérő nagyobb-e a születés korinál. A mérési hibákat is figyelembe véve azokat az eseteket tekintettük vastagodásnak, ahol a két átmérő közti különbség min. 10%, azaz mintegy 0,4 μm volt. Filmenként 10-10 véletlenszerűen kiválasztott sejt esetében meghatároztuk a teljes növekedési mintázatot a sejt hossz és az átmérő viszonylatában, valamint célzottan azoknál a sejteknél is elvégeztük mindezt, amelyeknél a ciklus során vastagodást figyeltünk meg.

Tapasztalataink szerint a vad típusú tenyészetekre és a legtöbb sejt ciklus mutánsra (kivételek: *wee1-6*) is az volt érvényes, hogy a ciklus alatt vastagodó sejtek száma minimális volt, filmenként 1-2 db, vagy annyi sem. A felvételenként végigmért sejtek igazolták, hogy a sejtátmérő gyakorlatilag semmilyen irányban és mértékben nem változik, azaz független a ciklusbeli állapottól. A haploid sejt populációkban az átlagos osztódás kori sejtátmérő 3,4-3,8 μm tartományban mozgott, és független volt a genetikai háttértől. A diploid sejtek esetében ez a tartomány 4,0-4,2 μm , tehát mérhetően vastagabbak ugyan a diploid sejtek, de a szórás is tekintve a különbség ahhoz nem elég nagy, hogy egy adott sejt ploiditása eldönthető legyen az átmérőjének megméréseivel. A *wee1-6* mutáns tenyészetében viszont kivételesen jelentős mértékben (10% felett) találtunk vastagodó sejteket. Régóta ismert jelenség ebben a mutánsban a spontán diploidizáció, ezért a „haploid” tenyészet eleve vegyes, akár 30%-nyi diploidot is tartalmazhat, és a haploidokat a diploidoktól a geometriai paraméterek alapján nem is lehet egyértelműen elválasztani. Feltételezzük, hogy a jelentős számú ciklus alatti vastagodás és a spontán diploidizáció jelenségei között összefüggés állhat fenn, de ennek

egyértelmű bizonyítása vizsgálati módszerünkkel sajnos nem lehetséges. Vastagodó sejteket kerestünk nagy méretűek között, azaz indukciós szinkron tenyészetben, illetve egy olyan mutánsban is (*wee1-50 cdc25Δ*), amelyikben egyes sejtek ciklusideje a normális generációs idő másfélszeresét is eléri (kb. 230 min, szemben a 150-nel), de ilyen körülmények között sem találtunk jelentős számban sejtvastagodást. Mindez valószínűsíti a fenti hipotézist, és terveink között szerepel, hogy tudományos szakcikkekben is közöljük az ezzel a kérdéskörrel kapcsolatos eredményeinket.

A projekt támogatásával megjelent vagy közlés alatt álló cikkek és könyvfejezetek

[1] Sveiczter, Á., Rácz-Mónus, A.: Cell cycle, cell size regulation. In: Encyclopedia of Systems Biology. Szerk.: Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K-H., Yokota H. pp. 343-346. Springer, Heidelberg - New York (2013)

[2] Sveiczter, Á., Horváth, A.: Cell cycle, fission yeast. In: Encyclopedia of Systems Biology. Szerk.: Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K-H., Yokota H. pp. 349-353. Springer, Heidelberg - New York (2013)

[3] Horváth, A., Rácz-Mónus, A., Buchwald, P., Sveiczter, Á.: Cell length growth in fission yeast: an analysis of its bilinear character and the nature of its rate change transition. *FEMS Yeast Research* **13**, 635-649 (2013)

[4] Sveiczter, Á., Horváth, A., Buchwald, P.: Is there a universal rule for cellular growth? – Problems in studying and interpreting this phenomenon. *FEMS Yeast Research* **14**, xxx-xxx (2014) (in press) DOI: 10.1111/1567-1364.12168

[5] Horváth, A., Rácz-Mónus, A., Sveiczter, Á.: Cell length growth patterns in fission yeast reveal a novel size control mechanism operating in late G2 phase. *Journal of Cell Science* **127**, xxx-xxx (2014) (submitted for publication)

[6] Lovász, K., Rácz-Mónus, A., Sveiczter, Á.: A mathematical model for the G1 and G2 size control mechanisms via inhibitor dilution in fission yeast. *Biophysical Chemistry* **xxx**, xxx-xxx (2014) (in preparation)

Budapest, 2014. 07. 15.

Sveiczter Ákos
témavezető