



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA

A MITÓZIS MATEMATIKAI MODELLEZÉSE

Tézisfüzet

SZERZŐ:

Tóth Attila

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Novák Béla egyetemi tanár

KONZULENSEK:

Dr. Csikász-Nagy Attila egyetemi docens

Dr. Sveiczter Ákos egyetemi docens

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

2013

Bevezetés

A földi élet szemet kápráztató sokféleségének kialakulásában kulcsfontosságú lépés volt az eukarióta sejtek megjelenése. A forradalmi változást azon mechanizmusok megjelenése idézte elő, melyek segítségével a prokarióta sejtekben található nagyságrendileg több genetikai információ megbízható és gyors reprodukciója vált lehetővé. Ehhez azonban esszenciális volt a kromoszómás ciklus két eseményének – a DNS-replikációnak (S-fázis) és a két DNS kópia szétválasztásának (mitózis, M-fázis) – egyértelmű különválasztása.

Az örökítőanyag reprodukciójára az eukarióták által használt módszernek további feltétele az S- és az M-fázis felváltva történő bekövetkezése. A két esemény alternálását egy (vagy magasabb rendű eukariótákban több) ciklinfüggő protein-kináz ciklinnel alkotott komplexének (CDK) aktivitásának alacsony és magas értékek között történő jellegzetes váltakozása biztosítja. A sejtciklus G1-fázisát alacsony CDK-aktivitás jellemzi. A CDK-aktivitás a DNS-szintézis kezdetekor megemelkedik, a mitózisban maximumot ér el, majd a mitózis végén drasztikusan lecsökken. A sejtciklus kutatás egyik központi kérdése, hogy miként váltanak az eukarióta sejtek az eltérő CDK-aktivitással jellemezhető két stabilis állapot között. *Doktori munkám során a magas CDK-aktivitásból az alacsony CDK-aktivitású állapotba való átmenetet, azaz a mitózis befejezését szabályozó molekuláris hálózat vizsgálatával foglalkoztam.* Eszközül a biokémiai reakciókinetika törvényei alapján készített matematikai modellek készítését és azok vizsgálatát választottam.

Irodalmi áttekintés

Sejtcikluson a két egymást követő sejtosztódás között a sejtben lejátszódó események összességét értjük. Az eukarióta sejtek sejtciklusa négy fázisra bontható. Közülük kettő a sejt örökítőanyagát alapvetően érintő esemény: a DNS-replikáció (S-fázis) és a mitózis (M-fázis) – melynek során a replikálódott DNS két kópiájának szétválasztása történik. E két fázis közé egy-egy „szünet” (angolul gap) ékelődik: a G1-fázis a mitózist, a G2 pedig a DNS-replikációt követi. A G1, az S, a G2 és az M fázisok mindig ebben a sorrendben követik egymást. A sejtosztódásra a mitózist követően kerül sor. A mitózis önmagában is több fázisra osztható, melyek sorrendben a profázis, a prometáfázis, a metafázis, az anafázis és a telofázis. A mitózis metafázisig tartó szakaszait együttesen *korai mitózisnak* nevezik, hogy megkülönböztessék a *mitózis befejezésétől*¹.

1 Morgan D. O., (2007) *The cell cycle: principles of control*. New Science Press in association

A sejt életképességéhez esszenciális két követelmény teljesítése: egyrészt a DNS-replikáció és a mitózis mindig felváltva kell, hogy kövesse egymást („alternálási” probléma), másrészt ezen folyamatok bármelyike csak akkor játszódhat le, ha a másik sikeresen befejeződött („befejezési” probléma). A „befejezési” probléma megoldására ún. ellenőrzési pontok vannak a sejtciklusban, az „alternálási” problémára pedig a DNS-replikáció két lépéses iniciációja jelent megoldást.

Az ellenőrzési pontok olyan mechanizmusok, melyek a G1–S átmenetnél, a G2–M átmenetnél és a meta-/anafázis határán biztosítják, hogy a sejtciklus csak bizonyos feltételek együttes fennállása esetén folytatódhasson. A mitóziskutatás szempontjából a meta- és az anafázis határán működő *magorsó* (vagy mitózisos) *ellenőrzési pont* kiemelkedő fontosságú, mely által a sejt biztosítja, hogy az anafázis – azaz a leánykromatidák szegregációja – csak azután kezdődhessen el, miután az összes kromoszóma felsorakozott a metafázisos síkra.

A DNS-replikáció és a mitózis felváltva történő végrehajtásáért felelős mechanizmus megakadályozza a DNS re-replikációját a leánykromatidák sikeres szétválasztása előtt. Lényege, hogy a DNS-replikáció megindulásának kettő, egymásra épülő feltétele van, melyek közül az egyik az anafázis lejátszódásához kötött. A sejtciklus központi szabályozójának tekinthető CDK (ciklinfüggő protein-kináz ciklinnel alkotott heterodimerje) aktivitásának – mely a DNS-replikáció kezdetekor jelenik meg és maximumát a mitózisban éri el – ugyanis először meg kell szünnie ahhoz, hogy újabb S-fázis kezdődhessen. Mivel a CDK-aktivitás önfenntartó, ehhez egy másik, őt megszüntető szignálra van szükség. Ez a molekuláris jel az APC-aktivitás megjelenése. Az APC (anafázisserkentő komplex, „anaphase-promoting complex”) a mitózis anafázisában aktiválódik és két fő hatása van: elindítja a leánykromatidák szegregációját és megszünteti a CDK-aktivitást. Mivel e két folyamat egyazon jel hatására indul el, a CDK-aktivitás megszűnése valóban csak a leánykromatidák sikeres szétválasztása, azaz a mitózis anafázisának lejátszódása esetén következik be.

A CDK és az APC aktivitásának egymást kiegészítő váltakozása az eukarióta sejtciklus egyik legalapvetőbb jellemvonása. Mindkét aktivitás önfenntartó, ám kölcsönösen kizárják egymást: G1-fázisban alacsony CDK- és magas APC-aktivitás jellemzi a sejtet, az S–G2–M fázisokban pedig ennek fordítottja. Ezért a sejtciklus kutatás egyik központi kérdése, hogy miként vált a sejt az alacsony és a magas CDK-aktivitással jellemezhető állapotok között². A válaszhoz a CDK és az APC szabályozását érdemes megvizsgálni.

A CDK komplex katalitikus alegységei a ciklinfüggő protein-kinázok (Cdk-k),

with Oxford University Press; Sinauer Associates, London: Sunderland, Mass.

2 Nasmyth K. (1996) At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet* 12, 405-412.

melyek szintje állandónak tekinthető. Regulátor partnereik a ciklinek, melyek szintje periodikusan változik a sejtciklus során. Katalitikus aktivitása csak a Cdk:ciklin heterodimernek van. Kiemelkedő fontosságú a mitózisos ciklinek Cdk-val alkotott komplexe, az MPF (M-fázis-serkentő faktor). A CDK-aktivitás szabályozása három mechanizmussal történik: (1.) ciklinszintézis és -lebontás, (2.) a Cdk aktiváló ill. gátló foszforilezése és defoszforilezése, valamint (3.) a CDK gátlása sztöchiometrikus inhibitorokkal. Utóbbiak G1-fázisban hatnak. A Cdk-aktiváló kinázok (CAK-ok) sejtciklus-pozíciótól függetlenül foszforilezással aktiválják a Cdk-t. A Cdk gátló foszforilezését a Wee1 kináz végzi elsősorban az S és a G2 fázisok során, a gátló foszfát csoportot pedig a Cdc25 foszfataz távolítja el. Ciklinek az S–G2–M fázisokban szintetizálódnak. Lebontásukat az APC ubikvitin-ligáz komplex iniciálja. Ehhez aktiváló alegységek kapcsolódása szükséges az APC maghoz – mely önmagában is egy hatalmas heteromultimer komplex. A két legfontosabb APC-aktivátor a Cdc20 és a Cdh1. Az APCP:Cdc20³ komplex a mitózis anafázisában aktiválódik, az APC:Cdh1 komplex pedig a mitózisból való kilépéstől a G1-fázis végéig aktív. Az APCP:Cdc20 felelős a leánykromatidákat összekötő kohezinkomplex lebontásának megindításáért is a metafázis/anafázis átmenetnél, melyet a kohezin lebontásáért felelős szeparáz inhibitorának, a szekurinnak ubikvitinézése révén tesz.

Nem csupán az APC szabályozza a MPF-aktivitást a ciklinszinten keresztül, hanem számos fordított irányú kapcsolat is megfigyelhető. Az APC mag MPF általi foszforilezése segíti a Cdc20 megkötését, a Cdh1 megkötésére viszont nincsen hatással. A mitózis szabályozása szempontjából kritikus jelentőségű, hogy *az APCP:Cdc20 komplex a maximális MPF-aktivitáshoz képest időkéselettel aktiválódik. Az időkéselet oka nem teljesen tisztázott, mint ahogyan a Cdc20 foszforilezésének az APCP:Cdc20-aktivitás szabályozásában betöltött szerepe sem.* Kramer és munkatársai szerint⁴ az MPF-nek nincs hatása a Cdc20-ra, Yudkovsky és munkatársainak eredményei⁵ ellenben arra engednek következtetni, hogy *az MPF foszforilezéssel gátolja a Cdc20-at.* Az APCP:Cdc20 aktiválódását a Mad2 fehérje is képes megakadályozni, ugyanis a magorsó ellenőrzési pont aktiválódásakor inaktív komplexbe viszi a Cdc20-at. Az MPF a Cdh1-et foszforilezéssel inaktíválja, ezért az APC:Cdh1 aktiválódásához (sarjadzó élesztőben) a Cdc14 foszfataz aktivitása is szükséges, mely a gátló foszfát csoportot távolítja el. Mivel a Cdc14-et a G1-fázistól a korai mitózisig inaktív komplexben tartja a nukleoluszban a Net1-fehérje, a

3 APCP-vel az APC mag foszforilezett formáját jelölöm.

4 Kramer E. R., Scheuringer N., Podtelejnikov A. V., Mann M. and Peters J. M. (2000) Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell* 11, 1555-1569.

5 Yudkovsky Y., Shteinberg M., Listovsky T., Brandeis M. and Hershko A. (2000) Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 299-304.

mitózisból való kilépéshez a Cdc14 aktiválása is szükséges. Ezért sarjadzó élesztőben két szabályozási útvonal felelős. A FEAR („Cdc fourteen early anaphase release”) az anafázis korai szakaszában biztosítja a Cdc14 részleges aktiválódását, a MEN („mitotic exit network”) pedig a késői anafázistól teszi teljessé a folyamatot. Mivel az MPF a MEN-útvonal több komponensét is szabályozza, a mitózis befejezésében szerepet játszó szabályozó-körök rendkívül összetettek. Működésük megértéséhez segítséget nyújthatnak a matematikai modellek.

A modellezés során az egyik lehetséges stratégia az egyszerűbbektől a bonyolultabb modellek felé történő haladás. Az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) korai embrionális ciklusai során egyedül a B-ciklin koncentrációjának változása „hajtja” az MPF oszcillációját, egyéb szabályozási mechanizmusok nem érvényesülnek. Se Cdh1, se sztöchiometrikus inhibitor nincs a sejtben, a ciklinbontás egyedül az APCP:Cdc20 komplextől függ. A Cdk Wee1 általi gátló foszforilezésének megléte nem teljesen tisztázott. A magorsó ellenőrzési pont inaktív, azonban a *Xenopus laevis* embriók kivonata nagyobb mennyiségű Mad2 hozzáadásával metafázisban blokkolható. Mindezen okok miatt több egyszerű sejtciklusmodell született már, mely a *Xenopus laevis* korai embrionális ciklusait vizsgálta. Ezek a modellek azonban rendszerint egy kísérletekkel nem kellően alátámasztott köztes enzim (IE) feltételezésével kezelték az APCP:Cdc20 MPF-hez képest késleltetett aktiválódásának kérdését⁶. *Első célom ezért egy olyan sejtciklusmodell megalkotása volt, mely képes a mitózist az IE feltételezése nélkül, továbbá az MPF általi Cdc20-foszforilezésnek – mint újabban napvilágot látott eredménynek – figyelembe vételével leírni. További céljaim között szerepelt egyes – a korábbi matematikai modellekkel részletesen nem vizsgált, ám a mitózisban kulcsfontosságú – enzimek (pl. a Cdc14), valamint a FEAR és a MEN szabályozási útvonalak szerepének mélyreható elemzése.*

A mitózisból való kilépéskor számos „végrehajtó” fehérje (VF) aktiválódik, például olyan foszfatázok, melyek az MPF által foszforilezett fehérjékről távolítják el a foszfát csoportot. Mivel a sejtciklus ezen pontján az MPF-aktivitás magasról alacsony értékre zuhan, logikus feltételezni, hogy az ekkor aktiválódó fehérjéknek és transzkripció faktorainak (TF) a szabályozásában egyaránt az MPF játszik szerepet. Amennyiben valóban ez a helyzet, az MPF, a TF és a VF egy *előreccatolási hurkot* (EH) alkot⁷. Egy ilyen előreccatolási hurokban három kölcsönhatást figyelhetünk meg. Az első az MPF általi VF-foszforilezés, melyet az EH „rövid karjának” nevezek.

6 Tyson J. J. and Novak B. (2001) Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions. *J Theor Biol* 210, 249-263.

7 Mangan S. and Alon U. (2003) Structure and function of the feed-forward loop network motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11980-11985.

A második az MPF általi TF-foszforylázás, a harmadik pedig a TF hatása a VF-re. Ez utóbbi két kölcsönhatás alkotja az EH „hosszú karját”. Mindhárom kölcsönhatás lehet aktiváló (+) vagy gátló (-) jellegű. Bár néhány konkrét esetben már vizsgálták az előrecsatolási hurkok szerepét a sejtciklus egyes eseményeinek szabályozásában, a mitózis befejezésében játszott általánosabb szerepük nem tisztázott. Ezért *célul tűztem ki egy olyan modell megalkotását, mellyel a mitózis befejezésekor potenciális szabályozó szereppel bíró, (++/-) vagy (--/-) hálózati topológiájú EH-ok dinamikai viselkedése általánosan vizsgálható.*

Korunk egyik vezető halálozási okának, a rákbetegségnek hátterében részben a sejtciklus szabályozási zavarai állnak. Éppen ezért a rák kezelésében alkalmazott kemoterápiás szerek egy csoportja (pl. docetaxel, paclitaxel) a kontrollálatlan sejtosztódást a magorsó ellenőrzési pont aktiválásával gátolja meg. Sajnos azonban a *kemoimmunitási rendszer* működése miatt a rák nem gyógyítható ilyen egyszerűen⁸. A rendszert alkotó komponensek – nukleáris receptorok, metabolikus enzimek és multidrog transzporterek (rendszerint ABC-transzporterek) – ugyanis összehangoltan, az immunrendszer működésére emlékeztető módon képesek a sejtet megvédeni a számára káros xenobiotikumoktól, így a kemoterápiás szerektől is. *További célom volt ezért egy olyan modell és adatbázis megalkotása, mely a kemoimmunitási rendszer és különösen az ABC-transzporterek működésének jobb megértéséhez járul hozzá.*

Felhasznált módszerek

Mivel a mitózist szabályozó molekuláris hálózat megértéséhez annak komplexitása miatt többnyire elégtelen az intuíciókra alapozó verbális érvelés, munkámhoz a biokémiai reakciókinetika törvényei alapján készített matematikai modelleket és azok vizsgálatát hívtam segítségül⁹. A modellezéshez használt bemeneti információk laboratóriumi kísérletekből származnak. A kísérleteket nem én végeztem, hanem mások által – cikkekben és biológiai adatbázisokban – publikált eredményeket használtam fel. Első lépésként – mintegy az egyes molekuláris szereplőkről szerzett információk szintéziseként – felvázoltam a kölcsönható molekulák *hálózati diagramját*. A hálózati diagram alapján, a biokémiai

-
- 8 Sarkadi B., Homolya L., Szakács G. and Váradi A. (2006) Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* 86, 1179-1236.
- 9 Tyson J. J., Chen K. and Novak B. (2001) Network dynamics and cell physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 908-916.

reakciókinetika törvényeinek felhasználásával egyenleteket írtam minden lényeges komponens koncentrációjának időbeli változására. Az egyenletek (melyek többnyire közönséges, nemlineáris differenciálegyenletek), a bennük szereplő paraméterek és a hozzájuk tartozó kezdeti feltételek összessége alkotja a *matematikai modellt*. Az egyenletrendszer numerikus megoldásával *időbeli szimulációkat* végeztem, azaz meghatároztam az egyes komponensek koncentrációjának időbeli változását. Az egyenletrendszer integrálására a nyílt forráskódú, szabadon elérhető XPPAUT¹⁰ program 6.10-es verzióját használtam. A modell viselkedését tovább vizsgáltam a *dinamikai rendszerek eszközeivel: fázissík- és bifurkációs analízissel*. Az így kapott eredményeket összevettem a kiindulási adatok forrásául szolgáló laboratóriumi kísérletek eredményeivel. Amennyiben a mért és a modell által jósolt viselkedés egybevágott, feltételeztem, hogy a modell kielégítő módon ragadja meg a vizsgált biológiai jelenség lényegét. Ellenkező esetben – ha a modell paramétereinek változtatása nem volt elég a kísérletes és a modell által mutatott viselkedés összhangba hozására – feltételeztem, hogy a hálózati diagram nem eléggé tükrözi a valós biológiai kapcsolatokat, ezért változtatásra szorul. A hálózati diagram és az érintett egyenletek módosítása után újabb szimulációkat végeztem. Addig ismételttem újra és újra ezeket a lépéseket, míg a kísérletes és a modell által mutatott eredmények kellő egyezést nem mutattak¹¹.

Eredmények

Munkám során a korai mitózisnak és a mitózis befejezésének vizsgálatára egyaránt hangsúlyt fektettem. Először az APCP:Cdc20 komplex szabályozását (azaz elsősorban a korai mitózis eseményeit) vizsgáltam az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) korai embrionális ciklusainak modellezésével. Ezt követően a sarjadzó élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) mitózisának modellje segítségével (melyben már az APC:Cdh1 komplex, a Cdc14, a FEAR- és a MEN-útvonal is fontos szerepet kapnak) elsősorban a mitózis befejezésének kutatására fókuszáltam. A folytatásban megvizsgáltam az előreccsatolási hurkok szerepét a mitózis befejezésében. Végül pedig elkészítettem a kemoimmunitási rendszer modelljét és részt vettem az ABC-transzporterek mutációs adatbázisának fejlesztésében.

10 Az XPPAUT a <http://www.math.pitt.edu/~bard/xpp/xpp.html> címen érhető el.

11 Tyson J. J., Csikasz-Nagy A. and Novak B. (2002) The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays* 24, 1095-1109.

Az APCP:Cdc20 szabályozása *Xenopus laevis*ben

Az APCP:Cdc20 komplex szabályozásának vizsgálatához egyszerűsége miatt a *Xenopus laevis* embrionális ciklusainak modelljét választottam. Tyson és Novak 2001-es modelljéből¹² eltávolítottam az intermedier enzimet, az APCP:Cdc20 késleltetett aktiválásáért pedig egy, a molekuláris eseményeket feltehetően hűbben tükröző mechanizmust, az MPF-nek az APC magra és a Cdc20-ra kifejtett, ellenkező hatású és eltérő sebességű foszforilezését tettem felelőssé (1. ábra). Így az MPF-ben lévő B-ciklint ubikvitinező APCP:Cdc20 komplex az MPF kettős szabályozása alatt áll: az MPF foszforilezés által aktiválja az APC magot és inaktíválja a Cdc20-at¹³. Mivel az inaktív formáknak csökkent affinitása van egymáshoz, a modellben az egyszerűség kedvéért csak az APCP és a Cdc20 formák képesek egymással aktív, ubikvitin-ligáz aktivitással bíró APCP:Cdc20 komplexet képezni.

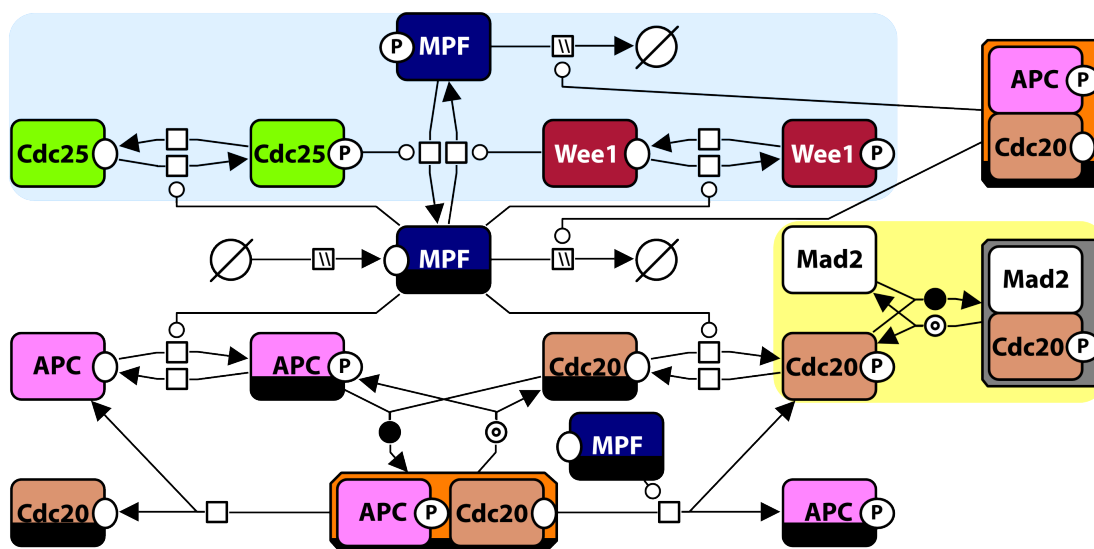
A modellel végzett időbeli szimuláció stabilis határciklusos oszcillációkat mutat. Ennek oka az APC mag és a Cdc20 eltérő sebességű foszforilezésében és defoszforilezésében gyökeredzik. A Cdc20 foszforilezése és defoszforilezése egyaránt gyors, hozzá képest az APC egyaránt lassabban foszforileződik illetve defoszforileződik. Ezért először az MPF gátló hatása érvényesül és csak később az aktiváló. Ennek hatására létrejön egy olyan 10-20 perces időablak, melyben az MPF aktivitása magas marad, így le tudnak játszódni a korai mitózis eseményei. Végül a növekvő APCP:Cdc20-koncentráció a B-ciklin gyorsuló lebontásán keresztül az MPF inaktíválódásához és a mitózisból való kilépéshez vezet.

A következő lépésben a modellt kiegészítettem a Mad2 fehérjével és a magorsó ellenőrzési pont leírásával, azzal az egyszerűsítő feltételezéssel élve, hogy az ellenőrzési pont aktiválódásakor a Mad2 a foszforilezett Cdc20P-vel történő komplexképzés révén blokkolja a sejtciklus előrehaladását (1. ábra). Időbeli szimulációval sikerrel modelleztem Li és munkatársai azon kísérletét¹⁴, melynek során *Xenopus laevis* embriók kivonatában rekombináns Mad2 hozzáadásával aktiválták a magorsó ellenőrzési pontot. Fázissík-analízis céljából elkészítettem ezen modell két dinamikus változóra egyszerűsített változatát is. Rávilágítottam, hogy a ciklizáló embrionális kivonatot modellező rendszer egyetlen stabilis attraktora határciklusos oszcillációt mutat, mely az említett kísérletben a magorsó ellenőrzési pont aktiválásakor megszűnik és a rendszer egyetlen stabilis állapotává egy egyensúlyi pont

12 Tyson J. J. and Novak B. (2001) Regulation of the eukaryotic cell cycle: molecular antagonism, hysteresis, and irreversible transitions. *J Theor Biol* 210, 249-263.

13 A foszforilezett Cdc20-at Cdc20P-vel jelölöm.

14 Li Y., Gorbea C., Mahaffey D., Rechsteiner M. and Benezra R. (1997) MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 12431-12436.



1. ábra. A *Xenopus laevis* korai embrionális ciklusait leíró modellek hálózati diagramja. Sárga háttér: a magorsó ellenőrzési pont modulja. Kék háttér: MPF-foszforilezési modul.

válik, melyben a magas MPF-aktivitás miatt nem képes annyi defoszforilezett Cdc20 képződni, mely az APC-maggal aktív komplexet képezve elegendő lenne a mitózisból történő kilépéshez. Bifurkációs analízis segítségével megmutattam, hogy a magorsó ellenőrzési pont aktiválódása háttérben a szabályozórendszer végtelen periódusú (homoklinikus) nyereg-hurok bifurkációja állhat.

Mivel újabb kísérletek tanúsága szerint az MPF-et gátló foszforilezés is szerepet játszhat a *Xenopus laevis* korai embrionális ciklusainak szabályozásában, ezért egy MPF-foszforilezési modullal is kiegészítettem a modellt, mely a Wee1-kináz és a Cdc25-foszfátáz tartalmazza (1. ábra). Ez a modul már több korábbi, a *Xenopus laevis* embrionális kivonatának modellezésére létrehozott modellben szerepelt^{15,16}, matematikai leírása azonban nem felelt meg maradéktalanul a Michaelis–Menten-kinetika alkalmazhatóságának azon kritériumának, mely szerint az enzim mennyisége elhanyagolható kell legyen a szubsztráthez képest. A nehézség abból fakad, hogy a Wee1 és a Cdc25 bizonyos reakciókban mint enzimek, másokban viszont mint szubsztrátok szerepelnek. Ezért a Wee1 és a Cdc25 koncentrációváltozásának leírására az 1993-as modellel ellentétben nem a Goldbeter–Koshland-függvényt alkalmaztam. Enzimkinetikai leírást csupán a Wee1 és a Cdc25 – konkrétan meg nem nevezett foszfatázok általi – defoszforilezésére használtam, minden más reakciót a

15 Novak B. and Tyson J. J. (1993) Numerical analysis of a comprehensive model of M-phase control in *Xenopus* oocyte extracts and intact embryos. *J Cell Sci* 106 (Pt 4), 1153-1168.

16 Marlovits G., Tyson C. J., Novak B. and Tyson J. J. (1998) Modeling M-phase control in *Xenopus* oocyte extracts: the surveillance mechanism for unreplicated DNA. *Biophys Chem* 72, 169-184.

tömeghatástörvény alapján írtam le. Az így kapott egyenletek megfelelnek a Michaelis–Menten-kinetika alkalmazhatósági feltételeinek. A bővített modellel időbeli szimulációt és bifurkációs analízist végeztem, melyek a modell korábbi verzióival kapottakhoz hasonló, ám némileg eltérő eredményre vezettek. Megnőtt a G1 és az S fázis hossza, az MPF-oszcilláció periódusideje és amplitúdója. A mitózisból való kilépés pedig ezúttal egy végtelen periódusú nyereg-csomó bifurkációval hozható kapcsolatba.

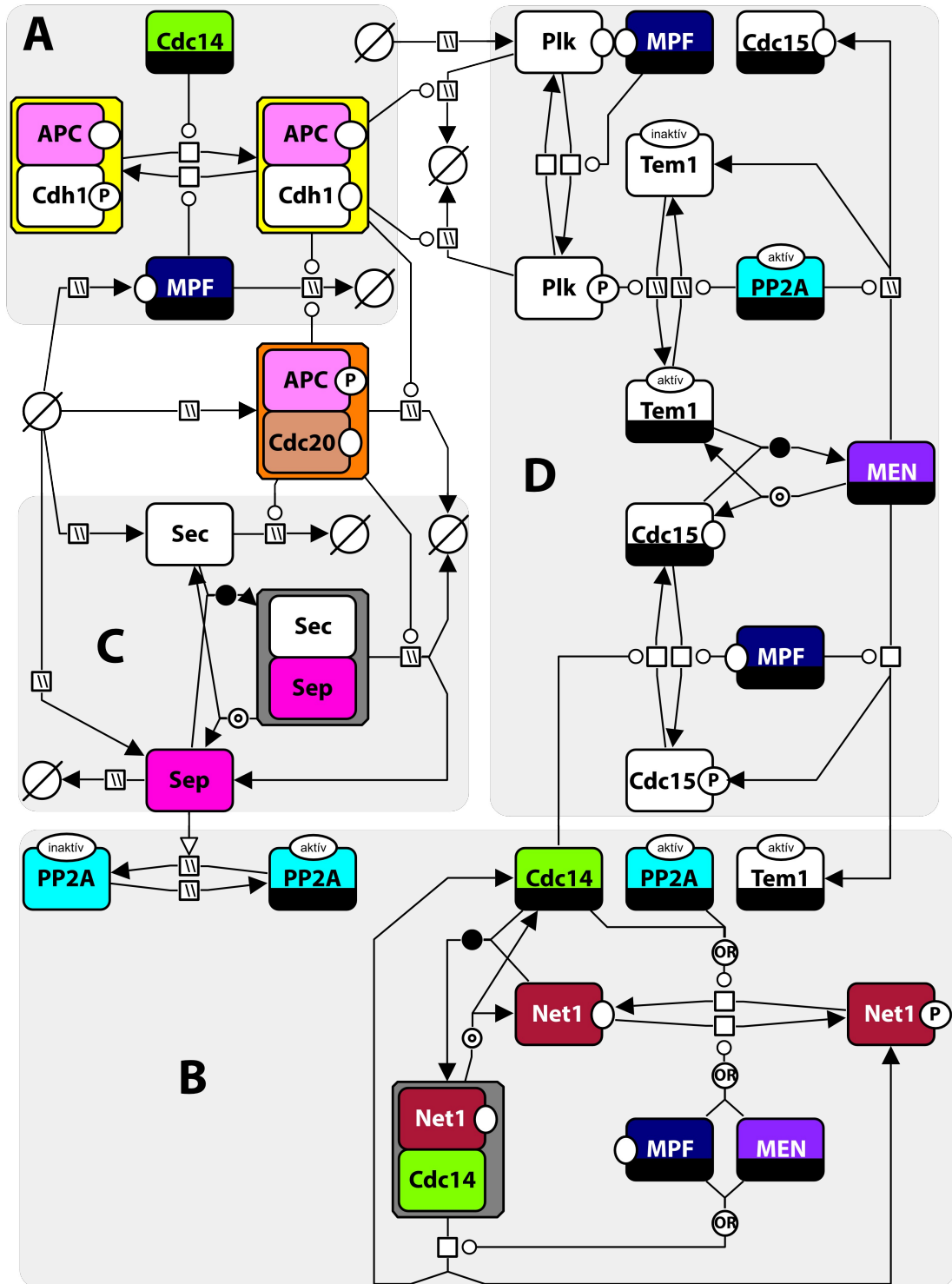
A mitózis befejezése sarjadzó élesztőben

A mitózis befejezésének vizsgálatához olyan organizmust kerestem, melyben a *Xenopus laevis* embrionális ciklusaiban megfigyelhetőnél összetettebb szabályozórendszerek működnek. Választásom a sarjadzó élesztőre esett, melyben a PP2A és a Cdc14 foszfatázok, az utóbbi által aktivált APC:Cdh1, továbbá az aktiválás mechanizmusában szerepet játszó FEAR és MEN útvonalak egyaránt tanulmányozhatók (2. ábra). Munkám kiindulópontjául Queralt és munkatársainak 2006-ban publikált modellje¹⁷ szolgált, mellyel *időbeli szimulációk* segítségével sikerrel modellezték több, a mitózis befejezését szabályozó mechanizmusokban sérült sarjadzó élesztő mutáns viselkedését. Elkészítettem, majd *fázissík-analízis* segítségével elemeztem ezen modell két *dinamikai változóra egyszerűsített változatát*.

Ez a modell nem a teljes sejtciklus, hanem az anafázis kezdetétől (magas MPF aktivitással jellemezhető állapot) *a mitózis befejezéséig* (alacsony MPF aktivitással jellemezhető állapot) lejátszódó események leírására készült, ezért nem tartalmazza az MPF-foszforilezési modult. Szerepel viszont benne a FEAR és a MEN útvonalak több komponense, melyeket fokozatosan vezettem be, az egyszerűbbtől a bonyolultabb modellek felé haladva. Minden egyes lépésben két, egymással szoros kapcsolatban álló modellt készítettem. Az egyik modellsorozat modelljeivel – melyek többnyire közönséges nemlineáris differenciálegyenletek segítségével írják le a komponensek koncentrációjának időbeli változását – időbeli szimulációkat végeztem. A másik modellsorozat az előző sorozat megfelelő modelljéből egyszerűsítő feltételezések segítségével készített „kétdimenziós” modelleket tartalmaz, melyekkel az MPF–Cdc14 fázissíkon követtem nyomon a rendszer viselkedését. Az időbeli szimulációk és a megfelelő fázisportrék eredményét, ahol csak tudtam, a szakirodalomból gyűjtött laboratóriumi kísérletek eredményeivel vettem össze.

Fázissík-analízis segítségével rámutattam, hogy a mitózis befejezéséhez a rendszernek az MPF–Cdc14 fázissíkon egy nyereg-csomó bifurkáción kell

¹⁷ Queralt E., Lehane C., Novak B. and Uhlmann F. (2006) Downregulation of PP2A(Cdc55) phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell* 125, 719-732.



2. ábra. A sarjadzó élesztő mitózisának befejezését leíró modellek hálózati diagramja. A modul: az MPF és az APC:Cdh1 antagonizmusa. B modul: a Cdc14-aktivitás szabályozása a Net1 által. C modul: a szeparáz szabályozása a szekurin által. D modul: a MEN-útvonal.

keresztülmennie, melyhez a Cdc14-aktivitásnak meg kell haladnia egy adott küszöbértéket. A továbbiakban a FEAR-útvonal szerepét kutatva MEN-mutánsok fázissík-analízisével elemeztem korábbi laboratóriumi kísérletek eredményét. Kimutattam, hogy a szeparáz ektopikus túltermeltetése vagy az APCP:Cdc20 aktiválása ugyan – a kísérletekkel összhangban tartósan vagy időlegesen – a Cdc14-szint emelkedését okozza, mely azonban nem éri el a mitózisból való kilépéshez szükséges küszöbszintet, ezért a sejt mitózisban reked meg.

Ezt követően a MEN-útvonal szerepére fókuszáltam. Fázissík-analízissel megállapítottam, hogy a mitózis befejezésének időzítése egy gátló és egy aktiváló MPF-küszöbszint függvénye. A gátló küszöbszint a MEN-útvonal egy downstream komponensének, a Cdc15 protein-kináz MPF általi inaktiválásának a következménye, az aktiváló küszöbszint pedig egy upstream MEN-komponens, a Tem1 GTP-áz MPF általi aktiválásával függ össze. A mitózisból történő kilépéshez az MPF-aktivitásnak a gátló küszöbszint alatt, ám egyúttal az aktiváló küszöbszint felett kell lennie.

Rámutattam arra is, hogy a mitózisból való kilépés a szabályozórendszer két bistabilis kapcsolójának egymást követő, meghatározott sorrendben történő irreverzibilis átmenete révén valósul meg, melyhez vad típusú sejtekben az APCP:Cdc20 mindkét szubsztrátjának lebontása esszenciális. Először a szekurin degradációja a FEAR-útvonalon keresztül „bekapcsolja” a Cdc14 és a MEN közötti pozitív visszacsatolási kört, azaz aktiválja a MEN-útvonalat, mely a Cdc14 nukleoluszból történő teljes felszabadulásához vezet. A ciklinek lebontása az MPF-nullklína mitózisból való kilépéshez szükséges Cdc14-küszöbszintjének csökkenését okozza. A Cdc14 aktiválódásának és a Cdc14-küszöbérték csökkenésének együttes következménye a másik bistabilis kapcsoló irreverzibilis átmenete, melynek során MPF teljesen inaktiválódik, az APC:Cdh1-aktivitás pedig megemelkedik. E két bistabilis kapcsoló összehangolt működése biztosítja a mitózisból való kilépés robusztus, megbízható szabályozását.

Az előrecsatolási hurkok szerepe a mitózis befejezésében

Az előrecsatolási hurkok a mitózis késői szakaszában és a G1-fázisban megfigyelhető expressziós hullám szabályozásában betöltött szerepének vizsgálatához olyan modellt készítettem, mely egy egyszerű sejtciklusmodellből, valamint két TF-ből és két VF-ből áll. Az egyenletek a (+ + / -) és a (- - / -) típusú előrecsatolási hurkokat írják le, figyelembe véve, hogy a foszforilezés és a fehérjeszintézis nagyságrendileg eltérő időskálán megy végbe. A modellel végzett időbeli szimuláció tanúsága szerint az említett típusú előrecsatolási hurkokban szereplő VF-k tranziens módon aktiválódnak, csak és kizárólag a mitózis befejezésekor. A mitózis befejezésekor

hirtelen lezuhanó MPF-aktivitás miatt ugyanis megszűnik a rövid karon keresztül érvényesülő, kizárólag VF-k foszforilezésén alapuló, tehát a másodperces időskálán működő gátló hatás. Mivel a hosszú karon keresztül történő aktiválásban a fehérjeszintézisnek is szerepe van, ez a hatás a néhány perces időskálán érvényesül, ezért lassabban szűnik meg, mint a rövid karon keresztüli gátlás. Megállapítható tehát, hogy a (++/-) és a (--/-) típusú előrecsatolási hurkok a sejtciklus szabályozórendszerének egy általánosan használható hálózati motívumát alkotják, melyek segítségével a sejt a mitózis befejezésekor képes lehet végrehajtó fehérjék tranziens aktiválására.

A mitózis és a kemoimmunitási rendszer kapcsolatának vizsgálata

A kemoterápiás szerek sejtciklusra gyakorolt hatásának alaposabb megértéséhez elkészítettem a kemoimmunitási rendszer reakciókinetikai modelljét és részt vettem az ABC-transzporterek mutációs adatbázisának fejlesztésében. A modell egyetlen gyógyszerhatóanyag kölcsönhatását képes leírni két ABC-transzporterrel, egy citokróm-oxidázzal és egy glutation-transzferázzal, melyek transzkripció és transzláció előre- illetve visszacsatolási hurkokon keresztül megvalósuló szabályozását is tartalmazza. A gyógyszerhatóanyag és metabolitjainak toxicitásának figyelembe vétele által a toxikus terhelésből fakadó sejtpusztulás aspektusainak elemzésére is alkalmas.

Az ABC-transzporterek mutációs adatbázisának létrehozásához először a MutMiner¹⁸ adatbányászati keretrendszert fejlesztettük ki, mely nagy pontossággal és érzékenységgel képes fehérjék mutációinak leírását azonosítani PDF fájlokban. Ezt követően a MutMiner segítségével a PubMed adatbázison keresztül letöltött cikkekből összegyűjtöttük az ABC-szuperfamilia A, B, C, D és G alcsoportjaiba tartozó fehérjék mutációit. Módszerünkkel az egyéb adatbázisokban fellelhető mutációk 80%-át sikerült megtalálnunk és ezen túl számos, ezen adatbázisokban nem szereplő mutációt is azonosítottunk. Az így nyert mutációkat a <http://abcmutations.hegelab.org> címen nyilvánosan elérhető ABCMdb adatbázisban tettük közzé. A webes felületen lehetőség van mutációk keresésére, böngészésére, a fehérjék három dimenziós szerkezetén való megjelenítésére és más ABC-fehérjék homológ pozícióiban található aminosavakkal való összevetésére.

¹⁸ A MutMiner a <http://mutminer.hegelab.org> címen érhető el.

Tézisek

1. Kidolgoztam egy új reakciókinetikai modellt az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) korai embrionális ciklusainak mitózisának a vizsgálatára, mely a korábbi hasonló modellekben modellezéstechnikai okokból használt, ám kísérletekkel kellően alá nem támasztott intermedier enzim (IE) feltételezése nélkül magyarázza az APCP:Cdc20 komplex aktiválódásában megfigyelhető időkésltetést. A változtatást az MPF Cdc20-ra gyakorolt gátló foszforilezésének elsőként alkalmazott matematikai leírása teszi lehetővé, ugyanis így az MPF két ellentétes, ám eltérő időskálán működő hatással van az APCP:Cdc20 komplexre, és ez az embrionális sejtciklusok leírására jól használható határciklusos oszcillációk kialakulásához vezethet (Ciliberto *et al.*, 2005).
2. A *Xenopus laevis* korai embrionális ciklusainak leírására készített modellt kiegészítettem a magorsó ellenőrzési pont egyszerű leírásával, majd elkészítettem a bővített modell két dinamikus változóra egyszerűsített változatát is. Fázissík-analízissel megmutattam, hogy a ciklizáló embrionális kivonatot modellező rendszer egyetlen stabilis attraktora a határciklusos oszcilláció, mely Mad2 hozzáadásakor megszűnik és a rendszer egyetlen stabilis állapotává egy magas MPF- és magas APCP-szinttel jellemezhető egyensúlyi pont válik, mely a mitózisban való megrekedésre utal. Bifurkációs analízis segítségével megmutattam, hogy a magorsó ellenőrzési pont aktiválódása hátterében a szabályozórendszer végtelen periódusú (homoklinikus) nyereg-hurok vagy végtelen periódusú nyereg-csomó bifurkációja állhat (Ciliberto *et al.*, 2005).
3. A *Xenopus laevis* korai embrionális ciklusainak leírására készített modellt tovább bővítettem az MPF Wee1 általi gátló foszforilezésének leírásával. A korábbi modellekben gyakorta használt matematikai leírással szemben – mely nem felel meg maradéktalanul a Michaelis–Menten-kinetika alkalmazhatósági feltételeinek – a tömeghatástörvény és az enzimkinetikai leírás egy olyan kombinációját alkalmaztam, mely az említett feltételnek is eleget tesz (Ciliberto *et al.*, 2005).
4. Elkészítettem a sarjadzó élesztő mitózisának vizsgálatára Queralt és munkatársai által készített modell (2006) két dinamikai változóra egyszerűsített változatát. Az MPF–Cdc14 fázissík analízisével rámutattam, hogy a mitózis befejezéséhez a rendszernek egy nyereg–csomó bifurkáción kell keresztülmennie, melyhez a Cdc14-aktivitásnak meg kell haladnia egy adott küszöbértéket. Kimutattam egy gátló és egy aktiváló MPF-küszöbszint

- létezését is, és megmutattam, hogy a mitózisból történő kilépéshez az MPF-aktivitásnak e két küszöbszint között kell lennie (Tóth *et al.*, 2007).
5. Rámutattam, hogy sarjadzó élesztőben a mitózisból való kilépés a szabályozórendszer két bistabilis kapcsolójának egymást követő, meghatározott sorrendben történő irreverzibilis átmenete révén valósulhat meg, melyhez vad típusú sejtekben az APCP:Cdc20 mindkét szubsztrátjának lebontása esszenciális. A mitózisból való kilépés robusztus, megbízható szabályozását e két bistabilis kapcsoló összehangolt működése biztosítja (Tóth *et al.*, 2007).
 6. Kidolgoztam egy olyan modellt, melynek segítségével a (+ + / -) és a (- - / -) típusú előreccatolási hurkok szerepe vizsgálható a mitózis befejezésében. A modellel végzett időbeli szimuláció segítségével rámutattam, hogy ezek az előreccatolási hurkok olyan hálózati motívumokat alkotnak, melyek általános szerepet tölthetnek be a mitózis befejezésekor tranzienst módon aktiválódó fehérjék szabályozásában (Csikász-Nagy *et al.*, 2009).
 7. Részt vettem az ABC-traszporterek mutációs adatbázisának fejlesztésében. Az ABCMdb a más adatbázisokból elérhető mutációk nagy részén túl számos, más adatbázisokban nem megtalálható mutációt tesz egyszerűen elérhetővé bárki számára (Gyimesi *et al.*, 2013).

Alkalmazási lehetőségek

Doktori munkám során a korábbiakhoz képest részletesebb, feltehetően biológiailag adekvátabb, és több szempontból matematikailag is helytállóbb modelleket készítettem a korai mitózis és a mitózis befejezésének leírására. E modellek legfontosabb haszna a mitózist szabályozó molekuláris hálózat működésének dinamikai szempontból mélyebb megértése, mely a további kutatások szempontjából gondolkodásformáló erővel bír. A hipotetikus intermedier enzim és az egyes korábbi modellekben nem teljesen megalapozottan használt Michaelis–Menten-kinetika kiváltására alkalmazott modellezési fogások felhasználhatók a már meglévő kinetikai modellek továbbfejlesztése, illetve új modellek kidolgozása során. Eredményeim a további kutatásra is inspirációt adhatnak. Például az általam kifejezetten csak a mitózis eseményeinek vizsgálatára létrehozott modellek általános sejtciklusmodellekbe történő beépítése kiváló lehetőség lehet a teljes sejtciklus realiztikusabb modellezésére. A kemoimmunitási rendszer modelljének sejtciklusmodellekkel való összekapcsolása pedig a kemoterápiás szerek fejlesztése során bizonyulhat hasznosnak.

Közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- CILIBERTO A., LUKÁCS A., TÓTH A., TYSON J. J. AND NOVÁK B. (2005) Rewiring the exit from mitosis. *Cell Cycle* 4, 1107-1112. (IF 2006 (2005-ben még nem volt IF-a): 3,214; I: 16)
- TÓTH A., QUERALT E., UHLMANN F. AND NOVÁK B. (2007) Mitotic exit in two dimensions. *J Theor Biol* 248, 560-573. (IF 2007: 2,323; I: 17)
- CSIKÁSZ-NAGY A., KAPUY O., TÓTH A., PÁL C., JENSEN L. J., UHLMANN F., TYSON J. J. AND NOVÁK B. (2009) Cell cycle regulation by feed-forward loops coupling transcription and phosphorylation. *Mol Syst Biol* 5, 236. (IF 2009: 12,125; I: 31)
- GYIMESI G., SARANKÓ H., TORDAI H., TÓTH A., BORSODI D., SARKADI B. AND HEGEDŰS T. (2013) ABC fehérjék szövegbányászaton alapuló mutációs adatbázisa. *Biokémia* 37, 15-24.

Konferencia poszterek

- TÓTH A., CSIKÁSZ-NAGY A. AND NOVÁK B. Modelling the transition between mitotic and meiotic differentiation in fission yeast. *6th European Conference on Mathematical and Theoretical Biology*, Drezda, Németország, 2005. július 18-22.
- TÓTH A., QUERALT E., UHLMANN F. AND NOVÁK B. Mitotic exit in two dimensions. *International Specialised Symposium on Yeasts ISSY25*, Hanasaari, Espoo, Finnország, 2006. június 18-21.
- TÓTH A., QUERALT E., UHLMANN F. AND NOVÁK B. Mitotic exit in two dimensions. *Computational Cell Biology Meeting*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, USA, 2007. március 6-9.

Konferencia előadás

- TÓTH A. A sztereociliumok hossz-szabályozásának modellezése. *Doktoráns konferencia*, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, 2006. február 7.

