

RÉSZLETES BESZÁMOLÓ

Az F 034100 nyilvántartási számon elnyert Tematikus és Ifjúsági OTKA Pályázat keretében az OTKA 2001 és 2004 között összesen 2400 E Ft kutatási támogatásban részesített minket. A szerződés módosítására egy alkalommal sor került, ugyanis 2004. decemberében a kutatás határidejének egy évvel történő meghosszabbítását kértük a Műszaki és Természettudományi Kollégium Elnökétől, és az OTKA Iroda Igazgatójától kapott értesítés szerint a Kollégium elfogadta ezirányú kérelmünket. A kutatásokat az OTKA mellett az Oktatási Minisztérium is támogatta egy Felsőoktatási Kutatási Fejlesztési Pályázat keretében (0014/FKFP, 2001-2004, témavezető Sveiczler Ákos), illetve az MTA is egy szintén 2001-2004 közötti Bolyai János Kutatói Ösztöndíjjal, melyet e projekt témavezetője nyert el.

Az elmúlt 5 évben az Élesztő sejtciklusának modellezése c. pályázat keretében 4 kutatási témakörrel foglalkoztunk, melyek az elkövetkezőkben részletes ismertetésre kerülnek. A kutatások a BME Mezőgazdasági Kémiai Technológia Tanszékén, közelebbről Novák Béla professzor kutatócsoportjában folytak. A csoport állandó tagjai mellett a munkában részt vett a BME néhány biomérnök hallgatója is, akik tudományos diákköri dolgozatot és/vagy diplomamunkát készítettek. Fontos kiemelni, hogy külföldi partnerekkel is együtt dolgoztunk, nevezetesen John Tyson professzorral (Virginia Tech, Blacksburg, USA), Murdoch Mitchison professzorral (University of Edinburgh, UK) és Dr. Buchwald Péterrel (Ivax Research, Inc., Miami, USA).

(1) A hasadó élesztő sejtciklusának sztochasztikus molekuláris modellezése. Elkészítettük a hasadó élesztő sejtciklusának egy olyan matematikai modelljét, amely a biokémiai reakciókinetika törvényszerűségei szerint tárgyalja a sejtciklus szabályozásában legfontosabb fehérjék képződését, degradációját és egymás közötti kölcsönhatásait, és ugyanakkor a tenyésztett sejtjei körében megfigyelhető sejtméret és ciklusidő inhomogenitásokat is figyelembe veszi. Ez volt az első olyan modellje egy eukarióta sejt szaporodási ciklusának, amely a kulcsfehérjék szabályozási hálózatának dinamikáját sztochasztikus módon kezelte. Az ötlet alapja az volt, hogy az ún. ciklin-dependens kinázok nukleáris mennyisége helyett azok nukleáris koncentrációját vettük figyelembe, és feltételeztük, hogy a sejtmegosztódás (mitózis) során keletkező "leánysejtmagok" térfogata nem feltétlenül azonos az "anyasejtmag" térfogatával. Ily módon magyarázni tudtuk azt, hogy az azonos méretű (citoplazma térfogatú) sejtek viselkedése között eltérések adódhatnak. E hipotézist azért alkalmaztuk, mert régóta ismert volt az az általunk is bebizonyított tény, hogy a sejtosztódás (citokinézis) ismert mérvű aszimmetriája önmagában nem elegendő a sztochasztikus jelenségek mértékének magyarázatára. Azóta mások publikáltak olyan modelleket is, amelyek az egyes biokémiai reakciólépéseket tekintik sztochasztikusnak.

(2) A hasadó élesztő ciklus alatti növekedésének (morfogenezis) kísérletes tanulmányozása. Az elmúlt években a hasadó élesztő sejtjeinek ciklus alatti növekedési mintázatát vizsgáltuk, méghozzá "time-lapse" mikroszkópos filmek analízisének segítségével. A fő kérdésünk az volt, hogy a hengeres alakú sejtek átmérője a ciklus alatt változik-e, illetve az hogyan függ a sejt ploiditásától, netán bizonyos gének működésétől. Eredményeink szerint a vad típusú tenyészetek (haploid és diploid egyaránt) esetén a sejtek átmérője a ciklus alatt jelentősen nem változik, a kismérvű változások pedig magyarázhatók korábbi irodalomból ismert megfigyelésekkel, mint pl. az osztódási hegek számának növekedésével. Lényeges megfigyelés, hogy bár a diploid sejtek átlagosan mintegy 20%-kal vastagabbak a haploidoknál, de az egyes ciklusokon belül az átmérő éppúgy konstansnak tekinthető. A *wee1-6* mutáns tenyészet sejtjeinek zömére hasonló megállapítások tehetők, azaz a sejtek nem változtatják meg jelentősen átmérőjüket, de a diploidok vastagabbak a haploidoknál. Mivel a *wee1-6* mutáns sejtjei rövidebbek a vad típusúaknál, és a cikluson belül az egyes fázisok aránya más (nevezetesen a G1 fázis megnyúlik a G2 rovására), leszögezhetjük, hogy a sejtek vastagsága független mind a hosszuktól, mind pedig a sejtciklusbeli állapottól. Utóbbi azért lényeges dolog, mert legalábbis a nukleáris DNS tartalom szempontjából egy haploid G2 fázisú sejt "ugyanolyan", mint egy diploid G1 fázisú sejt, utóbbi mégis vastagabb. Hipotézisünk szerint a G1 fázisban történik a sejt formájának kialakulása, amit a genom nagysága a nukleusz méretén és a sejtvázon keresztül befolyásolni tud. A ciklus későbbi fázisaiban pedig a sejtek csak hosszirányban nyúlnak, vastagságukat gyakorlatilag nem változtatják meg.

Ugyanakkor szemben a fenti általánosnak tűnő szabállyal a *wee1-6* mutánsokban találtunk néhány kivételes viselkedésű sejtet, melyek a ciklus alatt jelentősen (több mint 10%-kal) megvastagodtak. Azt találtuk, hogy ezek a vastagodások vagy a ciklus végén egy abnormálisan hosszú szeptációs szakaszban következnek be; vagy pedig a ciklus első harmadában, de utóbbi esetben a ciklusidő nem nyúlik túlzottan meg. Feltételezzük, hogy ezek a vastagodások kapcsolatban lehetnek azzal a régóta ismert ténnyel, hogy a *wee1-6* mutáns sejtek spontán módon gyakran diploidizálódnak, s emiatt tisztán haploid és diploid tenyészeik tulajdonképpen nincsenek is. Az értékelést ugyanakkor megnehezíti, hogy éppen a kis sejt méret miatt geometriai okok is előidézhetnek látszólagos vastagodást. Megvizsgáltuk a szintén *wee* fenotípusú *wee1-50* és *cdc2-3w* mutánsokat, melynek sejtjei között nem találtunk az előbbihez hasonlóan erősen vastagodó mintázatokat. Ez alighanem összefüggésben van azzal, hogy ezekben a tenyészetekben a spontán diploidizáció jelensége nem számottevő, ami közvetve azt bizonyíthatja, hogy a vastagodás és a diploidizáció összefüggő jelenségek. Sajnos time-lapse filmjeinken a sejtek ploiditása értelemszerűen nem látszik, ezért azt eleve csak közvetve, a sejtek mérete alapján állapíthatjuk meg, a diploidizációra tehát közvetlen bizonyítékaink elvileg sem lehetnek. Foglalkoztunk még a *cdc2-33* mutáns indukciós szinkron tenyészetével is, ahol a sejtek mérettartománya jelentősen kiszélesedik a steady-state tenyészetekhez képest. Megállapítottuk, hogy a sejtek hossza és

átmérője között ilyen körülmények között sincs korreláció. Ezzel a (2) témakörrel kapcsolatos eredményeinket eddig még csak konferenciákon mutattuk be, szemben a többi, cikkek formájában is publikált témakörrel.

(3) A hasadó élesztő sejtciklusának determinisztikus molekuláris modellezése. Az elmúlt években elkészítettük a hasadó élesztő sejtciklusának egy olyan determinisztikus molekuláris modelljét, amely a korábbiaknál sokkal részletesebb, figyelembe veszi a nemrégiben felfedezett, általunk fontosnak ítélt proteineket és a közöttük fellépő kölcsönhatásokat is. A modellel képesek vagyunk leírni a hasadó élesztő bizonyos mutánsaiban (*cdc13Δ*, *ste9^{OP}*, *rum1^{OP}*, *cdc11^{ts}* *cut1^{ts}*) megfigyelhető ún. endoreplikációs ciklusokat, amikor a sejtek képtelenek a mitózis és citokinézis folyamatainak végrehajtására, de meghatározott időnként mégis egy újabb DNS-replikációt hajtanak végre, s ezzel poliploiddá válnak. Megállapítottuk, hogy a korábbi modellekkel szemben a sejtciklus "reset" eseményét nem a sejtmag vagy a sejt osztódásához, hanem a DNS replikációjához kell kötni a modellben, csak így tudjuk ugyanis a modellel helyesen szimulálni a fenti endoreplikációs ciklusokat. Az S fáziskori "reset" például úgy érhető el, ha a ciklinek akkumulációját a sejtmagban nem egyszerűen a sejttömeggel, hanem a tömeg/DNS hányadossal vesszük arányosnak. Modellünk pontosan leírja azt is, hogy a *cdc13Δ* mutáns endoreplikációs ciklusai a Cig2 nevű ciklintől függenek, de a Cig1-től nem; azaz a *cdc13Δ cig1Δ* dupla mutáns is periodikusan duplázza örökítő anyagát, ezzel szemben *cdc13Δ cig2Δ* dupla mutáns a G1-fázisban blokkolódik, tehát a replikációt sem tudja végrehajtani.

A hasadó élesztő sejtciklusának genetikai szabályozottsága annyira egyszerű (haploid sejtek, egyféle ciklin-dependens kináz, stb.), hogy az előzővel ellentétes folyamat, amikor S-fázisok nélkül egymás után M-fázisok követik egymást, is könnyen előidézhető bizonyos mutánsokban. Természetesen már két egymást követő mitózis is letális hatású a haploid sejtre (ún. "cut" fenotípus), és erre példa a *cdc18Δ* mutáns. Modellünk szerint ezekben a sejtekben az történik, hogy a replikáció iniciációja úgy gátlódik, hogy a mitózisos apparátus felé nincs visszacsatolás, azaz a G1-fázisú sejtek úgy kerülnek "G2"-be, majd M-be, hogy az S-t átugrották, ami a sejt halálát eredményezi. További fontos eredményünk a modellel a *cdc10^{ts}* mutáns Start-blokkjának vizsgálata. Sikerült megértenünk, hogy e sejtek a Start-blokk alatt miért nem kezdenek el egy letális mitózis eseményt; illetve miért kezdik azt el mégis, ha akár a Ste9, akár a Rum1 protein hiányzik a sejtől. Végezetül készítettünk egy olyan modellt is, amely nemcsak hiánymutánsok, hanem bizonyos géneket túlzottan kifejező sejtek fenotípusát is képes az irodalomban fellelhető kísérleti adatokkal összhangban leírni. A *cdc25* illetve a *wee1* gének túltermelésének (illetve a túltermelés szintjének) pontos fiziológiai hatása az élesztő sejtekre régóta ismeretes, és a megfelelő mutánsok viselkedését modellünk megfelelő pontossággal közelíti.

(4) A hasadó élesztő növekedése és sejtciklusa közötti kapcsolatok elméleti biológiai ill. matematikai statisztikai megközelítése. Méretkontrollnak nevezzük azt a mechanizmust, amely az egymást követő generációk sejtjei méretének állandóságát biztosítja a tenyészetben. Hasadó élesztő esetében ez az ún. méretkontrollált esemény a G2 fázisban található, amely a sejtek mitózisba lépését egy kritikus méret eléréséhez köti. Ivan Rupes és munkatársai (*Mol. Biol. Cell* **12**, 3892-3903, (2001)) vizsgálták, hogy ha egy latrankulin nevű vegyszerrel (ami a sejtvezetési aktin komponensének depolimerizációját váltja ki) kezelik az élesztő sejtet, arra azok hogyan reagálnak. Eredményeik szerint egy bizonyos koncentráció felett a sejtek G2 fázisú blokkba kerülnek, amit a szerzők azzal magyaráztak, hogy a depolimerizálódó aktin hatására a sejtek nem tudnak nőni, emiatt sosem érik el a mitózisba lépéshez szükséges méretet. Az általuk adott mechanizmus szerint tehát az aktin depolimerizáció csak közvetve, a méreten keresztül hat a sejtciklus progressziójára. Ezzel szemben a szerzők által közölt adatokat újra elemezve mi megállapítottuk, hogy a méret közvetítő hatása kizárható, azaz az aktin depolimerizációja közvetlenül gátolja a mitózisba lépést. Más megfogalmazással: a latrankulin nem a méretkontrollra hat, hanem a hasadó élesztő ciklusában működni kell egy ún. morfogenezises ellenőrzési pontnak is.

A méretkontroll feltétlen szükségszerűségének kérdése régóta foglalkoztatja a sejtciklussal foglalkozókat. Nemrégiben Ian Conlon és Martin Raff (*J. Biol.* **2**, 7, (2003)) azt állapították meg, hogy egy bizonyos általuk vizsgált emlős sejttenyészetben a méret homeosztázisa fenntartható szigorúan vett méretkontroll mechanizmus nélkül is. Adataikat analizálva arra a következtetésre jutottunk, hogy bár a szerzők feltételezését kizárni nem lehet, de az meglehetősen valószínűtlen. Sokkal nagyobb annak az esélye, hogy tenyészetükben működik a méretkontroll, csak eléggé gyenge formában, amit populációs szintű méréseik kimutatni nem tudnak. Javaslatot tettünk arra, hogy a tenyészet viselkedése mellett egyedi sejteket is tanulmányozniuk kellene, hogy ez a kérdés eldönthető legyen.

A sejtek növekedése kapcsán az is régóta képezi vita tárgyát, hogy a sejt méret ciklus alatti változása milyen típusú matematikai függvénnyel írható le. Az exponenciális növekedési modell elméletileg teljesen logikus ugyan, de sok esetben a kísérletek mégis mást látszanak mutatni. A hasadó élesztő esetében például az utóbbi 20 évben az vált általánosan elfogadottá, hogy a sejt hossz ciklus alatti növekedése lineáris, de egy ún. sebességváltási pont miatt valójában bilineáris modellel jellemezhető. Kidolgoztunk egy statisztikai kritériumokon alapuló modellt szelekciós eljárást, amely alkalmas a bilineáris és exponenciális modellek között szelektálni. Korábban publikált saját sejt növekedési mintázataink tanulmányozása alapján egyelőre úgy tűnik, hogy a bilineáris modell adekvátabb, mint az exponenciális, de természetesen egy ilyen kérdés eldöntéséhez sok egyedi sejt vizsgálatára lenne még szükség.

Az OTKA által támogatott kutatás eredményeit összesen 25 tudományos közlemény formájában tettük közzé. Ezek között található 7 folyóiratban megjelent (pontosabban közülük 2 még csak elfogadott) cikk, 1 könyvfejezet, 4 folyóiratban megjelent absztrakt, 3

tudományos konferencia előadás, 8 konferencián prezentált poszter és 2 egyéb előadás. A táblázatos formában mellékelt lista ezek közül 14-et tartalmaz azért, mert a konferenciakiadványok és absztraktok közül csak azokat szerepeltetjük, amelyek cikk formájában nem kerültek közlésre vagy pedig 2005-ös keltezésűek (a korábbi évek részbeszámolóiban természetesen a többi 11 közlemény is megtalálható volt). A két impact faktorra rendelkező folyóiratban megjelent cikk impact faktorának összege 4,8. A többi cikk olyan folyóiratokban került közlésre, amelyek impact faktorra nem rendelkeznek, bár ezek lektorált, angol nyelvű lapok, melyeket pl. a PubMed indexál. Két folyóirat még kifejezetten friss, és esetükben várható is, hogy néhány év múlva lesz impact faktoruk; ezek a BioMedCentral által kiadott, kizárólag interneten terjesztett *Theoretical Biology and Medical Modelling* és az Oxford Journals által megjelentetett *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*. Fenti publikációkra (köztük néhány impact faktorra nem rendelkezőre is) az ISI adatbázisa alapján eddig összesen 16 független hivatkozást kaptunk, ami ilyen rövid periódus alatt kifejezetten jónak tekinthető.

A könyvfejezet felkérésre készült: az Alapítvány a Magyar Felsőoktatásért és Kutatásért 2003-ban elkészítette a Magyary Zoltán Posztdoktori Ösztöndíjasokat és kutatásaikat ismertető kötetét, melyben néhány akkori és régebbi ösztöndíjast (köztük e projekt témavezetőjét) felkérték egy-egy könyvfejezet megírására. Az absztraktok közül 2 is a rangos *Yeast* c. lapban jelent meg, melynek (legalábbis cikkei vonatkozásában) 1,9-es impact faktora van jelenleg. A tudományos konferenciákon történő szereplések közül az alábbiak emelendők ki: felkért előadás a Magyary Ösztöndíjasok konferenciáján (Sopron, 2001); felkért előadás a II. Magyar Mikológiai Konferencián (Szeged, 2002); a *Yeast* 2003 konferencián a poszter anyaga felkérésre workshop prezentációra is került (Göteborg, Svédország, 2003). Végezetül az egyéb kategóriába sorolt előadások közül az egyik az MTA Mikológiai Munkabizottságában hangzott el, szintén felkérésre (Budapest, 2003). A kutatásokba bevont biomérnök hallgatók munkájának eredményeként a Műegyetemen a pályázat futamideje alatt 3 diplomamunka és 2 TDK dolgozat született, melyeket valamennyi esetben e projekt témavezetője irányította.

Budapest, 2006. március 20.

Sveiczter Ákos
sk.