



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

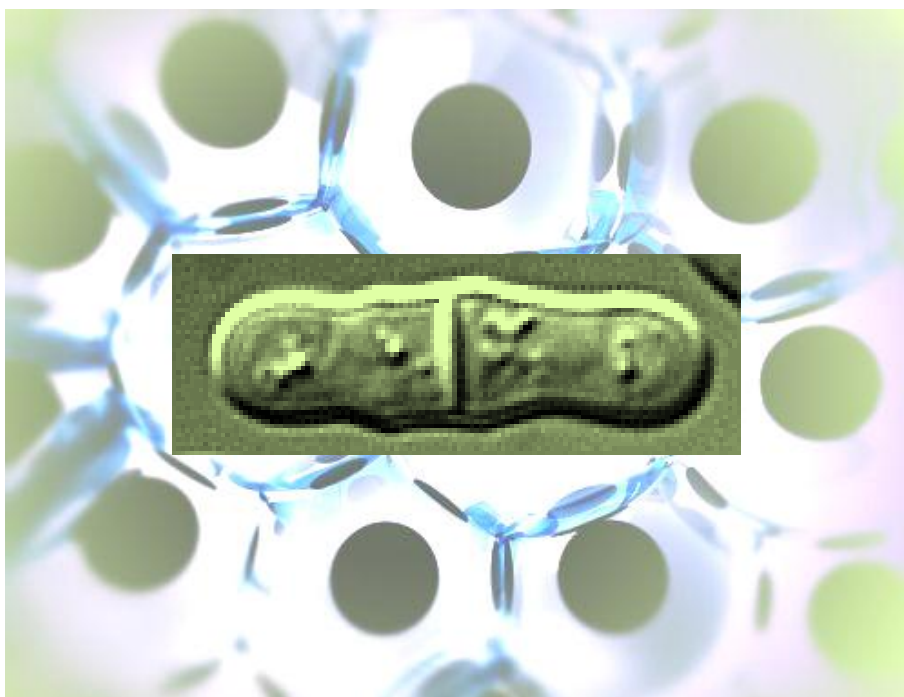
A hasadó élesztő G_1 -fázisú méretkontrolljának vizsgálata matematikai modellezéssel

OTDK dolgozat

Készítette: **Lovász Krisztina**

IV. éves biomérnök hallgató

Témavezető: **Dr. Sveiczer Ákos** egyetemi docens



A dolgozat bemutatását a TÁMOP - 4.2.2. B-10/1--2010-0009 "Újtechnológiagondozó programok és kutatások a Műegyetem tudományos műhelyeiben" című program támogatta.

Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, 2012.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Az eukarióta sejtciklus	6
2.2. A sejtciklus szabályozása.....	12
2.3. A sejtciklus szabályozás molekuláris mechanizmusa	14
2.4. A méretkontrollt meghatározó egyéb tényezők	19
2.5. A sejtciklus mutánsok	20
2.6. Szinkronizálási módszerek.....	21
2.7. A hasadó élesztőben működő molekuláris hálózat	21
2.8. A sejtmag térfogatának változása a sejtciklus során.....	25
2.9. A sejtciklus modellezése.....	26
3. Célkitűzések.....	28
4. Vizsgálati módszerek.....	29
4.1. Felhasznált szoftverek.....	29
4.2. A matematikai modellezés	30
4.3. Egyszerűsítések a modellben	31
4.4. A sejtciklus vizsgálatának módszerei	31
4.4.1. A méretkontroll vizsgálata	31
4.4.2. Bifurkációs diagram	33
5. Eredmények	34
5.1. Modell-A.....	34
5.1.1. Paraméter optimalizálás	35
5.1.2. A vad típusú sejt analízise	37
5.1.3. Bifurkációs diagramok vad típus esetén.....	40
5.1.4. A <i>wee1⁻</i> mutáns sejt analízise.....	41
5.1.5. Bifurkációs diagramok <i>wee1⁻</i> mutáns sejt esetén	44
5.2. Modell-B.....	45
5.2.1. A dominánsabb protein meghatározásának menete	46
5.2.2. Vad típusú sejt analízise.....	47
5.2.3. Bifurkációs diagramok vad típusú sejt esetén	48
5.2.4. A <i>wee1⁻</i> mutáns sejt analízise.....	49
5.2.5. Bifurkációs diagramok <i>wee1⁻</i> mutáns sejt esetén	51

6. Összefoglalás	53
7. Irodalomjegyzék	54
8. Függelék	56
9. Köszönetnyilvánítás.....	68

1. Bevezetés

A természetben fellelhető rendszerek sokszor nagyon hasonló elven működnek. A jelenséget nagyon jól szemlélteti Novák Béla professzor által leírt hasonlat, ami a sejt és egy vegyi gyár működését hozza párhuzamba. Ahogy gyárban a gépek végzik a termékek előállítását, úgy a sejtekben bizonyos fehérjék, az enzimek végzik a kémiai átalakításokat (Novák, 1998).

A mai gyárakban azonban nemcsak egy-két gép van, hanem gépsorok, amik egymással is kapcsolatban állnak. Ahhoz, hogy egy gyár működését megismerjük, gépsorokból felépülő rendszert kell megismernünk. Lefordítva a sejtek viselkedésére: életciklusuk szabályozása fehérjékből felépülő biokémiai hálózattal történik. Ez a rendszer egy rendkívül bonyolult, az eukarióta organizmusokra nézve evolúciósan igen konzervált molekuláris hálózat, melynek alapvető egységei már 1,5 milliárd éve megjelenhettek. Minden élő organizmus – az egysejtű baktériumoktól a többsejtű emlősökig - a folyamatosan ismétlődő sejtnövekedés és sejtosztódás eredménye az élet megjelenésére, azaz több mint 3 milliárd évre visszanezve (Alberts et al., 2009). A méretkontroll rendkívül fontos, hogy az egymást követő generációkban lévő sejtek azonos méretűek maradjanak.

A sejtciklus szabályozásának megértése modellorganizmusok használatával a leg-egyszerűbb. Gyakran használják erre a célra, például az egysejtű élesztőgombákat (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*) több ok miatt is. Az érvek a következők: egyszerűbb felépítésű szabályzó rendszerük van, genetikai térképezésre alkalmasak (Turner et al., 2012). A korai embrionális sejtek (pl. *Xenopus laevis*) különlegesen jó vizsgálati rendszernek bizonyulnak a sejtet M fázisba vezető fehérje aktivitására nézve (Morgan, 2007). A hasadó élesztőként is ismert *Schizosaccharomyces pombe* kiváló modell-organizmusként szolgál jellegzetes fiziológiai tulajdonságai (pl. szimmetrikus osztódás) miatt is a sejtciklus tanulmányozására. Használatának jelentőségét növeli az is, hogy teljes genomja 2002 óta ismertté vált (Wood et al., 2002), továbbá 2001-ben az orvosi Nobel-díjat három olyan kutatónak (Leland Hartwell, Tim Hunt, Paul Nurse) ítelték, akik munkájuk során a sejtciklus szabályozásának megértésében tettek nagy lépéseket. Közülük Nurse szinte csak a hasadó élesztő sejtciklusának működésével foglalkozott munkája során.

A matematikai modellezés során az említett molekuláris hálózat tagjai (gének, fehérjék és molekulák) közötti kapcsolatot írjuk le. Tehát a releváns tagokra kinetikai egyenletet írunk fel, ami a szintézist, lebomlást, aktiválást tartalmazza. Így egy bonyolult differenciál

egyenle- tekből felépülő rendszert kapunk. A matematikai modellt kísérletes eredményekre illesztjük rá. Ideális esetben a két külön módszerrel kapott eredmény megegyezne, de ez gyakorlatilag nem érhető el. A modell változtatása addig szükséges, míg megfelelő egyezést mutatnak a kísérletes adatok a szimulációval kapott eredményekkel.

A dinamikai rendszer állapotát adott számú állapotjelző írja le. A dinamikai rendszer időbeni viselkedése determinisztikus, azaz adott pillanatban egyetlen állapotot vehet fel. Az állapot kifejezés alatt egy periodikus oszcillációt kell érteni a sejtciklus tanulmányozásakor. Ezt a viselkedést kihasználva kísérletes adatokkal nem rendelkező komponensek mennyiségét tudjuk meghatározni a sejtciklusban, azaz meg tudjuk jósolni olyan mutánsok viselkedését, amit elő sem állítottak.

Egyes kutatók szerint a sejtciklus szabályozásának megértése más okból is fontos. Ugyanis hozzájárulhat a rák kezelésére alkalmas gyógymódok kifejlesztéséhez (Nasmyth, 2001). Ha a hasadó élesztő sejtciklusához hasonlóan modelleznénk az emberi sejt osztódását – a helyzetet az egyéb szöveti szignálok jelenléte bonyolítja ugyan – akkor térképet kapnánk a szabályozási folyamatban szereplő fontos fehérjékről. Koncentrációjuk változására differenciál egyenletek illesztve számszerűsíthetjük az egyes fázisokban lévő mennyiségüket. Ezáltal információt kapunk, hogy pl. mely gének felelősek a szöveti kontroll beindításáért, ami a hibás sejtet G_0 -fázisba juttatja. A daganat kialakulásakor azonban pont ez a szignál megy tönkre, tehát valami kikapcsolja. A matematikai modellezés determinisztikus illetve olcsó tulajdonságát vizsgálva meghatározhatnánk a daganatos változást okozó fontos géneket, melyek mutálódása okozza a hibás sejtek burjánzását. Ha ismerjük az ellenséget, akkor már megoldást is találhatunk a problémára, pl. ezen fehérje szintézisét gátló gyógyszer alkalmazásával.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az eukarióta sejtciklus

A sejt az élet funkcionális és strukturális, önreprodukcióra képes alapegysége. Egy sejt születése pillanatától az osztódásig tartó folyamatok (pl. sejtnövekedés, kromoszóma replikáció, kromoszóma szegregáció) összességét sejtciklusnak hívjuk (1. ábra) (Alberts et al., 2009). Osztódás után keletkező két utódsejt hosszú távú fennmaradásához elengedhetetlen, hogy a sejt méretét, kromoszómakészletét, fehérjéit, egyéb sejtalkotóit megkettőzzék és mindezen felsorolt molekulákat egyenletesen eloszlassa a két leánysejt között. A sejtciklus egyes eseményei diszkrét, azaz szigorú sorrendben kell lejátszódnia: először a replikációnak, majd a mitózisnak és végül a sejtosztódásnak kell megtörténnie. Arról, hogy pontosan egymás után következzenek ezek az események, fehérjékből felépülő molekuláris hálózat gondoskodik. A sejtciklust két egymástól elkülöníthető ciklusra bonthatjuk. A sejtciklus jelentős része a sejtmagban játszódik le (pl. replikáció). Ezt nukleáris vagy más néven kromoszómás ciklusnak is hívják. Rendkívül fontos ebben a ciklusban a pontosság. Ha nem precíz az esemény, annak végzetes következményei is lehetnek a sejt utódjaira nézve. A mitózis nem a sejtmagban játszódik ugyan le, mivel a sejtmag lebomlik, de mégis logikailag a nukleáris ciklushoz tartozik. A citoplazmás ciklus során a sejt megduplázza tömegét és sejtalkotóit. Ezen események folyamatosan mennek végbe, és nem precíz sem a sejt növekedése, sem osztódása: a sejt osztódáskori mérete nem lesz tökéletesen a születéskori méretének kétszerese.

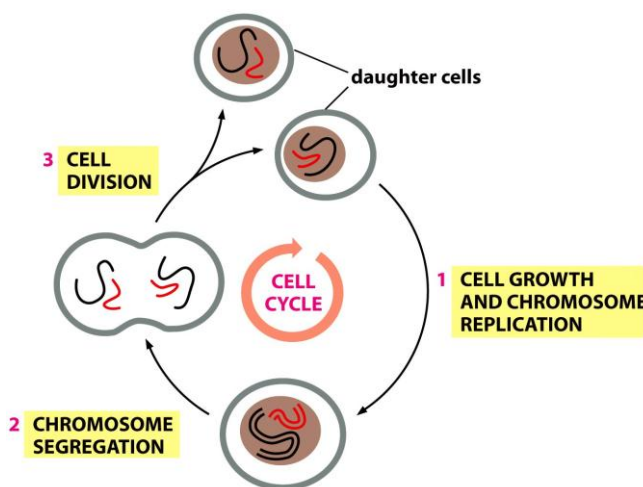


Figure 18-1. *Essential Cell Biology* (© Garland Science 2010)

1. ábra:
Az eukarióta sejtciklus (Alberts et al., 2009).

A sejtciklust két fő részre is bonthatjuk: M-fázisra és interfázisra (2. ábra). Az interfázis a két M-fázis közötti szakasz, ami további három részre: G_1 -, S- és G_2 -fázisra bontható. A G-fázisokra egyrészt azért van szükség, hogy az S- és M- fázis jól elkülönítve legyenek. Ha nem lennének elkülönítve ezek a diszkrét események, akkor a sejt elpusztulna. Ezt egy kísérlettel alá is támasztották: két emlőssejtet fuzionáltak össze, amelyek a sejtciklus különböző fázisaiban voltak. Amikor egy M- és egy S-fázisban lévő emlőssejtet egyesítettek, azt tapasztalták, hogy a kromoszómák tömörödnek az S-fázisú sejtmagban, pedig a replikáció be sem fejeződött és a sejtek elpusztultak (Alberts et al., 2002). Másrészt azért is kellenek a G_1 - és G_2 -fázisok, hogy a sejt elérje az osztódáshoz szükséges kellő méretét. S-fázis során DNS replikáció, M-fázis során pedig mitózis játszódik le, utóbbi folyamat során a sejt egyenlően elosztja a leánykromatidákat a két leánysejt magjaiba (Morgan, 2007).

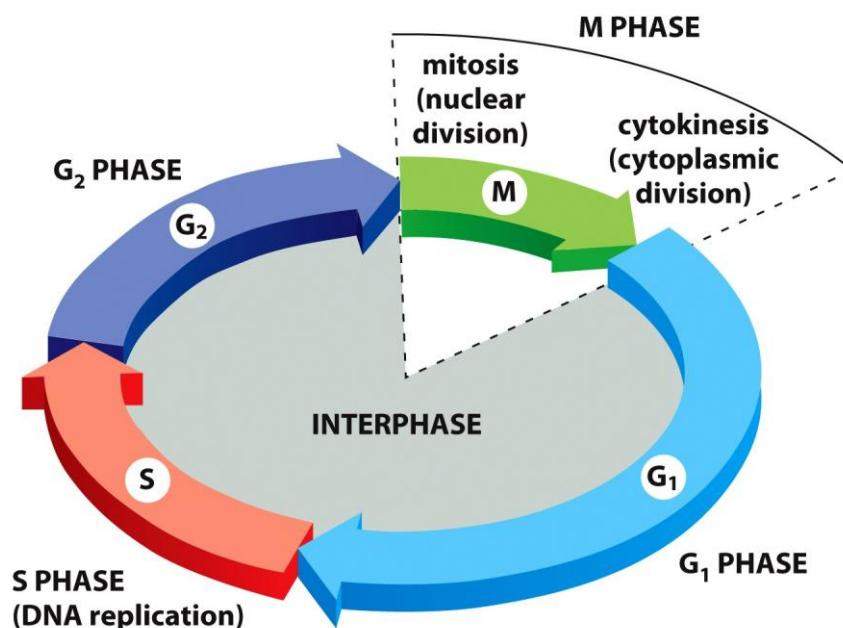
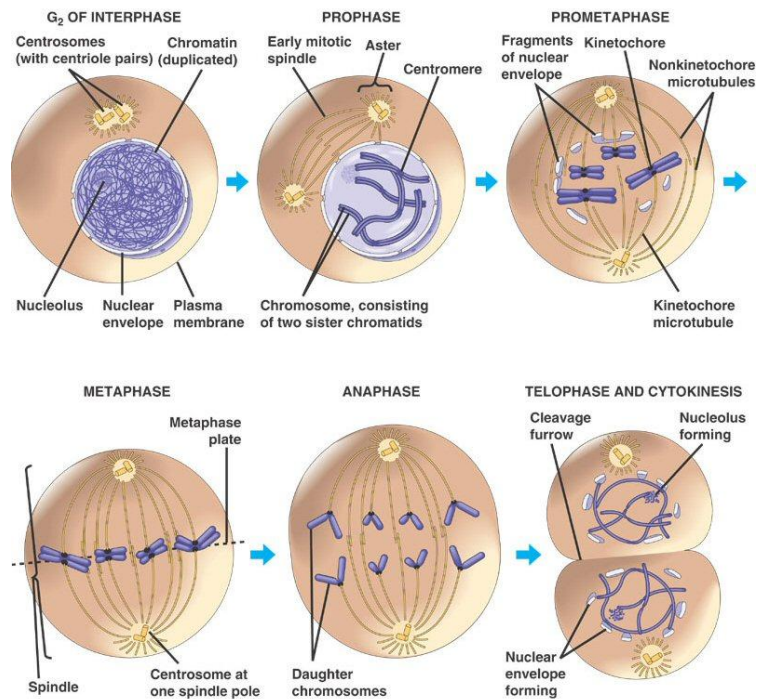


Figure 18-2 *Essential Cell Biology* (© Garland Science 2010)

2. ábra:
Az eukarióta sejtciklus fázisai (Alberts et al., 2009).

A mitózist további öt fázisra tagolhatjuk: ezek sorrendben a *profázis*, *prometafázis*, *metafázis*, *anafázis*, *telofázis* (3. ábra).



3. ábra:
A mitózis fázisai (<http://patriotapbio2010.wikispaces.com/Unit03-Cells-Mitosis>).

A *profázis* első lépéseként egy fehérjedimer, az MPF foszforilezi a kondenzinokat és a H1-hisztionokat, így a kromoszómák feltekeredett struktúrába rendeződnek, kondenzálódnak. A centromer befűződéseknél kinetochor nevű fehérjekomplex gyűlik össze. A sejtvázas elemek magorsóvá való átalakulása is elkezdődik. MPF foszforilezi a mikrotubulus asszociált fehérjéket, amelynek következményeként a mikrotubulusok minden irányba növekedni kezdenek. Ha a sejt kortextet eléri, könnyen letapadnak. Néhány ilyen sejt váz elem kapcsolódik a centroszómahoz, így stabilizálódnak, továbbá a magorsó bipoláris alakját biztosítják (4. ábra). A sejt kortexhez pozitív végükkel tapadó sejt váz elemeket asztrális mikrotubulusoknak hívjuk. Mindkét centroszóma-ból mikrotubulusok erednek, melyek között kapcsolat alakulhat ki; átlapolhatnak egymáson. Ezeket interpoláris mikrotubulusoknak hívjuk.

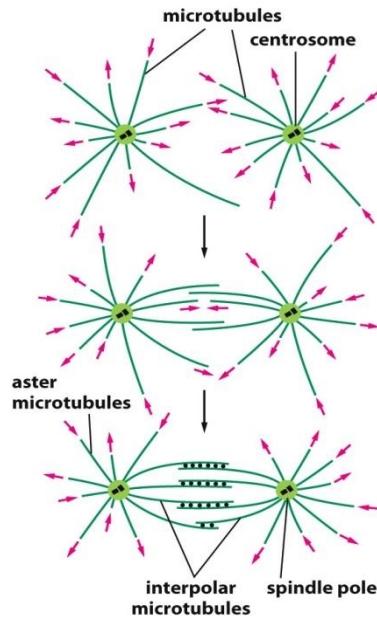


Figure 18-23 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

4. ábra:
A bipoláris magorsó kialakulása (Alberts et al., 2009).

A *prometáfázis* (4. ábra) legfontosabb eseménye a sejtmaghártya szétesése, amelyet a lamina réteg MPF általi foszforileződése idéz elő. A dinamikus mikrotubulusok elkezdhetik „pecázni” a replikált kromoszómákat. Ezek a sejtváz elemek kinetochor komplexen keresztül tudnak a kromoszómához kapcsolódni, innen ered az elnevezésük is: kinetochor mikrotubulusok (5. ábra).

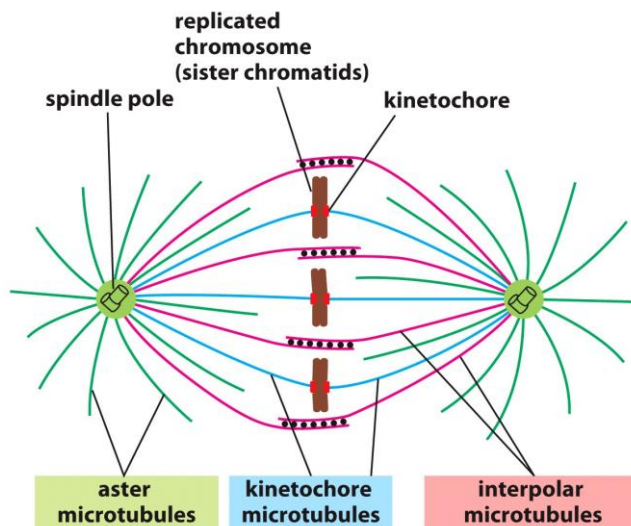


Figure 18-25a Essential Cell Biology (© Garland Science 2010)

5. ábra:
A metafázis (Alberts et al., 2009).

A kromoszóma két leánykromatidából áll, így két kinetochor fehérje komplexük van, egymással ellentétes irányban. A „pecázás” során nagy sebességgel polimerizálódik 1-1 mikrotubulus köteg és elkapja egy kromoszómát két irányból (6. ábra).

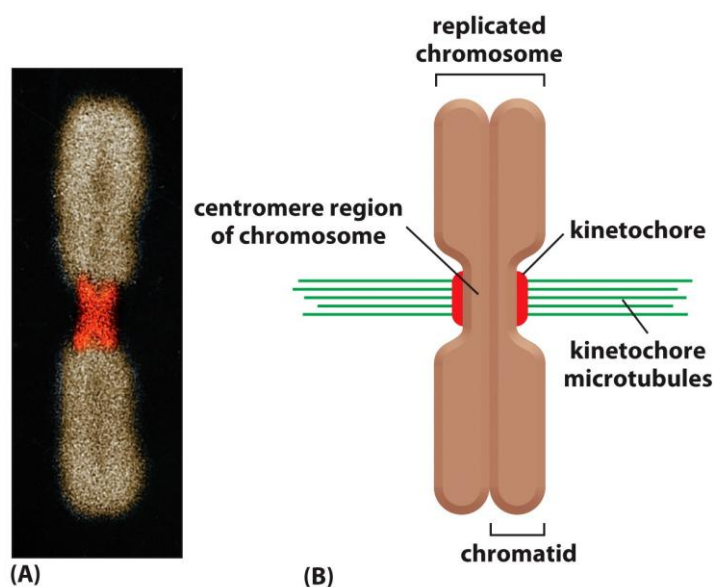


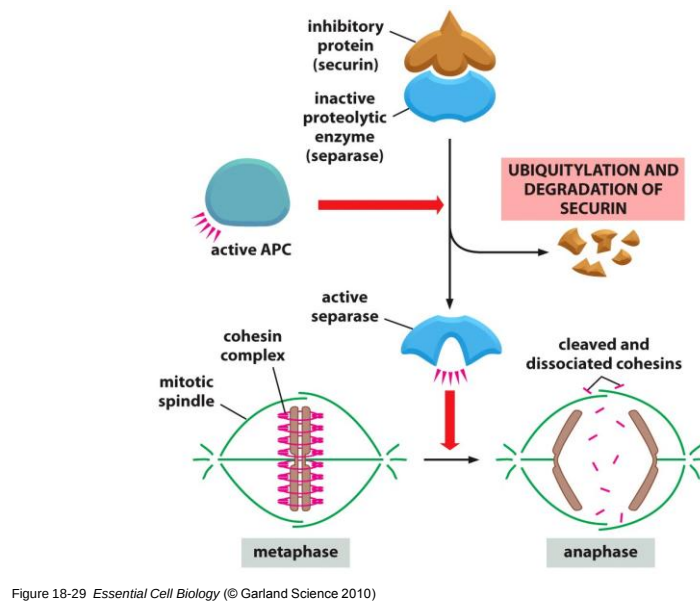
Figure 18-24 *Essential Cell Biology* (© Garland Science 2010)

6. ábra:
A mikrotubulusok kapcsolódása a kromoszómához (Alberts et al., 2009).

A *metafázis* folyamán a két mikrotubulus köteg egy képzeletbeli, úgynevezett metafázisos síkra rendezi a kromoszómákat. A kromoszómákat a kohezin-komplexek tartják össze a metafázis során. A *metafázis-anafázis* határon egy szeparáz nevű proteolitikus hatással rendelkező enzim „szétvágja” ezt a kohezin-gyűrűt. A *metafázis-anafázis* átmenetig egy szekurin nevű inhibitor kapcsolódik a szeparáz enzimhez. A *metafázis* végén az aktív APC (Anaphase Promoting Complex) ubikvitinezéssel megjelöli a szekurint, mely irreverzibilisen lebontódik. Az ubikvitinezéses proteolízis mechanizmusa rendkívül fontos. Az ubikvitin egy 76-79 aminosavból álló polipeptid, ami különböző célfehérjék aminosavoldalláncai közül a lizin ϵ -aminocsoportjával izopeptidkötést tud létesíteni. Ubikvitin ligázok megjelölik specifikusan a degradálandó fehérjét egy poliubikvitin láncsal. A megjelölt molekulát a proteaszóma felismeri, és képes degradálni azt. Ez a mechanizmus alkalmas a ciklinek és más egyéb fehérjék specifikus és gyors eltávolítására, és ennek felfedezéséért Avram Herskó két munkatársával 2004-ben kémiai Nobel-díjat kapott (Morgan, 2007).

Az APC anafázist serkentő komplex akkor lesz aktív, ha az összes kromoszóma a metafázisos síkon található, mivel a mikrotubulusok addig „rángatják” a kromoszómákat,

míg fel nem álltak erre az „egyenlítőre”. Egészen addig a kromoszómákra eső fizikai feszültség gátló hatást mér az APC molekulára (7. ábra).



7. ábra:
A kohezin-gyűrűk proteolízise (Alberts et al., 2009).

Az *anafázist* két részre oszthatjuk. Az első az *anafázis A*, mely során kinetochor mikrotubulusok rövidülnek depolimerizáció miatt, melynek következtében a hozzájuk kapcsolt kromoszómák a centroszómák felé vándorolnak. A mozgáshoz szükséges erőt a motorfehérjék szolgáltatják ATP hidrolízisével. Másik része az *anafázis B*, melynek folyamán az interpoláris mikrotubulusok egymáson való elcsúszásával a centroszómák eltávolodnak egymástól. A folyamatot szintén motorok hozzák létre. A két rész időben nem különül el élesen egymástól. Az *anafázis* végére a sejt megnyúlt állapotban lesz.

A *telofázis* során felépül a két új sejtmag: az APC molekula nemcsak a szekurint, hanem a B-típusú ciklineket jelöli meg degradációra, így az MPF aktivitása eltűnik. A lamina réteg, mely a *prometafázis* során MPF foszforilezése által szétesett, most ismét össze tud szerelődni. A sejtmag membránfúzióval épül fel (Alberts et al., 2009).

Az élesztők, sőt általában a gombák esetében zárt mitózis tapasztalható, azaz a mitózis során nem bomlik le a sejtmagmembrán, hanem a sejtmag megnyúlik az *anafázis* során, majd a mitózis végén kettéosztódik (Morgan, 2007).

2.2. A sejtciklus szabályozása

A sejt mérete nemcsak a különböző organellekumok térfogatával arányos, hanem a DNS tartalmával is (Turner et al., 2012). Egy diploid élesztősejt nagyjából kétszer akkora, mint egy haploid, továbbá a sejtmag mérete/citoplazma mérete hányados állandó egy sejtciklusra nézve (Neumann and Nurse, 2007). Az állandó arány azt jelenti, hogy a sejt mérete a DNS mennyiségéhez alkalmazkodik: ha kisebb genomot tartalmaz a sejt, mérete is lecsökken. Ennek a fiziológiai változásnak következménye van: ha lecsökken a genom a sejtben, akkor bizonyos gének is elvesznek, amelyek befolyásolják a transzkripció mechanizmus útját (Turner et al., 2012). A sejt mérete tehát fiziológiailag fontos, ezért az evolúció során kialakult egy molekuláris szabályzó rendszer (Mitchison, 1971).

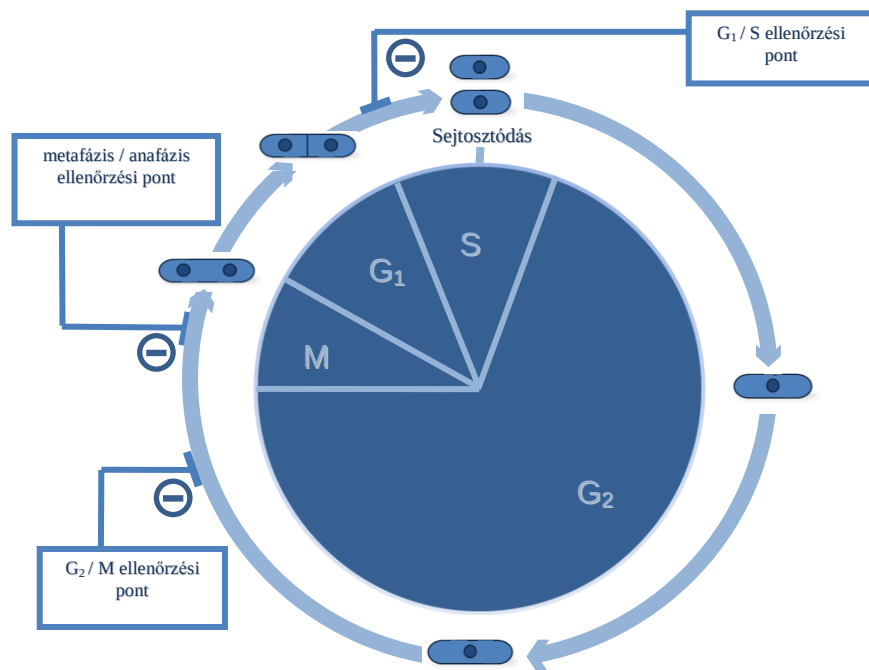
Tehát az egysejtű populációban a fennmaradáshoz elengedhetetlen a sejtek méretének generációkon keresztül változatlansága, a homeosztázis. Növekvő sejtekben a méret állandóságának biztosítására szükség van a G_1 - és G_2 -fázisokra. A korai embriók esetében ezek a fázisok kimaradnak, éppen a nagy méretük következtében. A sejtciklust két további lépésre oszthatjuk: egy kromoszómás és egy citoplazmás ciklusra. Hosszú távon szükséges, hogy a kromoszómás ciklus periódusideje egybeessen a tömegduplázódási idővel.

A kromoszómás és a citoplazmás ciklus koordinált szabályozására egy egyszerű hasonlatot használhatunk: a *bicikli modellt*. Ha a citoplazmás ciklus ideje nagyobb, mint a kromoszómás ciklusé, az azt jelenti, hogy utóbbi gyakrabban fog lejátszódni. Következmény: a sejt genetikailag instabillá válik, ami letális. A kromoszómás ciklus részéről egy pozitív szignálra van szükség, ami serkenti a citoplazmás ciklust, konkrétan a sejtosztódást. Ezt a jelet a sejt a mitózis folyamán bocsátja ki. A két periódusidő így összehangoltta válik, de kisebb lesz, mint a tömegduplázódási ideje, ezért a sejtek mérete egyre kisebb lenne az egymást követő ciklusokban. Megoldás: a citoplazmás ciklus negatív szignált küld a kromoszómás ciklus felé, hogy periódusidejük egyenlő legyen. Ezt a gátlást méretkontrollnak hívjuk, mivel ez a negatív jel nem engedi, hogy a kromoszómás ciklus bekövetkezzen, míg egy bizonyos méretet el nem ért a sejt (Sveiczzer and Rácz-Mónus, 2013).

A sejtciklus szabályzására több elmélet is született. A kutatók növekvő sejteket tanulmányozva megállapították, hogy a sejtciklus eseményei szigorúan egymás után következnek be. Ha egy esemény kimarad, onnantól downstream blokkolódik a folyamat. Nagyon hasonlít a dominók viselkedésére: ha egy eldőlt, vele a többi is el fog. Ezért ezt az elképzelést *dominó modellnek* nevezik. Később korai embriókat tanulmányozva megállapították, hogy ezekben az élőlényekben nincsenek ellenőrzési mechanizmusok. A sejtciklus folyama-

mai egymástól függetlenek, melyeket egy időkapcsoló indít el (*órámű modell*). A sejtciklus konzerválódott az evolúció során, ezért nem lehet két elmélettel leírni mechanizmusát. Két egyszerű elmélet ötvözeteként megszületett az *automata mosógép elmélet*: központi szerepe egy kontrollrendszernek van, ami az eseményeknek bizonyos időt ad, és a továbblépést csak akkor engedélyezi, ha a bekövetkeztek már a továbblépési pontot megelőző események (Alberts et al., 2009).

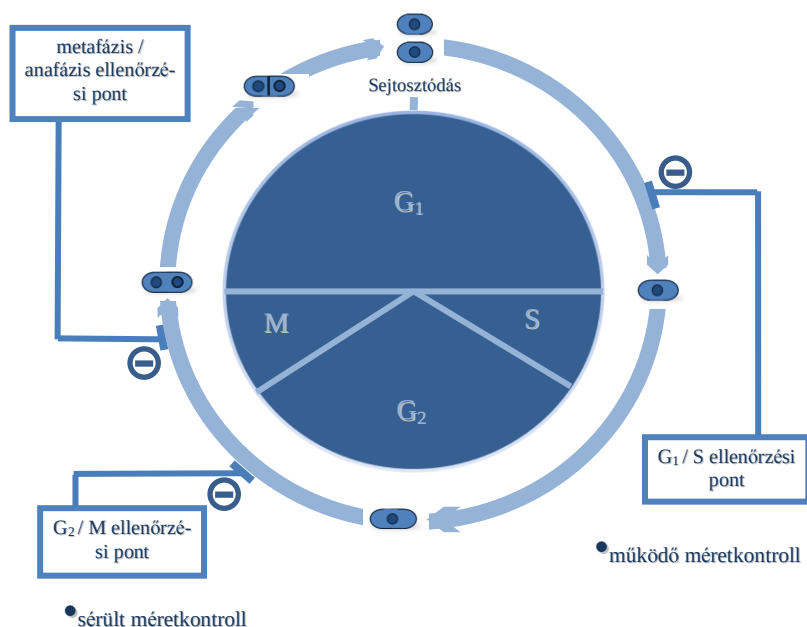
Az eukarióta sejtekben három ellenőrzési pont („checkpoint”) létezik: G_1/S , G_2/M és a mitózisban bekövetkező metafázis/anafázis határán (8. ábra) (Murray, 1994). Az első a G_1/S határán működik, magasabb rendű szervezetekben restriktós pontnak (Zetterberg et al., 1995) vagy élesztőkben Start pontnak (Forsburg and Nurse, 1991) is hívjuk. Ennél a pontnál ellenőrzi a sejt, hogy megfelelőek-e a környezeti paraméterek, a megfelelő méretet elérte-e, a mitózis szabályosan lejátszódott-e, sérült-e a DNS. Ha ezeket rendben találja, akkor elkezdheti a DNS-szintézist. Emlős sejteknél azonban szöveti szignálokról is beszélhetünk, ami rendellenesség fellépésének esetén fontos szereppel bír (pl. daganat). Szöveti szignál hatására G_0 állapotba kerül a sejt. Ez egy speciális nyugvó állapot, mely során a sejtnak az alábbi lehetőségei adódnak: tovább megy a sejtciklusba, átmenetileg blokkolódik és ebben a fázisban marad vagy tartósan elhagyja a ciklust, és meiózisba megy át (Alberts et al., 2009). A G_2 -fázis végén ellenőrzi a sejt, hogy a DNS szintézis megfelelően végbement, továbbá nincs-e DNS sérülés, megfelelő-e a sejt mérete (Maller, 1994).



8. ábra:
A hasadó élesztő vad típusú sejtjére jellemző fázisarányok és ellenőrzési pontok
(Sveiczzer and Horváth, 2013).

Az utolsó ellenőrzési mechanizmus a mitózisban hat (Deshaies, 1995). A sejtnak meg kell győződnie, hogy a kromoszómák rendesen felálltak-e a metafázisos síkra, továbbá kapcsolódik-e minden leánykromatida a kinetochor mikrotubulusokhoz. A szegregáció csak ezután következhet, hiszen ha akkor menne végbe, mikor még nem álltak fel pontosan erre a hipotetikus síkra, akkor ún. aneuploidia jelenség alakulna ki, ami többnyire letális.

A vad típusú *S. pombe* sejtciklusát rövid G_1 -, és hosszú G_2 -fázis jellemzi (8. ábra) (Mitchison, 1989). A G_2/M ellenőrzési pont az aktív, míg a G_1/S határán kriptikus (rejtett) méretkontroll van. A *wee* mutáns sejteknél fordított a helyzet: a G_1/S határán működő „checkpoint” az aktív, míg a G_2/M ellenőrzési pont sérült (9. ábra).



9. ábra:
A hasadó élesztő *wee1* mutánsú sejtjeire jellemző fázisarányok és ellenőrzési pontok
(Sveiczzer and Horváth, 2013).

2.3. A sejtciklus szabályozás molekuláris mechanizmusa

A sejtciklus eseményeinek precíz szabályozását egy központi kontrollrendszer irányítja, melynek legfontosabb regulátorai a fehérje dimerből felépülő ciklinfüggő kinázok (10. ábra) (Alberts et al., 2009). Az egyik alegység egy kináz, amit katalitikus alegységnek is hívunk. A kinázok ATP terhére végzik az átalakítást szubsztrátjaikon, ami általában szerin, treonin és tirozin oldalláncaikon található hidroxilcsoporton keresztül való foszforilezést

jelent. A folyamat energia szükségletét az ATP hidrolízise fedezi. Foszforilálás hatására a fehérje biológiai aktivitása megváltozik. A dimer másik alegysége a reguláris, ez a ciklin. Elnevezése az 1980-as évekből Tim Hunt kutatótól ered. A tengeri sünn korai embrionális szakaszát vizsgálva megállapította, hogy ennek a fehérjének a koncentrációja a ciklus során ciklikusan változik (Alberts et al., 2009). A kinázok aktivitásához szükséges, de nem elégséges feltétel a ciklinhez való kapcsolódás, ezért ciklin dependens kináznak (Cdk) nevezzük (10. ábra). Magasabb rendű szervezetekben többfajta ciklin, míg alacsonyabb rendű szervezetekben kevesebb is elég a szabályozáshoz. A ciklin befolyásolja, hogy mi a kináz szubsztrátja, így különböző ciklinekkel elegendő lehet egyes egyszerűbb szervezetekben egy Cdk is a szabályozáshoz. Ez a Cdk1 jelű fehérje élesztőgombáknál, amit a hasadó élesztőben a *cdc2* gén kódol.

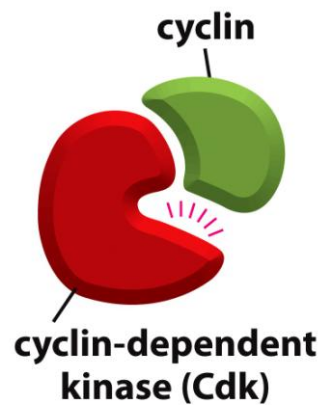


Figure 18-4 *Essential Cell Biology* (© Garland Science 2010)

10. ábra:

A központi kontrollrendszer legfontosabb eleme: a ciklinfüggő kináz (Cdk; ciklin dependent kinase) (Alberts et al., 2009).

Magasabb rendű szervezetekben több ilyen Cdk létezik. Az egyik az S-fázist serkentő S-Cdk. G₁-fázis során a replikációs origó kis szekvenciája legalább 6 fehérjét vonz magához, ami nem más, mint az ORC (**O**rigi**n** **R**ecogniti**o**n **C**omplex) (11. ábra). A G₁-fázis során termelődik egy fehérje (Cdc6), ami az ORC-hez kapcsolódik (Alberts et al., 2009). Ez a fehérje további proteinek vonz a komplexhez, ezért gyakran töltőfehérjének is hívják. Együttesen alkotják a prereplikációs komplexet. Ahhoz, hogy a sejt S-fázisba lépjen, ennek a komplexnek szét kell esnie. Az S-Cdk szerepe itt jelenik meg: a Cdc6 fehérjét foszforilezi, ami ennek következtében leesik a komplexről. Nemcsak az APC, hanem egy másik molekula az SCF is képes ubikvitinezéssel degradációra jelölni bizonyos fehérjéket. SCF jelöli meg a Cdc6 jelű fehérjét a fent leírt módszerrel, azonban erre csak akkor képes, ha a Cdc6 az SPF által már megfoszforileződött (Morgan, 2007). A Cdc6 jelű fehérje megfelelő módosítások

után a proteaszómába jut, mely egy proteáz enzimekből felépülő komplex. A töltőfehérjén történő módosításokkal párhuzamosan a prereplikációs komplex szétesik. Ez azonban még nem elég az origó tüzeléséhez, egyéb enzimek (pl.: DNS-polimeráz) kellene. Replikáció csak akkor indulhat el, ha a Cdc6 képződött és le is bomlott. Az SPF G₂-fázis során megtartja aktivitását, így lehetetlenné teszi a prereplikációs komplex létrejöttét, azaz gátolja az ún. rereplikációt, azaz egy abnormálisan ismételt replikációt.

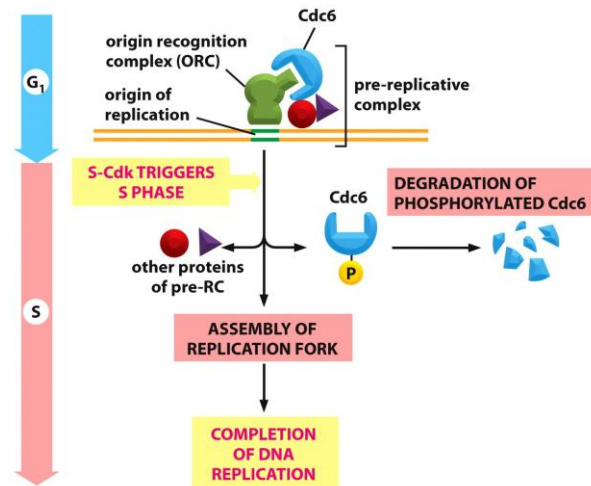


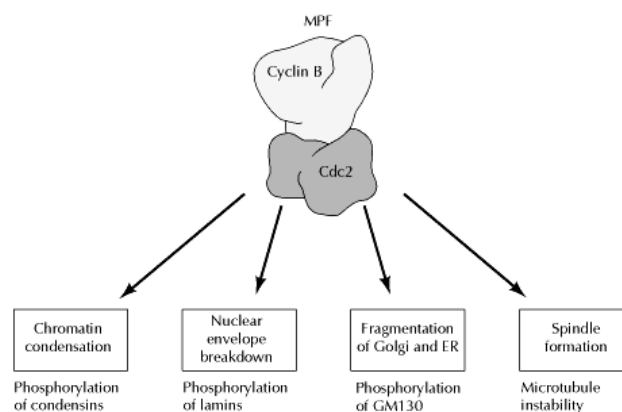
Figure 18-14 *Essential Cell Biology* (© Garland Science 2010)

11. ábra:
A replikáció és a rereplikációs gátlás mechanizmusa
(Alberts et al., 2009).

Másik ilyen Cdk molekula az M-Cdk, ami a mitózist serkenti. Alacsonyabb rendű szervezetekben a két kináz azonos, ciklinek változtatásával érhetik el az S-, illetve az M-fázist (Alberts et al., 2009).

Korai embrionális sejteknél, elsőként az afrikai karmosbékában (*Xenopus laevis*) figyeltek meg egy érdekes jelenséget: ezekből a sejtekből kivont citoplazma beindítja éretlen oocitákban az érést. Az oocita egy éretlen diploid sejt, mely a petesejt G₂/MI fázishatáron való blokkolódásakor keletkezik. A kutatók azt tapasztalták, hogy ha mitózisos sejtől kivont citoplazmát injektálnak egy éretlen oocitába, akkor bekövetkezett az érés. Ellenben, ha interfázisos sejtől vettek citoplazma mintát, és azt fecskendezték be az oocitába, akkor nem történt változás. Az érést beindító anyag az MPF (**M**aturation **P**romoting **F**actor) nevet kapta (Alberts et al., 2009). Az MPF-et felépítő ciklin a ciklin-B, amit a *cdc13* gén kódol hasadó élesztőben, a ciklin függő kináz pedig a Cdk1 (Hunt, 1989). Az MPF azonos fent említett M-Cdk-val.

Az MPF közvetlenül és közvetve is hat a sejtben különböző szubsztrátokon, hogy az M-fázis el tudjon kezdődni. Közvetlenül foszforilezi a nukleáris lamina hálózatot, ami egy intermediér filamentum a sejtmagmembrán alatt. Foszforiláció hatására a magmembrán szétesik, így eltűnik a sejtmag. A H1 hiszton fehérjét is közvetlenül foszforilezi, amivel a DNS kondenzáltságát segíti elő, továbbá a kondenzinokat, amik hurkokat képeznek a DNS-en, és ezzel a DNS még tömörebbé és kompaktabbá válik. Közvetlenül foszforilál bizonyos mikrotubulusokhoz asszociálódó fehérjét (MAP), ami a sejtvázas elemek stabilitását befolyásolja: mitózisban a mikrotubulusok rövidebbek lesznek, mint interfázisban. Közvetett hatásai közt szerepel több regulátor (pl. foszforilációs kaszkádok) beindítása (12. ábra) (Alberts et al., 2009).



12. ábra:
MPF közvetett és közvetlen hatásai
 (<http://kc.njnu.edu.cn/swxbx/shuangyu/9.files/image022.gif>).

Az interfázis végén az MPF aktivitásának a mitózis kezdete előtt hirtelen kell megnőnie, és a végén hirtelen kell lecsökkennie, hogy tovább léphessen a sejt a ciklusának következő szakaszára. A mitózis fázisainak részletezésekor már említettem, hogy APC molekula ubikvitinezéssel jelöléssel a B-típusú ciklineket megjelöli, amelyek így lebomlanak. A folyamat szinte pillanatszerű, az MPF gyorsan inaktíválódik (13. ábra).



Figure 18-11. *Essential Cell Biology* (© Garland Science 2010)

13. ábra:
B-típusú ciklinek degradációja
 (Alberts et al., 2009).

Az MPF aktivitásának hirtelen való megnövekedéséről még nem esett szó. A folyamat szabályozása több lépésben történik. A G₁-fázisban egy sztöchiometrikus inhibitor, a ciklin függő kináz inhibitor (röviden CKI) a Cdk-ciklin dimer molekulával trimert alkotva gátolja annak működését. Ezt a fehérjét a *rum1* gén kódolja a hasadó élesztőben.

Ez az inhibitor azonban csak a G₁-fázisban fejti ki hatását. Az S- és G₂-fázisban szükség van egy másik fehérje gátló hatására. Két kináz egy-egy foszforilációt hajt végre a Cdk1-en. Az egyik aktiváló foszforiláció a Thr-161 aminosavon, míg a másik egy inaktív foszforiláció a Tyr-15 aminosavon. A kétszeresen foszforilált forma inaktív lesz (14. ábra), amelyet az MPF interfázisos ún. preMPF formájának hívunk.

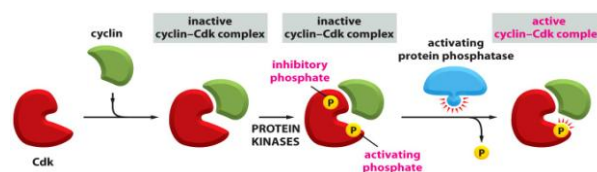
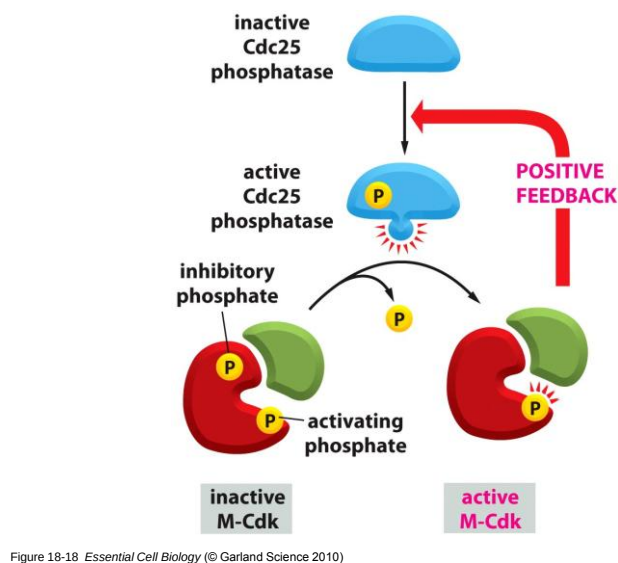


Figure 18-9 Essential Cell Biology (© Garland Science 2010)

14. ábra:
A kinázok foszforilációs módosításai a Cdk1-en
(Alberts et al., 2009).

A preMPF MPF-fé való átalakulásában több fehérje vesz részt. Az egyik fontos proteint a hasadó élesztőben a *wee1* gén terméke (kisebb aktivitású háttérkópiája a *mik1*), amely a Tyr-15 foszforilációját katalizálja. Ez egy erős inaktív foszforiláció (14. ábra). A gátló foszfátcsoportot egy másik enzim, a *cdc25* gén által kódolt foszfataz távolítja el (15. ábra). Utóbbi fehérjének is ismert egy kisebb aktivitású háttérkópiája, a *pyp3* gén. A Cdc25 foszfataznak szintén két formája van: egy aktív és egy inaktív, mely ugyancsak foszforilezéssel szabályzódik. Az MPF maga is foszforilezi a Cdc25 fehérjét, így aktív lesz. Pozitív visszacsatolás jön létre: minél több aktív MPF van, annál több aktív Cdc25. Ez okozza az MPF aktivitásának hirtelen való megugrását a G₂-fázis végén, így M-fázisba „kergeti” a sejtet (Alberts et al., 2009).



15. ábra:
Az aktív MPF kialakulása
 (Alberts et al., 2009).

2.4. A méretkontrollt meghatározó egyéb tényezők

Nemcsak a ciklinfüggő kinázoknak van befolyásolása a sejtek ciklusának szabályzására. Kedvezőbb körülmények között nagyobb sejtek fognak születni, míg rosszabb feltételek mellett kisebb sejtek (Fantes, 1977). Ha az exponenciális fázisban lévő sejteket jobb körülmények közé helyezzük (shift-up), azt tapasztaljuk, hogy az áttöltés után egy darabig még a megszokott életsiklusuk „ütemére táncolnak”, majd egy idő után nem történik osztódás a tenyészetben. Később, amikor eléri a méretkontroll által megszabott új méretet, újra el kezdenek osztódni. Előbbi kísérleteknél a tápközegben adekvátabb szén- vagy nitrogénforrásokkal biztosítják a kedvezőbb feltételeket. A folyamat magyarázata a következő: azok a sejtek, melyek az ellenőrzési pontjukat elhagyták az előző tápközegben, azok tudnak szaporodni, a többi sejt egy ideig nem. Az új tápközegben már más kritériumoknak kell megfelelniük. Ha ezek után a régi tápközegbe tesszük vissza a tenyészetet (shift-down), akkor azt tapasztaljuk, hogy egyszerre rengeteg sejt kezd el osztódni. A jelenség magyarázata: visszaáll az eredeti állapotba a rendszer, a méretkontroll lecsökken.

Az M-, G₁- és S-fázisok hosszát nem befolyásolja a sejt mérete (timer) a hasadó élesztőben. A folyamatok végbemeneteléhez konkrét időtartam szükséges. A G₂-fázisban éri el a sejt a kívánt méretet (sizer). Ha a környezeti tényezők jobbak, akkor ez a fázis nyúlik

meg, ha rosszabbak, akkor ez zsugorodik össze. Valamekkora időtartamú G₂-fázis mindig jelen van (Nurse and Fantes, 1981). Tehát a sejtciklust egy „timer” és egy „sizer” egységre lehet bontani („timer+sizer” modell). A '90-es évek közepére derült ki, hogy a méretkontroll pontos helye inkább a G₂-fázis közepén van. Így a méretkontroll mechanizmusát inkább egy „sizer+timer” modell írja le helyesen (Sveicz et al., 1996).

2.5. A sejtciklus mutánsok

A sejtciklus precíz végbemeneteléséhez számos fehérjére van szüksége a sejtnek, melyek a *cdc* (cell division cycle) gének termékei. Az 1970-es évektől fogva sok *cdc* gént fedeztek fel az izolált *cdc* mutánsok révén a sarjadzó élesztőben (Hartwell, 1974), valamint a hasadó élesztőben (Nurse et al., 1976). A géneket mindkét élőlényben külön-külön a felfedezésük sorrendjében számozták meg.

A sejtciklus működését úgy vizsgálták, hogy valamelyik *cdc* gént elrontották a sejtben. A mutáció következtében a fehérje működésképtelenné válik. A mutáns sejtek a sejtciklus azon pontjainál fognak megrekedni, ahol az adott *cdc* gén termékére szükség volna. Szaporodni nem tudnak, megállnak ennél az ún. átmeneti pontnál. A sejtek hosszabb távon való fenntartásáért ún. kondicionális mutánsokat hozunk létre. Ezeket pontmutációval állítjuk elő. A kondicionális mutáció lényege, hogy a sejt bizonyos (permisszív) körülmények között vad, más (restriktív) körülmények között mutáns fenotípusú lesz. Leggyakrabban hőmérséklet érzékeny *cdc^{ts}* mutánsokat használunk, amelyekben a mutáció rendszerint a fehérje térszerkezetének változásában nyilvánul meg. A hőmérséklet változásával a fehérjék másodlagos szerkezetét meghatározó H-kötések erőssége változik. Alacsony hőmérsékleten stabil a H-kötés a peptidek között, így stabil fehérje lesz a *cdc* gén terméke, tehát a sejt akadálytalanul szaporodik. A hasadó élesztő hőmérséklet tartományának felső részében gyengül a H-kötés erőssége, így nem lesz stabil fehérje a *cdc* gén terméke. Az *S. pombe cdc^{ts}* mutánsai általában 25°C-on osztódnak, de 35°C-on nem (Nurse et al., 1976).

A sejtciklus mutánsok közül nagyon gyakran a *wee* mutáns sejtet foglalkozunk. A *wee* gén pontmutációjával csupán feleakkora osztódási mérettel, de hasonló generációs idővel rendelkező sejteket kapunk, mint a vad típusú sejt esetében. A nevét is kis mérete miatt kapta, ugyanis *wee* a skótok ősi kelta nyelvén törpét jelent és az első ilyen mutánst Skóciában izolálták (Nurse, 1975).

2.6. Szinkronizálási módszerek

A természetben megtalálható nagyméretű populációk aszinkron módon viselkednek, mely tulajdonságuk nem jelent problémát, ha metabolit termelés vagy a szaporításuk a cél. Azonban a sejtciklus vizsgálatához nélkülözhetetlen a szinkron tenyészet. Szinkron tenyészetben a sejtek a ciklus közel azonos állapotában vannak, ezért nagyjából egyszerre osztódnak. A szinkronizálás persze sohasem tökéletes, csak megközelítőleg lehetnek a ciklus azonos pontjain a sejtek. Bármilyen jól sikerül is a szinkronizálás, néhány generáció után már gyengül, majd meg is szűnik.

Szinkron tenyészeteket alapvetően két módon állíthatunk elő: szelekciós és indukciós módszerekkel. Az előbbi módszereknél kiemeljük az aszinkron tenyészetből azokat a sejteket, melyek a ciklus adott pontján vannak. Az elválasztás történhet a sejt mérete alapján. A legkisebb sejtek a ciklus elején vannak, a legnagyobb sejtek pedig az osztódás előtt. Azonban a legkisebb és a legnagyobb sejtek között is csak viszonylag kicsi a méretkülönbség, ezért az egyszerű centrifugálás nem elegendő. A legjobb módszer az ún. centrifugálósos elutriáció (Creanor and Mitchison, 1979).

Az indukciós módszerek esetén a sejteket mutációval, vagy kémiai gátlószerekkel a ciklusuk egy bizonyos pontján blokkoljuk. Ha a gátlást legalább egy generációs ideig fenntartjuk, a tenyészet összes sejtje megáll a ciklus ugyanazon pontján, amit átmeneti pontnak hívunk. A gátlószert ezután eltávolítjuk a tenyészetből, s akkor a tenyészet szinkron módon osztódni kezd. Gátló eljárás az is, ha valamilyen tápanyago(ka)t hirtelen megvonunk: akkor a sejtek általában a G_1 -fázisban gyűlnek össze.

A korábban említett ún. *cdc* mutánsok segítségével szintén létrehozhatók indukciós szinkron tenyészetek. Ha a populációt restriktív hőmérsékleten szaporítjuk legalább egy generációs ideig, akkor a sejtciklus leáll, de a növekedés nem. Eredményként „óriási” sejteket kapunk. Ha sokáig a restriktív hőmérsékleten tartjuk, a sejtek elpusztulnak („kipukkannak”). Permisszív hőmérsékletre visszatéve a tenyészetet, gyors osztódásba kezdenek a sejtek, és néhány generáció alatt elveszítik tömegfeleslegüket.

2.7. A hasadó élesztőben működő molekuláris hálózat

A dolgozatomban már említettem, hogy milyen fázisarányok jellemzik a vad és *wee1⁻* mutáns sejteket. A vad típusú sejtnek rövid a G_1 -fázisa, míg a *wee1⁻* mutánsnak hosszú, a ciklusa 60%-át adja ki. A sejtciklus működését egy molekuláris hálózat biztosítja (16. ábra).

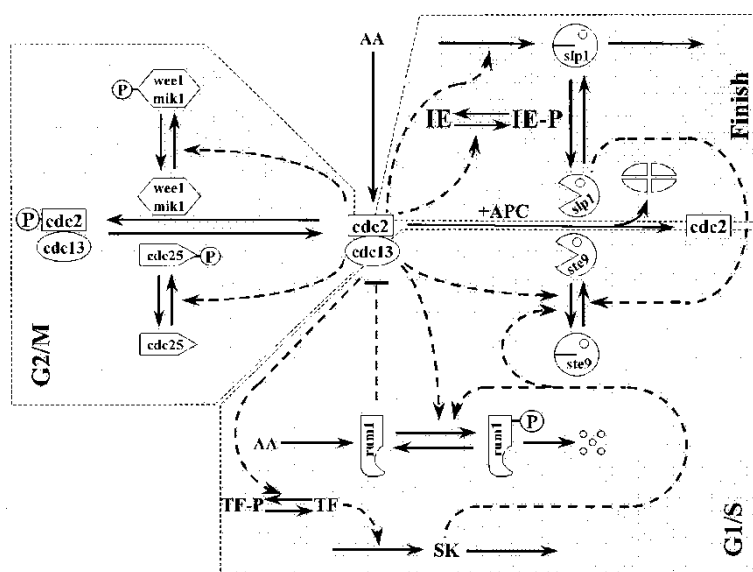
A G₁-fázisban fontos szerepe van a Rum1 sztöchiometrikus inhibitornak, a transzkripciós faktornak (TF), a starter kináznak (SK) illetve az APC Ste9 és Slp1 fehérje alegységeinek is. Vegyük sorra az egyes fehérjék funkcióit!

Az első fontos fehérje, ami a sejtet a G₁-fázisba juttatja, az a Slp1. Ez a fehérje a Cdc13 (B-típusú ciklin) lebomlásának elindításáért, a kohezin komplex lebomlásáért és a Ste9 fehérje aktiválásért felelős. A Ste9 a G₁-fázisban gátolja az MPF működését egy bizonyos MPF aktivitási szintig. Az M-fázis végén az Slp1-et közvetve, a G₁-fázis során már a Ste9-et közvetlenül foszforilálja az MPF. Az egyes fehérjék megfelelő időben való aktiválásért egy negatív visszacsatolás felel. A közvetett módon való foszforilezés egy időkéstellett eredményez a negatív visszacsatolásban.

Másik fontos fehérje a Rum1, ami a Cdc13/Cdc2 dimerhez kapcsolódva inhibitorként viselkedik. Azonban a G₁-fázis alatt egyre több Cdk-ciklin dimer keletkezik, így egy idő után már több lesz, mint amennyit a Rum1 fehérje inhibeálni tud. Az MPF fogja foszforilezni a Rum1 fehérjét, és így degradációra jelöli meg.

További fontos fehérje a „transzkripciós faktor”, és ahogy az ábra is mutatja az MPF által foszforileződik. A defoszforilezett formája serkenti a starter kináz (SK) képződését. Az SK a Rum1 és Ste9 fehérjét foszforilezi, ezáltal inaktíválja őket. Úgyis mondhatjuk, hogy az MPF „barátja” a starter kináz a G₁-fázisban.

A G₂-fázisban más fehérjék mutatnak molekuláris kölcsönhatást a sejtciklus közép-pontjában lévő MPF-fel. A fő szerep a Cdc25 és Wee1 enzimeké, melyeknek funkcióját a 2.3. fejezetben részleteztem. A molekuláris hálózatról összefoglaló (16. ábra) kép segítségével egyszerűen áttekinthetjük a molekuláris hálózat működését.

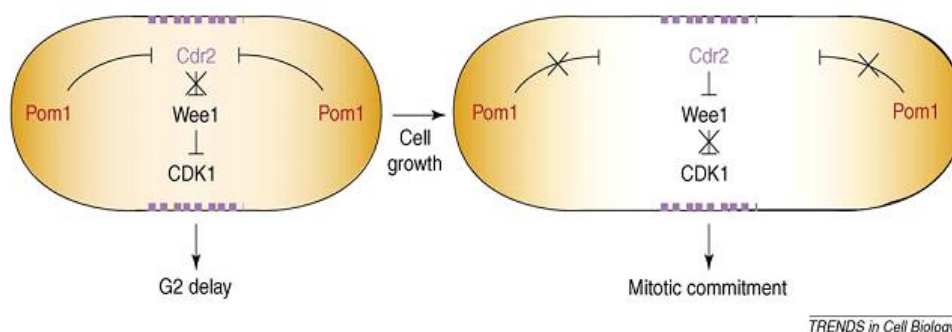


16. ábra:

A molekuláris hálózat működésének sematikus ábrázolása (Novak et al., 2001; Sveczer et al., 2001).

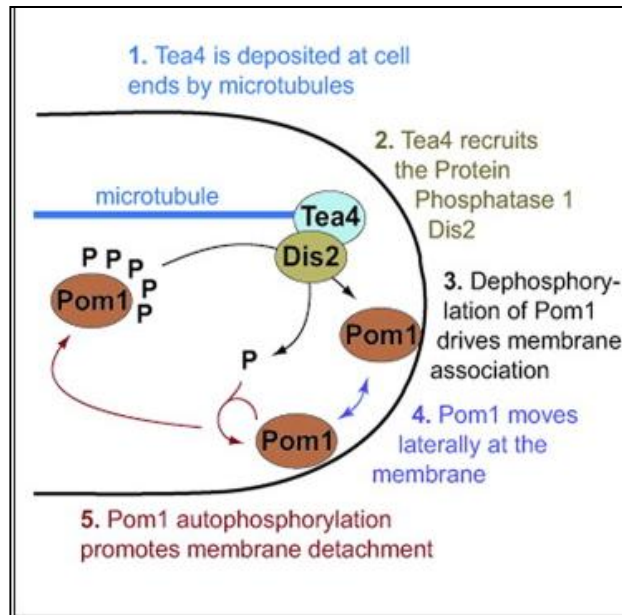
A fenti (16. ábra) azonban egy egyszerűsített séma. A G₂/M átmenetet kissé ki kell egészítenünk. A Wee1 kináz egy nagy aktivitású molekula, ami megoszlik a citoplazma és sejtmag között és más fehérjék által is szabályozva van. A folyamat legfontosabb fehérjéi a Pom1 és a Nif1, melyek specifikussága, hogy térbeli gradienssel rendelkeznek. A Pom1 fehérje a sejt mindkét végén jelen van a kortexen, de a Nif1 csak ott, ahol a Pom1 csekély mennyiségben található meg (Berthelot-Grosjean and Martin, 2009). A két fehérje aktivitása a sejt belseje felé haladva csökken.

A Wee1 fehérjét közvetve szabályozzák a fent említett enzimek (17. ábra). Közvetlen hatásukat a Cdr2 kinázra fejtik ki. Amíg a sejt kis mérettel rendelkezik, addig a Pom1 kináz foszforilezással gátolja a Cdr2 fehérje működését. Utóbbi enzim feladata a Wee1 inaktiválása ugyanezzel a mechanizmussal. Ha a sejt mérete megnő, akkor a Pom1 aktivitása lecsökken, Cdr2 kináz módosítani tudja a Wee1 fehérjét és a sejt az M fázisba mehet (Berthelot-Grosjean and Martin, 2009).



17. ábra:
A G₂-fázis fontos szereplői (Berthelot-Grosjean and Martin, 2009).

A folyamatnak számos más szereplője is vannak pl. Tea1, Tea4 fehérjék, melyek a Pom1 fehérje helyes lokalizációjáért felelnek. Dolgozatomban már írtam, hogy a Pom1 fehérje mennyisége a sejt végeken a legnagyobb. Feltehetjük a kérdést, hogyan működik az a mechanizmus (18. ábra), ami a Pom1 gradienséért felelős? Előbbi fehérjének bizonyos szekvenciája argininben és lizinben gazdag, melyek pozitív töltésű aminosavak. Segítségükkel ez a fehérje a membrán negatív töltésű lipidjeihez (pl.: foszfatidil-szerin) tud kapcsolódni elektrosztatikus vonzás következtében. A Pom1 kináz autofoszforilációra képes, melynek köszönhetően a kortexben marad. Kísérletesen is bizonyították ezt a tényt, mikor a kináz domént eltávolították a *pom1* génről (Hachet et al., 2011). Viszont az autofoszforiláció miatt sok foszfátcsoport és a plazma membrán foszfátcsoportjai között tasztító kölcsönhatás lép fel, melynek eredményeként gyengülni fog a fehérje membránnal való kölcsönhatása.

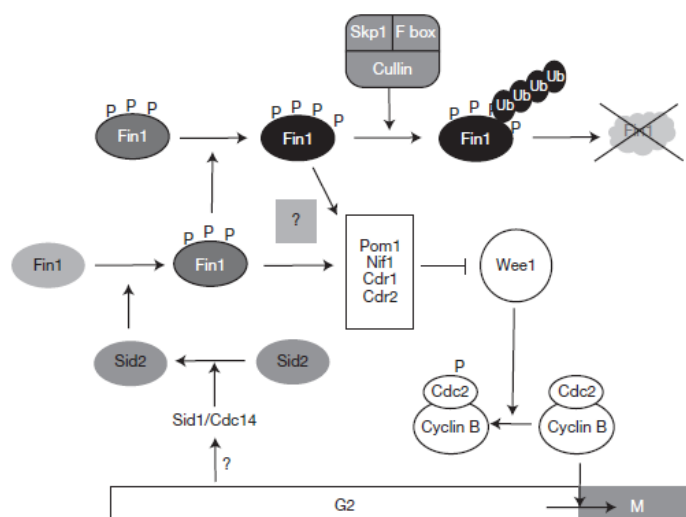


18. ábra

A Pom1 Tea4 és Dis2 fehérje általi szabályzásának mechanizmusa (Hachet et al., 2011).

A Tea4 fehérje más, pl. a Dis2 foszfatáz szállításáért is felelős. Utóbbi két fehérje összekapcsolódik, majd mikrotubulus segítségével a sejt végére kerülnek. A Dis2 fehérje defoszforilálja a Pom1 fehérjét, melynek következtében nagyobb kölcsönhatás alakul ki a membrán és a fehérje között (pozitív töltések száma nem változik, negatív töltések csökkennek). A Pom1 fehérje ezután a membrán síkjában laterális diffúzióval haladva folyamatos autofoszforiláció (dinamikus viselkedés) következtében képződő negatív töltésű foszfátcsoportok miatt újra távolabb kerül a membrántól. A folyamatos autofoszforilációs eseményeket egy „timer” modell segítségével írhatjuk le, azaz bizonyos időre van szükség, hogy a Pom1 gradiense kialakulhasson. Következmenyeként a sejt ciklusának ideje is megnyúlik (Hachet et al., 2011).

A G₂-fázisra egyéb enzimek is hatást gyakorolnak, mint pl. a hasadó élesztő Szeptációs Iniciálós Hálózat (SIN, Septum Initiation Network) egyik tagja, a Sid2 kináz. Ennek a fehérjének a feladata egy bizonyos kináz, a Fin1 foszforilációja (19. ábra). Az így kapott formája katalizálja a saját lebomlását is, eredményeként a Fin1 aktivitása a G₂-fázisban tranziens lefutású lesz. Más feladata is van a foszforilezett Fin1 kináznak: a Pom1 fehérjét foszforilezi, így közvetve hatása van az MPF aktivitására is (Grallert et al., 2012).

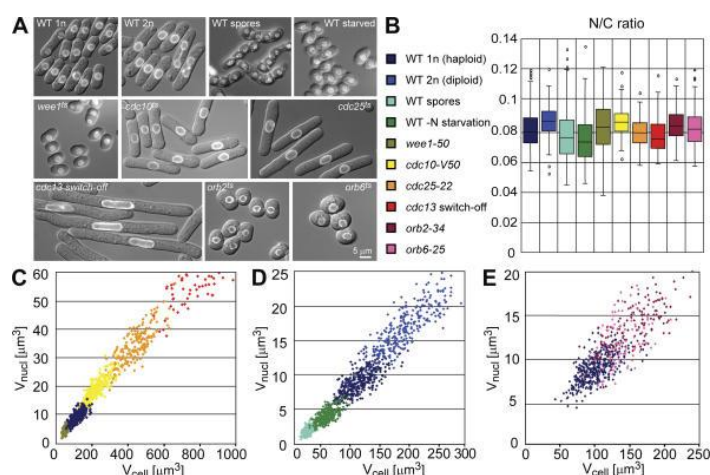


19. ábra

A Sid2 és Fin1 kinázok működésének sémája (Grallert et al., 2012).

2.8. A sejtmag térfogatának változása a sejtciklus során

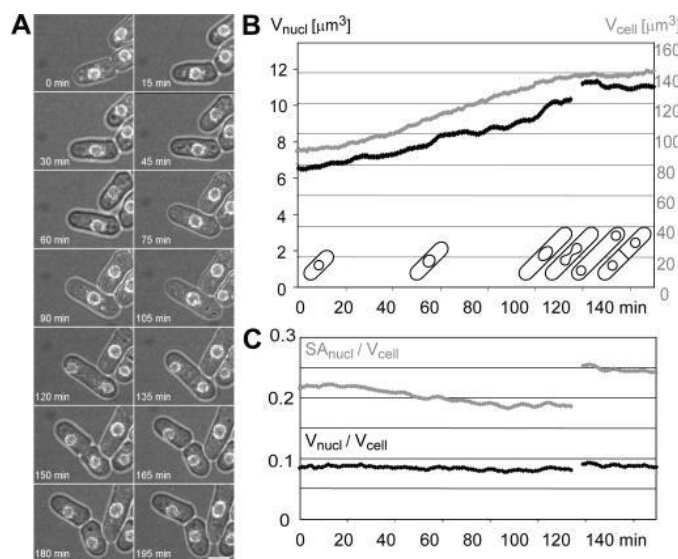
Régen azt feltételezték, hogy a hasadó élesztő sejtmagjának mérete konstans a ciklus alatt. Egy 2007-ben megjelent cikk ezt a hipotézist megcáfolta. Kísérletesen megállapították a kutatók, hogy a sejt és a sejtmag mérete között igen széles tartományban pozitív korreláció tapasztalható (20. ábra). A vizsgálatot sokfajta sejtrel végezték, többek között: vad típusú hasadó élesztő haploid és G₂-fázisban blokkolt diploid formájával, továbbá *wee1*⁻ és *cdc25* mutáns tenyészetekkel is.



20. ábra:

A sejt és a sejtmag mérete közötti összefüggés (Neumann and Nurse, 2007).

Ha a sejt mérete arányos a sejtmaggal, akkor a ciklusban bekövetkező növekedés miatt a sejtmag térfogata is változni fog. Ezt is bizonyították kísérletesen (Neumann and Nurse, 2007). A ciklus során azonos időközönként mikroszkóp segítségével felvételt készítettek a sejt növekedéséről (21. ábra). Meghatározták a sejt és a sejtmag térfogatát, valamint értékük hányadosát. Arányuk 0,08 körüli értéket vesz fel a sejtciklus alatt.



21. ábra:
A sejtmag és a sejt térfogatának hányadosa konstans (Neumann and Nurse, 2007).

Az utóbbi eredmények alapján felmerül a kérdés: hogyan képes szabályozni a sejt saját, valamint nukleuszának méretét? Választ egy nemrégiben publikált cikk segítségével adhatunk (Cohen-Fix, 2010), amelyben a szerző az összefüggést az importin- α fehérje membrántranszportjában látja.

2.9. A sejtciklus modellezése

A sejtciklusban működő molekuláris mechanizmus működését dinamikus rendszerként értelmezhetjük, működését matematikai modell segítségével vizsgáljuk. Előnye, hogy olcsó és hatékony. Az ilyen kutatáshoz elengedhetetlen egyes számítógépes programok használata. Bonyolultabb eseteknél lehetetlen kézzel megoldanunk a differenciál egyenleteket, ezért óriási előny, ha egy számítógépes szoftver olcsón és gyorsan elvégzi. Említést kell tenni a modellezés hátrányáról is: nem lehet vele vizsgálni a rendszer összes elemét. Ennek követ-

kezményeként sajnos nem tudjuk teljesen reprodukálni a mért eredményeket, azaz a valóságot.

Napjainkig számos matematikai modell készült a sejtciklus mechanizmusának leírására, melyek más-más szempontból közelítették meg a folyamatot:

1. A Cdk nukleáris akkumulációjával irányított sejtciklus modellek:

Novák Béla és John J. Tyson kutatócsoportjainak modelljeiben a középpontban az S-fázis és az M-fázis inicializálása áll. E modellekben nemcsak a Cdc13, hanem a Cig2 ciklin szerepével is foglalkoztak (Novak and Tyson, 1997). Szerintük az SPF és az MPF nukleáris akkumulációja szabályozza a méretkontrollt a két ellenőrzési ponton (Novak et al., 2001). Utóbbi modellnek a kutatócsoport nemcsak a determinisztikus, hanem a sztochasztikus verzióját is elkészítette.

2. Cdc25 fehérje sejtmag és citoplazma közti megoszlásán alapuló modell:

A sejtmag ciklus alatti térfogatváltozásának felismerésével (Neumann and Nurse, 2007) a kutatók más irányban kezdtek vizsgálni. Kínai kutatók modelljének mozgatórugója a Cdc25 fehérje mennyiségének a sejtmag és citoplazma közti megoszlása volt (Li et al., 2010).

3. Koncentráció gradienssel szabályozott méretkontroll modell:

A modell alapja a Pom1 koncentráció gradiensére épülő publikáció volt (Berthelot-Grosjean and Martin, 2009). Az első ilyen modell, amelyben felhasználták a 2009-ben publikált cikk kísérletes eredményeit, Németh Márton 2012-ben elkészített szakdolgozatában olvasható.

3. Célkitűzések

Az OTDK dolgozatom egyik célja volt, hogy az előzőleg elkészített matematikai modell (Németh, 2012) G_1 -fázisú méretkontrollt leíró egyenletein változtassak és paraméterein optimalizáljak. A változtatni kívánt indexek: ciklusidő (CT), születési (BL) és osztódási méret (DL). Az előzőleg elkészített modellnél nem egy adott mutáns törzsből vették a szimulációhoz felhasznált adatokat (BL, CT). Ez teljesen érthető, hiszen a ciklusidő elvileg nem függ a mutációtól, azaz „csak” BL értéket kell megfelelően kiválasztani. A probléma az volt, hogy a vad típusú és a *wee* mutáns sejt esetében a ciklusidő nem volt azonos a szimulációk során. Ezt a problémát szeretném megoldani. A dolgozatomban a vad típusú sejtek a hasadó élesztő *cdc2-33* törzset fogom érteni, mivel permisszív hőmérsékleten alig tér el a viselkedésük egymástól, ugyanakkor indukciós szinkronizáció készíthető ezzel a törzsszel.

A modell pontosságát méretkontroll ábrázolásokkal fogom ellenőrizni. Ez azt jelenti, hogy a szimulált sejtek születési méretének függvényében ábrázolom az osztódási méretüket, a sejtciklus alatti növekedésüket, az egyes fázisok alatti növekedésüket, a fázisok illetve az egész ciklus hosszát. A kapott függvények meredekségét a kísérletes eredmények megfelelő adataival fogom összehasonlítani (Sveicz et al., 1996).

A méretkontroll mechanizmusát bifurkációs diagramok elkészítésével és elemzésével is fogom vizsgálni, mind vad típusú, mind *wee1⁻* mutáns sejtre nézve. A módszer segítségével megállapítható, hogy az egyes sejtípusokban melyik fázis a fontos a méretkontroll szempontjából, illetve a sejttömeg és a periódusidő között milyen összefüggés áll fenn.

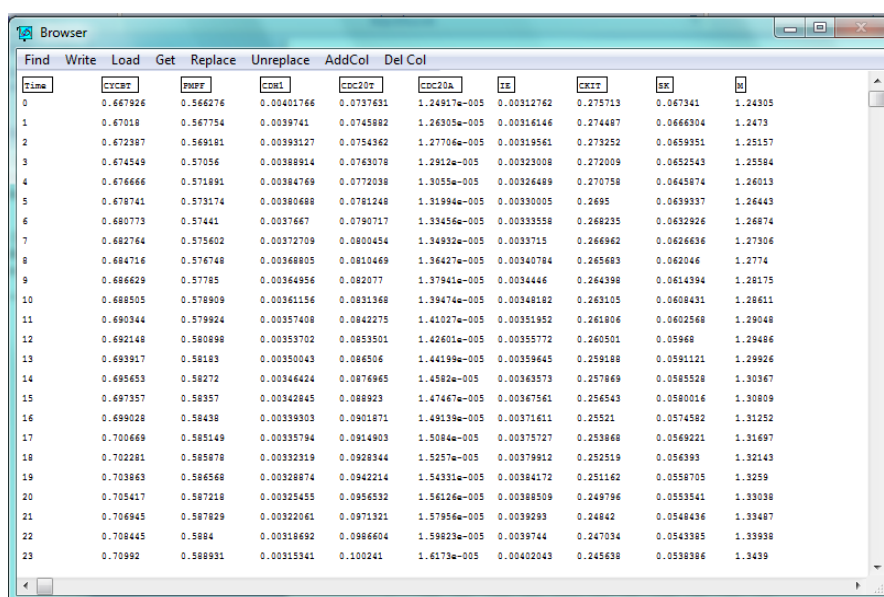
A fő célom azonban, ahogyan a OTDK dolgozatom címe is sugallja, a G_1 -fázisú méretkontroll vizsgálata volt. Munkám során a vad típusú és a *wee1⁻* mutáns sejtek szimulációjával kívánom meghatározni, hogy ebben a fázisban melyik fehérje mennyisége a releváns. Következő lépés ennek a meghatározott inhibitor aktivitásának vizsgálata determinisztikus modell segítségével. A Wee1 fehérje aktivitására beépített „hígulással” (Németh, 2012) analóg módon kívántam a releváns fehérje aktivitására alkalmas kifejezést alkalmazni.

4. Vizsgálati módszerek

4.1. Felhasznált szoftverek

A molekuláris hálózatban fontos fehérjékre illesztett differenciál egyenleteket a WinPP[®] (www.math.pitt.edu/~bard/xpp/xpp.html) nevű program segítségével oldottam meg.

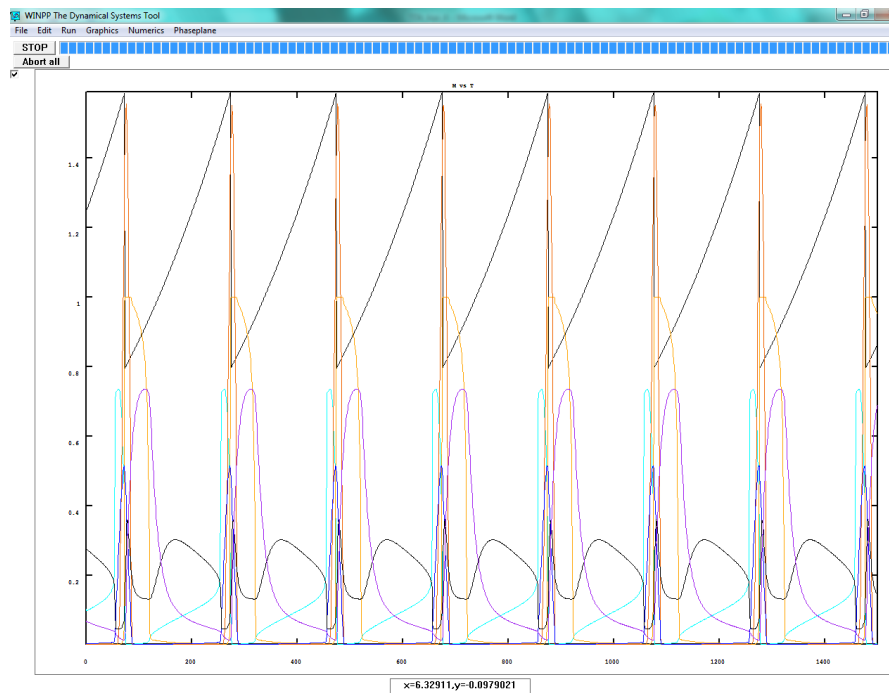
Munkámat .ode fájlok segítségével végeztem, amely a közönséges differenciálegyenleteket képes megoldani. A paraméterek és változók értékeit pedig a program megnyitása után egy .set fájlból lehet betölteni és változtatni. Ha lefuttatjuk a programot, a differenciálegyenletek megoldásait az időben a „Browser” ablak fogja mutatni (22. ábra).



22. ábra:
A WinPP[®] szoftver „Browser” ablaka.

A program segítségével grafikusán tudjuk ábrázolni a ciklus fontos változóinak (sejt-tömeg, fehérjék) időben való változását (23. ábra).

Ezen kívül külön ablak tartalmazza a kezdeti értékeket és a paramétereket. A WinPP[®] szoftver többféle módon képes megoldani numerikusan az egyenleteket, korábbi megfontolások alapján az ún. Stiff-módszert választottam.



23. ábra:
A sejtciklus fontos változóinak grafikus ábrázolása.

A programban a különböző tagok aktivitásának kiszámításakor egy viszonyszámot kapunk, amelyet át kell alakítani. A sejt valódi méretének meghatározásánál a sejt méretére szimulált értékét szoroznom kell a vad típusú tenyészet átlagos születéskori méretével, továbbá korrigálnom kell a vad típusú, állandósult állapotú sejt születéskori méretének szimulált értékével.

Munkám során a szimulációs eredmények kiértékelését a Microsoft Excel[®] szoftver segítségével végeztem.

4.2. A matematikai modellezés

A méretkontroll működésében szerepet játszó gének és fehérjék közötti kölcsönhatások megismerése kulcsfontosságú. Ezek a hálózatok rendkívül összetettek így csak számítógéppel tudjuk megmondani a biológiai rendszer adott pillanatban lévő állapotát.

A molekuláris hálózat viselkedését leíró diagramok analógok az áramkörök kapcsolási rajzával. Az áramkörben szereplő kondenzátorok, ellenállások, tranzistorok helyett itt fehérjék, gének és metabolitok szerepelnek. Ha az elektronok áramlását is le tudjuk írni a „természet könyvének nyelvével” (Galilei), akkor miért ne kísérlehetnénk meg a fiziológiai szabályzó rendszerek leírását is a matematikával (Tyson et al., 2003)?

A biokémiai reakciókban résztvevő releváns gének, fehérjék és egyéb molekulák mennyiségének változására kinetikai egyenletet írunk fel. Több részből épülnek fel ezek az egyenletek: szintézis, lebomlás, aktiválás stb. Így egy sokparaméteres differenciálegyenlet rendszert kapunk, melyet a már ismerttetett szoftver segítségével megoldva információt kapunk a rendszer viselkedéséről.

4.3. Egyszerűsítések a modellben

„A modern természettudományos gondolkodás először Galileinél jelentkezik. Ő fogalmazza meg világosan az empiria, a kísérlet, a hipotézis és a természettörvény kapcsolatait, a tudományos kutatás módszerét és a természettudományos modell szerepét...A modell olyan gondolati struktúra, amellyel a természeti jelenségek egy jól körülhatárolt csoportját a tapasztalat segítségével úgy írjuk le, sokszor matematikailag, hogy minden a vizsgált probléma szempontjából lényegtelen hatást elhanyagolunk.”

(Részlet egy Galileo Galileiről szóló leiratról;<http://metal.elte.hu/~radkat/erajz/galilei.htm>)

A kísérleti és a számításokból kapott eredmények sohasem fedik egymást tökéletesen a folyamat bonyolultsága miatt alkalmazott egyszerűsítések miatt. A modellben az S-, és a G₂-fázist közösen tárgyaltam (S+G₂), mert nincs a két fázis között éles határvonal (Lygeros et al., 2008). Másik egyszerűsítés, hogy a szeptum-képzéssel nem foglalkozunk, hiszen az a méretkontroll szempontjából nem jelentős.

4.4. A sejtciklus vizsgálatának módszerei

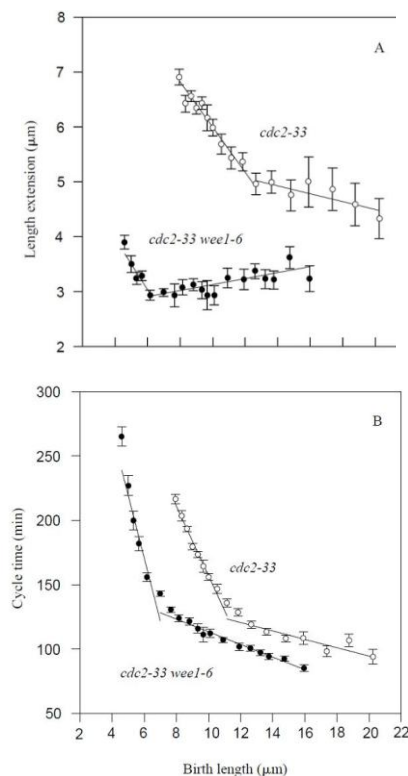
4.4.1. A méretkontroll vizsgálata

A méretkontroll vizsgálata során legelső lépésként állandósult állapotbeli sejtciklust, majd indukciós szinkronizációval a vad típusú sejtre jellemző átlagosnál kisebb, illetve nagyobb mérettel rendelkező sejtek egymás utáni ciklusait vizsgáltam. Ehhez több adatra van szükségünk: a születéskori (BL, Birth Length), az osztódáskori (DL, Division Length) méret, a hossznövekedés (Ext, Extension), a ciklusidő (CT, Cycle Time) értékei nagyon fontosak. A ciklusidőt, és a hossznövekedést közvetve határoztam meg, míg a többi adatot leolvasással. A fázisok időtartamának, illetve ezen szakaszok alatt létrejövő növekedés vizsgálatához szükségünk van bizonyos fehérjék aktivitásának ismeretére, hogy az intervallumok

elejét és végét az adott fehérje bizonyos szintjéhez kötni tudjuk. A G₁-fázis végét a Ste9 proteín aktivitásának 0,1 alá való eséséhez, az S+G₂-fázis végét az MPF 0,5 aktivitásának eléréséhez, az M-fázis végét az osztódáshoz kötjük, ahol az MPF aktivitása 0,1 alá esik. Az elemzések során, ahogyan a Célkitűzések című fejezetben is említettem, a születéskori méret függvényében vizsgáljuk az osztódáskori méretet, hossznövekedést, ciklusidőt továbbá az egyes fázisok alatti hossznövekedést, és a fázisok időtartamát.

A méretkontroll vizsgálatok során az adatokat régebben publikált kísérletes eredményekkel vettem össze, melyben *cdc2-33* és *cdc2-33 wee1-6* indukciós szinkron tenyészetekkel vizsgálták a fontos paramétereket (Sveiczter et al., 1996). Ábrázolták a mért eredményeket (24. ábra), és azt tapasztalták, hogy egy bizonyos méret előtti tartományban erős negatív korreláció, míg utána nagyon gyenge negatív, esetleg pozitív korreláció tapasztalható. A töréspont azonban nem egyezik meg tökéletesen a két diagramon se a vad, se a *wee1*⁻ mutáns sejtre nézve. A két töréspont között azonban csak 1 µm eltérés van, ezért elég, ha ebbe a tartományba esik a szimulált adatokkal kapott egyenesek töréspontja.

Az alapmodellben (egyszerűség kedvéért Modell-A) a ciklus elején bekövetkező növekedéstől nem tekintünk el, míg a fejlesztett modellben (Modell-B) már elhanyagoltuk az első 5 perc alatt bekövetkező növekedést. A változást az indokolja, hogy a kísérletes vizsgálatok szerint, a sejt nem növekszik a G₁-fázis elején.



24. ábra:
Indukciós szinkron tenyészetek vizsgálatának eredményei (Sveiczter et al., 1996).

4.4.2. Bifurkációs diagram

A bifurkációs diagramok vagy más néven bifurkációs térképek alkalmasak a rendszer stabilitásának vizsgálatára. A dinamikai rendszer állapotát bizonyos számú állapotjelzővel írhatjuk le n dimenzióban. Ahhoz, hogy információt nyerjünk a rendszer viselkedéséről, ki kell választanunk két komponenst, amelyek segítségével két dimenzióban tudjuk jól szemléltetni a változásokat. Az egyik komponens a bifurkációs paraméter, amelyet lerögzítünk egy adott pontban, és vizsgáljuk, hogy a változó (másik komponens) hogyan reagál. Majd egy másik pontban rögzítjük, és itt megnézzük a változó értékét. A bifurkációs diagramok esetében beszélhetünk stabil fókuszpontról, illetve határciklusos oszcillációról. Stabil fókuszpont esetén a rendszer egy adott állapothoz tart. Azt az értéket, amelynél a stabil fókuszpontról oszcillációra vált át a rendszer *bifurkációs pontnak* hívjuk.

Munkám során a bifurkációs paraméter a sejttömeg, a változó az MPF aktivitása volt. A diagram készítéséhez szükségünk van megfelelő .ode fájlokra, amelyekben a tömeget rögzítettük és a programban paraméterként kezeljük. Az egyes intervallumok határait az MPF aktivitásának mennyiségéhez kötjük. Az ábrázolási módszerrel vizsgálni lehet, hogy a sejt mekkora tömegnél hagyja el az adott fázist. A vad típusú hasadó élesztő sejtciklusának G_1 -, S-, G_2 -fázisa stabil fókuszpontoknak tekinthetők, míg M-fázisa esetén oszcillál a rendszer. Utóbbi esetben tehát egy adott tömeg értékéhez egy MPF-tartomány tartozik, melynek minimumát és maximumát határoztam meg. Ez azt jelenti, hogy bizonyos méret elérésekor már M-fázisba léphet a sejt, ahonnan csak úgy tud kilépni, ha MPF aktivitása lecsökken egy bizonyos szintre.

5. Eredmények

5.1. Modell-A

Munkám során Novák Béla és kutatócsoportja által kifejlesztett matematikai modellre (Novak et al., 2001; Sveiczter et al., 2001) épülő, tovább fejlesztett verziókat (Rácz-Mónus, 2010; Németh, 2012) vizsgáltam és alakítottam tovább.

A Modell-A azonban az eredeti, 2001-ben publikált modellől eltér. Az elsődleges probléma, ami javításra szorult az, exponenciális növekedés feltételezése (1).

$$\frac{dM}{dt} = \mu \cdot M \quad (1)$$

A tömeg maximum értékét nem szabályozta az eredeti séma, ennek következtében a nagy sejtek jóval többet nőttek a kísérletesen alátámasztott adatoknál (Sveiczter et al., 1996).

A megoldás a logisztikus függvény alkalmazása volt (Németh, 2012):

$$\frac{dM}{dt} = \mu \cdot M \cdot \left(1 - \frac{M}{M_{star}}\right) \quad (2)$$

A logisztikus függvényre jellemző maximált érték az M_{star} . Az új paraméter beépítésének hátránya is van: optimalizálni kell és ennek értéke egyes modelleknél eltérő lehet. Az előzőleg megkapott (a Modell-A-ra is jellemző differenciál egyenletek) és konstansok a Függelék fejezet F1. és F2. táblázatában találhatók meg.

A másik lényeges változtatás (Németh, 2012) kísérletes eredményekre épült (Berthelot-Grosjean and Martin, 2009). A modellbe a Pom1 kináz sejten belüli eloszlásának hatását kívánták beépíteni. Utóbbi fehérje aktivitása fordítottan arányos a mérettel, ezért inhibitor híguláson alapuló modellnek nevezték el az így kapott makettet. A sejt közepén arányosnak vehető a Pom1 mennyisége a Wee1 fehérje aktivitásával, vagyis „hígulása” értelmezhető úgyis, mint a Wee1 fehérje „hígulása”. A szükséges korrekcióhoz csak az eredeti Wee1 fehérje sebességi együtthatójának egyenletét (3) kell módosítani egy B/M szorzóval, ahol B egy paraméter, M a tömeg, továbbá k_{wee} értékét megváltoztatva az egyenlet egyszerűsíthető (4).

$$k_{wee} = k'_{wee} + (k''_{wee} - k'_{wee}) \cdot G(V_{awe}, V_{iwe}[MPF], J_{awe}, J_{iwe}) \quad (3)$$

$$k_{wee} = k'_{wee} + k''_{wee} \cdot \frac{B}{M} \cdot G(V_{awe}, V_{iwe}[MPF], J_{awe}, J_{iwe}) \quad (4)$$

5.1.1. Paraméter optimalizálás

Munkám kezdetén kifejlesztett Modell-A-hoz régi kísérletes eredményekből vettem a fontos adatokat (Sveicz et al., 1996). WT, állandósult állapotban lévő sejtek átlagos születési hossza 8,5 μm , osztódási mérete 15,2 μm a ciklusideje 197 perc (Sveicz et al., 1996). Egy „WT” (*cdc2-33*) törzs jellemzői: 8,2 μm -os nagysággal születik, 14,4 μm -rel osztódik, illetve *cdc2-33 wee1-6* dupla mutánsra jellemző adatok: születési méret 5,2 μm , osztódási méret 8,5 μm és a ciklusidő 217 perc. A „WT” törzs ugyanazt jelenti, mint a *cdc2-33* törzs, utóbbi jelölését fogom alkalmazni a továbbiakban. Elvileg hasadáskor kétszer akkora hosszúnak kellene lennie a sejtnak, mint amivel született. Az eltérést azonban meg tudjuk magyarázni: bizonyos méret elérése után történik a szeptumképzés, mely során már nincs sejtnövekedés, hanem a sejtvégek lekerekednek. A modell nem jelzi ki nekünk ezt a megnyúlást, ezért hanyagoltam el a ciklus első 5 percében bekövetkező növekedést.

Korábban írtam, hogy az előzőleg elkészített modell egyik hibája volt a vad típusú és *wee1*⁻ mutáns sejt ciklusidejének egyenlőtlensége. Az alap modellemben a születési méretet, és a beállítandó ciklusidőt a *cdc2-33* és *cdc2-33 wee1-6* mutáns törzs kísérletes eredményeiből állítottam be (Sveicz et al., 1996). A *cdc2-33* törzs esetén a ciklusidő állandósult állapotban szimulált hosszára 200 percet, születési méret értékére 8 μm -t és az osztódási méret nagyságára 16 μm -t kaptam. A kívánt ciklusidő értékét M_{star} , továbbá a méretkontroll erősségét k_{wee} sebességi együtthatójában szereplő k_{wee} értékének optimalizálásával állítottam be. A kapott paraméterek értéke és a Modell-A egyenletei a Függelék fejezet F1. és F3 táblázataiban találhatók meg. A vad típusú sejtre jellemző maximális növekedés méretét kísérletes eredményből vettük (Mitchison and Nurse, 1985). A kutatás során szintén *cdc2-33* törzzsel foglalkoztak, azt vizsgálták, hogy milyen nagyra nőhetnek a törzs egyes sejtjei (25. ábra).

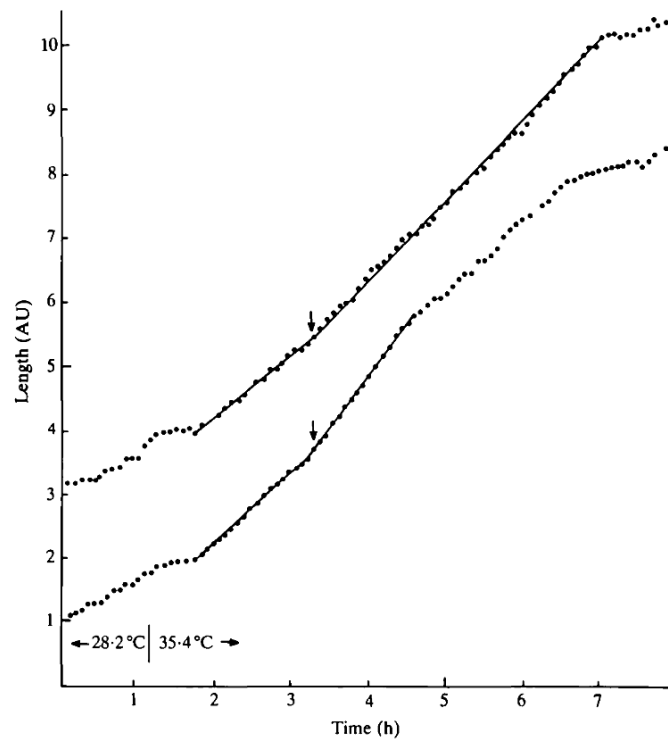


Fig. 7. Growth in total length of two cells of *cdc2.33* shifted at 68 min from 28.2°C to 35.4°C. Arrows mark points of rate change. Lines are fitted. Ordinate in arbitrary units (AU). For upper curve, 1 AU = 3.21 μm . For lower curve, 1 AU = 9.62 μm .

25. ábra:

A vad típusú sejtre jellemző maximális méret kísérletes meghatározása (Mitchison and Nurse, 1985).

A diagram segítségével kiátlagoltuk az egyes sejtek maximális méretét (5):

$$\frac{10,5\mu\text{m} \times 3,21 + 8,6\mu\text{m} \times 9,62}{2} = 58,2 \mu\text{m} \quad (5)$$

A kapott értéket viszonzszámmá kell konvertálnunk, hogy a modellben használni tudjuk. Ehhez szükségünk van egy szimulált, vad típusra jellemző, állandósult állapotban lévő, és egy mért születéskori méretre. A szimulált értéket egy kész modell által megadott adatokból (Németh, 2012), míg a születéskori méret értékét kísérletes eredmények átlagából (Sveicz et al., 1996) vettem (6):

$$\frac{58,2\mu\text{m}}{0,848968 \times 8\mu\text{m}} = 8,56 \quad (6)$$

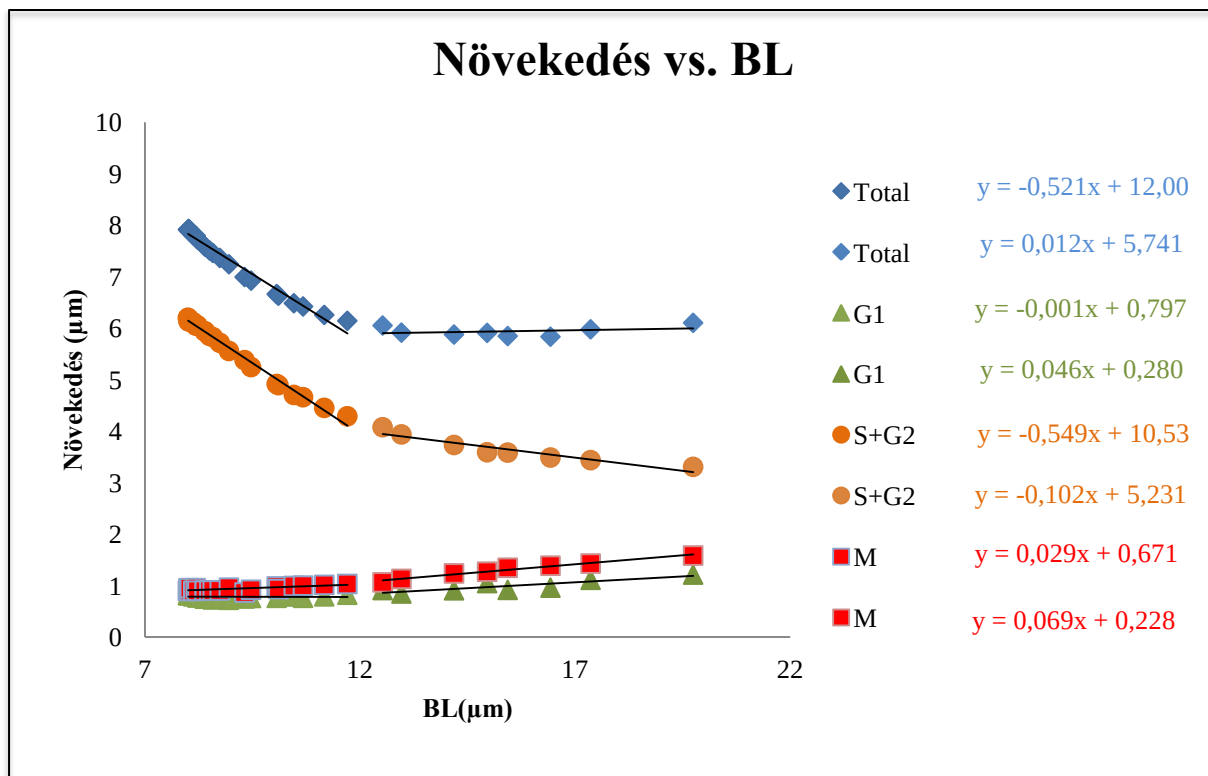
A modellbe, az egyszerűség kedvéért $M_{\text{star}}=8,5$ értéket használtam vad típusra nézve. A Függelék fejezet F3. táblázatának értékeiből látható, hogy a vad típusú és a *wee1⁻* mutáns

sejt esetében a beállított maximálisan elérhető méret (M_{star}) értéke különböző. Ha alaposan megnézzük, akkor a beállított M_{star} értékük hányadosa 0,6 körüli. Logikusan azzal magyarázhatnánk, hogy mivel a születéskori méreteik hányadosa is 0,6 körüli érték, ezért feltételezhetjük, hogy a maximálisan elérhető méretük aránya is ekörül kell legyen:

$$\frac{5}{8,5} = 0,59 \quad (7)$$

5.1.2. A vad típusú sejt analízise

A vad típusú sejtek vizsgálatát először állandósult állapotban kezdtem. A kísérletes eredmények (Sveiczter et al., 1996) alapján a vad típusú és a *wee1⁻* mutáns sejt születéskori méretének aránya 61%. Szimulált értékekkel 59,4% arányt kapunk. A kísérletes eredmény szerint a *cdc2-33* sejt ciklusideje 197 perc, a Modell-A használásával 201 percet kaptam. A méretkontroll ábrákon egy töréspont látható (26, 27. ábra) ami az egyeneseket kettéosztja, így mindegyik fázisra, illetve ciklusra két egyenest kapunk. Az első a töréspontnál kisebb sejtekre, a második a nagyobb sejtekre jellemző. A grafikonokon az azonos színű egyenesek közül az első vonatkozik a töréspontnál kisebb sejtekre, az alsó a nagyobb sejtekre. A töréspontot a kísérletes eredményekből (Sveiczter et al., 1996) meghatározott tartományban jelöltük ki, amely a vad típusú sejtek esetén 11 μm , a *wee1⁻* mutáns sejtnél 7 μm lett. Az egyenesek nagyon jól reprezentálják, hogy a töréspontnál kisebb sejtek esetében a méretkontroll erősebb, mint a nagyobb sejteknél. Az eredeti, kísérletes eredményeket (Sveiczter et al., 1996) az alapmodellel szimulált adatokkal fogom összehasonlítani. Az 1. táblázat tartalmazza az egyenletek meredekségét. A táblázatok első sorában szereplő „kis” szó, a töréspont előtti tartományra, míg a „nagy” a töréspont utáni tartományra vonatkozik. A dolgozatomban szereplő hasonló táblázatokra érvényes a fent leírt értelmezés. A kísérletes adatok (Sveiczter et al., 1996) csak a teljes ciklusra vonatkoznak, nincsenek korábban mért eredmények az egyes fázisokra, így azokat nem fogom a táblázatba leírni, mivel nem tudom összehasonlítani konkrét értékkel.



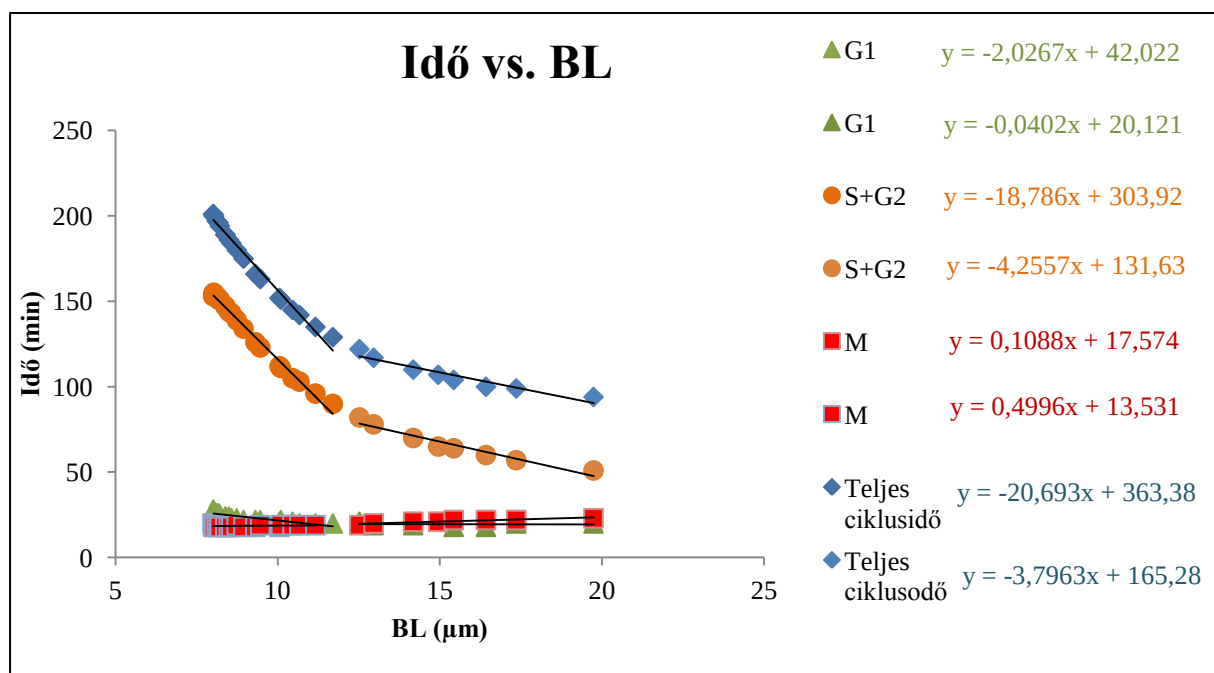
26. ábra:
A Modell-A méretkontroll vizsgálata vad típus esetén, a ciklus alatti növekedés a születéskori méret függvényében ábrázolva.

1. táblázat: A 26. ábrához tartozó szimulált és mért eredményekből kapott egyenesek meredekségei.

Fázis (sejtciklus) sejtméret	Meredekség (szimulált adat)	Meredekség (kísérletes adat)*
Total, kis	-0,521	-0,41
Total nagy	0,012	-0,07

* (Sveicz et al., 1996)

A kísérletesen meghatározott Növekedés vs. BL ábrázolás (26. ábra) csak kismértékben tér el a szimulált egyenestől. A kisebb sejteknél (töréspont előtti tartományban) csekély mértékben tér el a mért és a szimulált egyenes meredeksége. Nagy sejtek esetén nagyon enyhe pozitív korreláció tapasztalható a számítógéppel meghatározott Ext vs. BL egyenesén, ami első ránézésre ellentmond a kísérletesen meghatározott eredményeknek. Azonban a mért eredményeknél is csak egy nagyon gyenge negatív korreláció tapasztalható, tehát mondhatnánk azt is, hogy a ciklus alatti növekedés nem függ a születéskori mérettől az átlagos méretnél nagyobb vad típusú sejtek esetén.



27. ábra:
A Modell-A méretkontroll vizsgálata vad típus esetén, a ciklusidő, illetve a fázisok ideje a születéskori méret függvényében ábrázolva.

2. táblázat: A 27. ábrához tartozó szimulált és mért eredményekből kapott egyenesek meredekségei.

Fázis (sejtciklus) sejt méret	Meredekség (szimulált adat)	Meredekség (kísérletes adat)*
Total, kis	-20,693	-26,9
Total nagy	-3,7963	-3,3

* (Sveicz et al., 1996)

A születéskori méret függvényében ábrázolva a teljes sejtciklust (27. ábra) megállapítható, hogy hasonló eredményt kaptam a szimulált és a mért eredmények esetén. Kísérletes adatoknál (Sveicz et al., 1996) a teljes ciklusidő a legnagyobb születéskori mérettel rendelkező sejtnél 90 perc, a szimulált érték 94 perc. Ha az egyes fázisok hosszát is megvizsgáljuk a születéskori méret függvényében, akkor megállapíthatjuk, hogy a G₁- és M-fázis szinte független attól, hogy a mekkora mérettel rendelkezik a sejt születése pillanatában (27. ábra). Továbbá a paraméter optimalizálással sikerült az S+G₂ fázist a töréspontnál nagyobb mérettel születő sejtek esetén megnövelnem az előzőleg elkészített modellhez (Németh, 2012) képest. A Modell-A vad típusú sejtekre vonatkozó adatait a Függelék fejezet F6. táblázata tartalmazza.

5.1.3. Bifurkációs diagramok vad típus esetén

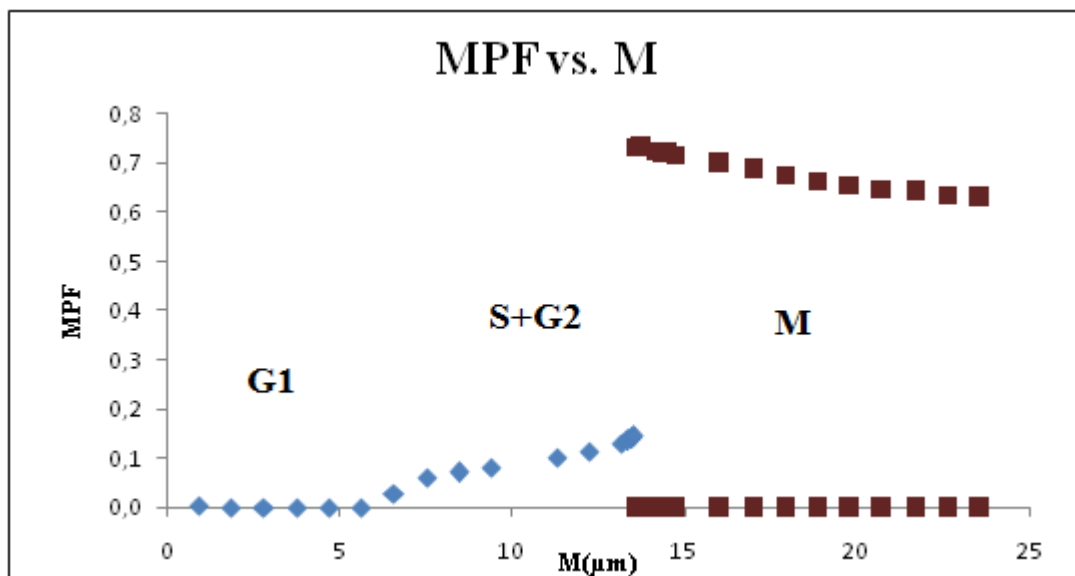
A diagram (28. ábra) azt mutatja, hogy amíg a sejttömeg kicsi, addig a rendszer egy stabil fókuszponthoz tart. Ez igaz mind a G_1 -, S-, G_2 -fázisokra, csak az MPF aktivitásának nagysága tér el az egyes szakaszokban. A G_1 -fázisban közel 0 az MPF aktivitása, S-, és G_2 -fázis során csekély mértékben, de megemelkedik a mennyisége, és egy bizonyos MPF érték után (bifurkációs pont) a rendszer oszcillálni fog. Ez az M-fázis, mely során a rendszer két határ között oszcillál. A szimulált értékekből látható (28. ábra), hogy $13,56 \mu\text{m}$ nagyságú méretnél tud bekövetkezni az oszcilláció.

A hasadó élesztő *cdc2-33* sejtje átlagosan $8 \mu\text{m}$ nagysággal születik. Ha megnézzük a diagramon (29. ábra) egy valódi, vad típusú sejt életciklusát, akkor azt látjuk, hogy az S+ G_2 -fázisban születik meg. A ciklus során egyre nagyobb méretűvé válik, így közeledik a bifurkációs ponthoz. Ha elérte a bizonyos $13,56 \mu\text{m}$ nagyságú méretet, akkor M-fázisba léphet. Szimulált értékek szerint $8 \mu\text{m}$ nagyságú értékhez $15,91 \mu\text{m}$ nagyságú osztódási méret tartozik, ami közel egyenlő a kísérletes eredménnyel (Sveicz et al., 1996). Ha ezt a tömeget eléri a sejt, akkor periódusa végéhez ér, és $8 \mu\text{m}$ -re ugrik vissza a mérete, mert elosztódik. A diagram (28. ábra) pontjai azt mutatják meg, hogy a rendszer végtelen idő alatt milyen állapothoz fog beállni. A valóságban nincs végtelen ideje, tehát a valódi rendszer késni fog. A grafikon alatt lesz a valódi sejtre jellemző ciklus során a görbe.

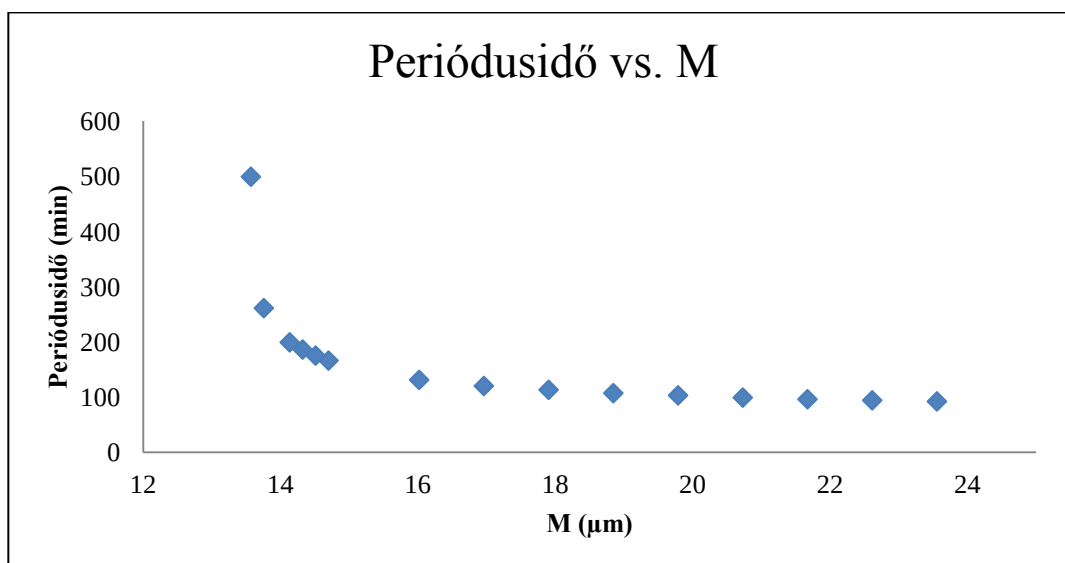
Egy születéstől a tömeg felezéséig tartó periódust jellemezhetünk a periódusidővel. Ha a méret függvényében ábrázolom a periódusidőt, akkor „fordított arányosság” figyelhető meg. Tehát egy viszonylag kis sejtnak nagy a periódusideje, hiszen meg kell nőnie ahhoz, hogy elérje azt az MPF értéket, aminél oszcillációba kezd és osztódni fog. Nézzünk egy példát nagyobb sejtre is! Valamilyen módszerrel irreálisan nagyra növesztettük a sejtet, mondjuk $23 \mu\text{m}$ értékűre. A fent leírtak alapján beláthatjuk, hogy elhagyva a bifurkációs pontot, gyors egymás utáni osztódásba kezd a sejt (28. ábra). De szüksége van egy bizonyos periódusidőre, hogy az alapvető sejtciklusos események bekövetkezzenek (29. ábra). Tehát mindenképpen lesz egy minimális periódusidő, ami közelít a kísérletesen mért eredményekhez (Sveicz et al., 1996).

A bifurkációs pontig a rendszer stabil fókuszpontokhoz tart, míg utána határ között, véges amplitúdóval fog oszcillálni. A bifurkációs ponthoz végtelen periódusidő tartozik, ezért SNIC (Saddle Node Infinite Circle), vagy SNIPER (Saddle Node Infinite Periode) bifurkációnak szokás hívni (29. ábra)

A bifurkációs adatok összefoglalva a Függelék fejezet F7. táblázatában tekinthetők meg.



28. ábra:
A Modell-A bifurkációs diagramja vad típusú hasadó élesztő esetén.



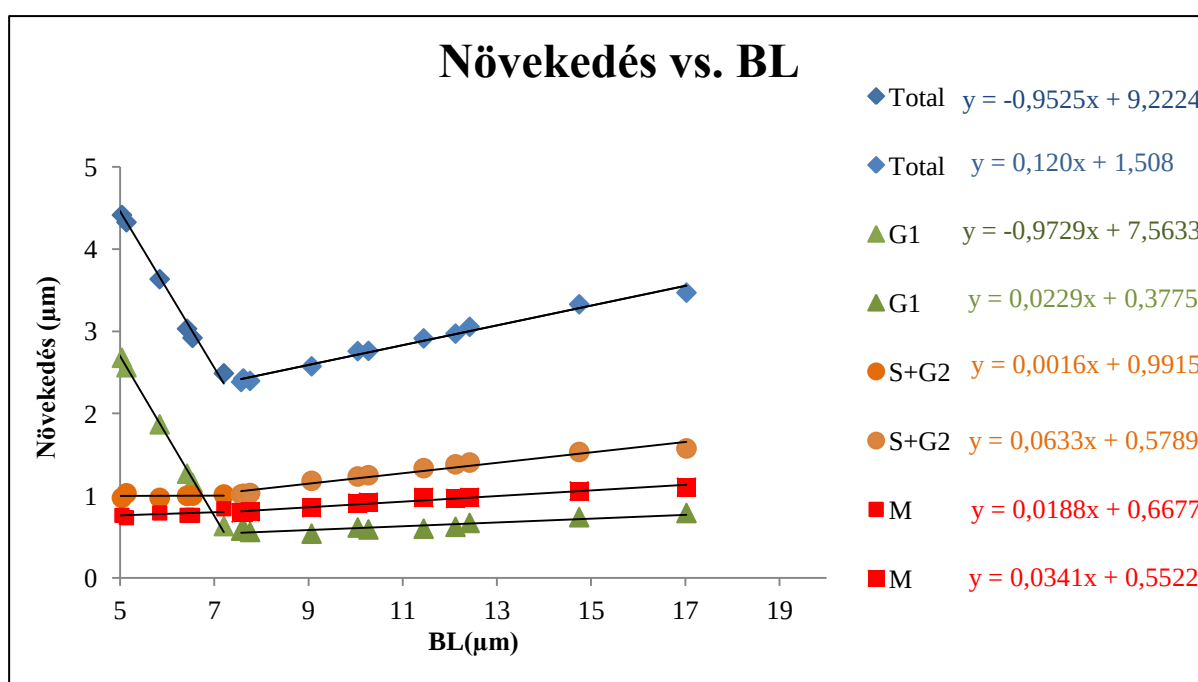
29. ábra:
A Modell-A tömeg és periódusidő összefüggését mutató bifurkációs diagramja vad típusú hasadó élesztőnél.

5.1.4. A *wee1*⁻ mutáns sejt analízise

A Modell-A *wee1*⁻ mutáns sejt analízisére vonatkozó adatait a Függelék fejezet F8., és F9. táblázataiban olvashatók.

A különböző vizsgálati módszereket nemcsak vad típusú sejten, hanem *wee1⁻* mutáns sejténél is alkalmaztam, hiszen a G₁-fázisú méretkontroll nem a vad típus esetén, hanem ennél a mutánsnál jelentős, munkám pedig főként a G₁-fázis vizsgálata volt.

A *wee1⁻* mutáns vizsgálatát is állandósult állapot megfigyelésével kezdtem. Kísérleti eredmények szerint (Sveicz et al., 1996) a *cdc2-33 wee1-6* mutáns ciklusideje 217 perc, a Modell-A-val 202 percet kaptam. Az eltérés talán magyarázható azzal, hogy a kísérletes eredményt kevés mintával határozták meg. A vad típusú sejt ciklusidejére 201 percet kaptam, azaz már kiküszöböltem az egyik problémát, mely a két sejt ciklus ideje közti eltérés volt.



30. ábra:

A *wee1⁻* mutáns sejt méretkontroll ábrája, a születéskori méret függvényében a sejtciklus, illetve az egyes fázisok alatti növekedés ábrázolása.

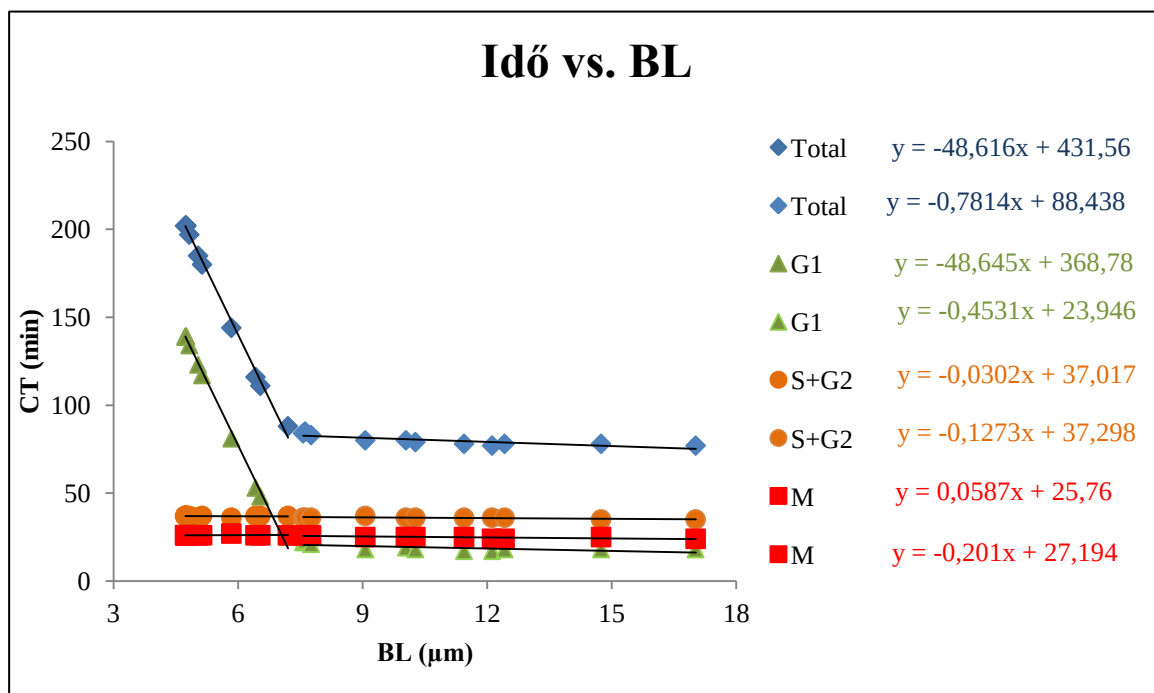
3. táblázat: A 30. ábrához tartozó szimulált és mért eredményekből kapott egyenesek meredekségei.

Fázis (sejtciklus) sejt méret	Meredekség (szimulált adat)	Meredekség (kísérletes adat)*
Total, kis	-0,9525	-0,46
Total nagy	0,120	0,05

* (Sveicz et al., 1996)

A töréspontnál (kb 7 μm) kisebb méretű sejteknél a teljes ciklus során bekövetkező növekedés nagy része a G₁-fázis során következik be, ezt a tényt a 30. ábra is jól reprezen-

tálja. Azonban a modell kisebb hibája, hogy a töréspontnál nagyobb sejtek esetén nagyobb sejtnövekedést feltételez, mint amit a kísérletesen meghatározott eredmények mutatnak (Sveiczner et al., 1996). Utóbbi eredmények elemzése szerint, a töréspont utáni tartományban közel korrelálatlan egymással a születéskori méret és a növekedés.



31. ábra:
A *wee1⁻* mutáns sejt méretkontroll ábrája, születéskori méret függvényében a ciklusidő, illetve az egyes fázisok idejének ábrázolása.

4. táblázat: A 31. ábrához tartozó szimulált és mért eredményekből kapott egyenesek meredekségei.

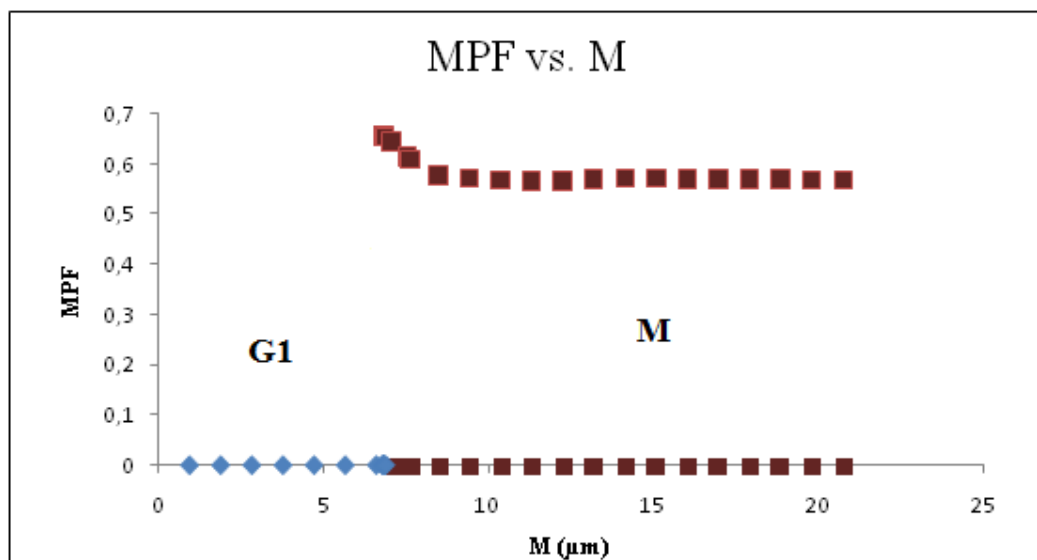
Fázis (sejtciklus) sejt méret	Meredekség (szimulált adat)	Meredekség (kísérletes adat)*
Total, kis	-48,616	-48,8
Total nagy	-0,7814	-4,9

* (Sveiczner et al., 1996)

A születéskori méret függvényében ábrázolva a ciklusidőt, illetve az egyes fázisok hosszát (31. ábra), megfigyelhetjük, hogy a G₁-fázis tart a leghosszabb ideig a töréspontnál kisebb sejteknél, míg a nagyobbaknál közel ugyanannyi. A Modell-A szerint a töréspont utáni tartományban a születéskori méret és a ciklusidő között gyenge negatív összefüggést, míg kísérletes eredmények elemzésekor egy valamivel erősebb negatív korrelációt kapunk.

5.1.5. Bifurkációs diagramok *wee1*⁻ mutáns sejt esetén

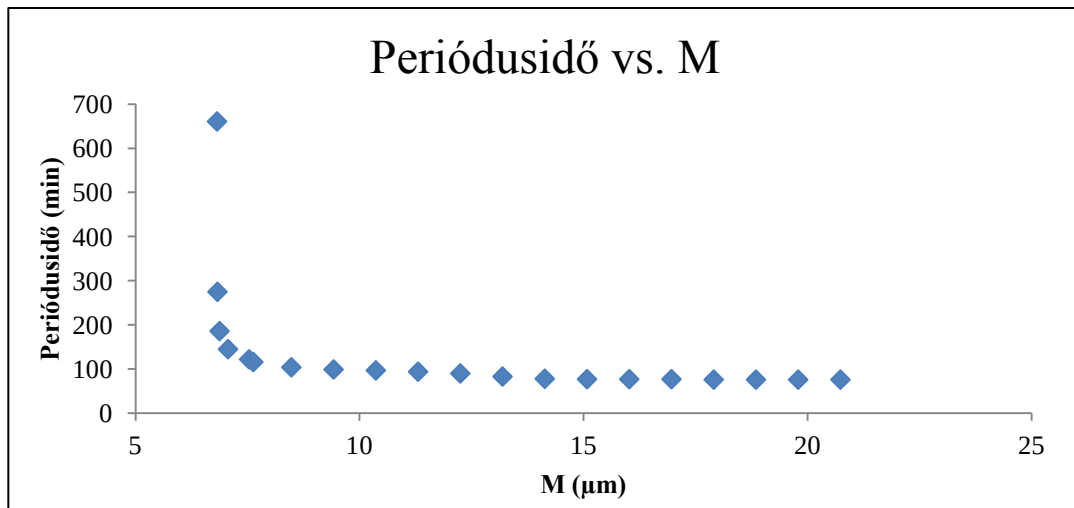
A *wee1*⁻ mutáns sejt esetén is készítettem bifurkációs diagramot a rendszer stabilitásának vizsgálatára. A 32. ábrát megfigyelve azt láthatjuk, hogy a bifurkációs pont 6,82 μm -nél van. Ugyanez a diagram azt mutatja, hogy igazából a *wee1*⁻ mutánsú hasadó élesztőnek nincsen stabil fókuszpontja az S+G₂-fázisban. Tehát, ha állandósult állapotban megszületik a mutáns sejt, akkor körülbelül 5 μm értékű mérettel rendelkezik. A ciklusának lefutását úgy kell elképzelni, hogy G₁-fázisban születik, majd növekszik egészen a 6,82 μm -ig, utána rögtön M-fázisba lép. Nem tud megállni az S+G₂ állapotban, de ettől még, a sejt nem fog elpusztulni. Csak azt jelenti, hogy nincsen olyan tömeg, ami stabil lenne az S+G₂-fázisban. Vagyis lehet, hogy a *wee1*⁻ mutánsnak nincsen G₂-fázisa?!



32. ábra:
A Modell-A bifurkációs diagramja *wee1*⁻ mutánsú hasadó élesztő esetén.

Mivel a bifurkációs pontig itt is stabil fókuszpontokhoz tart a rendszer, utána pedig véges amplitúdójú oszcillációt folytat, ahol a bifurkációs ponthoz végtelen periódusidő tartozik (33. ábra), ezért ez is egy SNIC bifurkáció.

Gyakorlatilag ugyanazt láthatjuk a 33. ábrán, mint a vad típusú sejt esetében: viszonylag kis sejteknél nagyon nagy a periódusidő, míg 13 μm érték után közel állandó.



33. ábra:
A Modell-A tömeg és periódusidő összefüggését mutató bifurkációs diagramja *wee1⁻* mutánsú hasadó hasadó élesztőnél.

5.2. Modell-B

Dolgozatomban már említettem, hogy munkám során determinisztikus modellt használtam, amelynek köszönhetően bizonyos fehérjék aktív és inaktív formáinak relatív mennyiségét tudjuk meghatározni a sejtciklus során. Azt is írtam, hogy feladatomban a G_1 -fázisú méretkontroll vizsgálata volt a hasadó élesztő vad típusú és *wee1⁻* mutáns sejtjei esetén. A Modell-B-ben a G_1 -fázisú méretkontrollra vonatkozó differenciál-egyenleteket módosítottam. A Paraméter optimalizálás című fejezetben már leírtam, hogy elhanyagoltam a Modell-B-ben a ciklus elején bekövetkező növekedést, hiszen kísérletes adatok szerint a G_1 -fázis elején a növekedés elhanyagolható.

A Modell-B vad típusú és *wee1⁻* mutánsú élesztő sejtjeire vonatkozó adatai, a Modell-B egyenletei a Függelék fejezet F4. illetve F5. táblázataiban találhatók meg. Látható, hogy az új egyenlet és a hozzá tartozó paraméter beépítésén kívül, még a $k_{15'}$ sebességi együttható értéke változott meg a Modell-B kifejlesztése során.

Második modell pontosabbá tételéhez regresszió analízist végeztem mind vad, mind *wee1⁻* fenotípusú sejt esetében. Megnéztem, hogy a korrelációs együttható hol lesz a legnagyobb mind a töréspont előtti, mind utáni tartományban. A töréspontokat így pontosabban tudtam meghatározni.

5.2.1. A dominánsabb protein meghatározásának menete

Annak eldöntésére, hogy melyik, a G₁-fázisban fontos szerepet játszó fehérje mennyiségét leíró egyenletet változtassuk meg, különböző mutáns sejteket hoztam létre szimulációsan. Három esetet vizsgáltam: először arra gondoltam, hogy a Ste9 bitorolja a fő szerepet G₁-fázisban, utána a Rum1 majd mindkettejük vizsgálata következett. Vizsgáltuk a sejtek születési, osztódási méretét, a ciklusidőt, továbbá az egyes fázisok hosszát *ste9⁻*, *rum1⁻* és *ste9⁻ rum1⁻* duplamutáns esetén is, hiszen az egyes fehérjék hiánya mutatja meg, hogy valójában mekkora szereppel bírnak a G₁-fázis során. Az eredményeket az 5. táblázat tartalmazza. Megjegyezném, hogy *ste9⁻* esetében a G₁-fázis végét nem a Ste9 fehérje aktivitásának 0,1 érték alá való csökkenése jelzi (hiszen a Ste9 aktivitása nulla), hanem közelítő értéként az MPF 0,03 nagyságú aktivitásához tartozó idő jelenti.

5. táblázat: A mutánsokra vonatkozó adatok.

Mutánsok	BL (μm)	DL (μm)	CT (min)	G ₁ -fázis hossza (min)	S+G ₂ fázis hossza (min)	M-fázis hossza (min)
Vad	8	15,91	201	39	144	18
<i>wee1⁻</i>	4,75	9,47	202	143	33	26
<i>ste9⁻</i>	6,77	13,47	196	20	159	17
<i>rum1⁻</i>	7,12	14,20	198	21	156	21
<i>ste9⁻ rum1⁻</i>	6,19	12,33	194	12	161	21

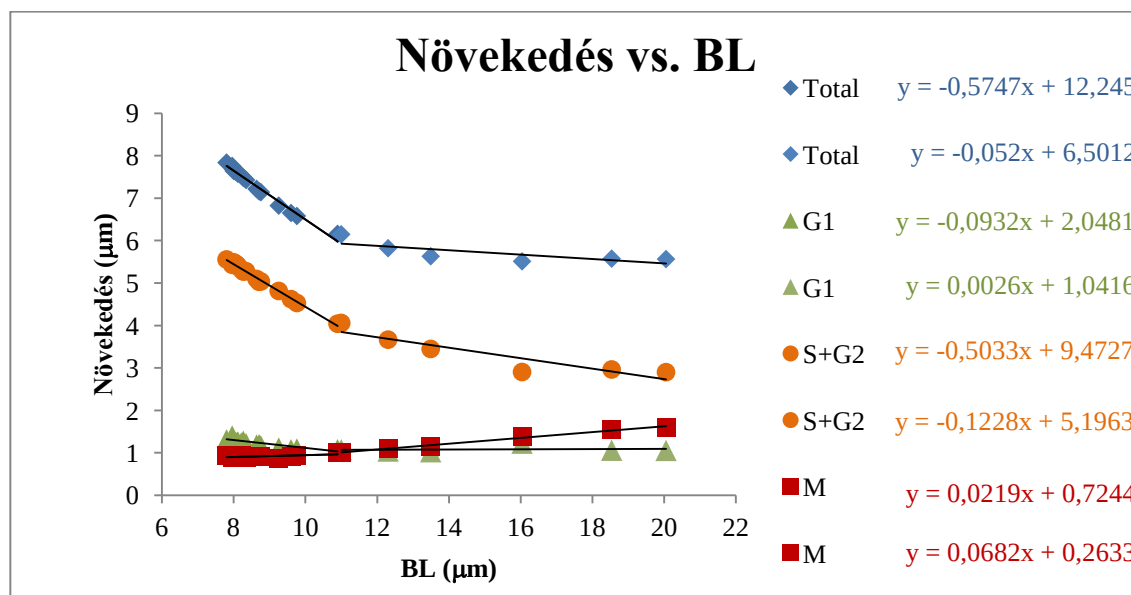
Az 5. táblázatból látható, hogy nincsen nagy különbség a *ste9⁻* és a *rum1⁻* mutáns sejt G₁-fázis hossza között, tehát mindkettő fehérje mennyiségének változására felépíthető a „higulás”. Rum1 fehérjét választottam ki, majd a modellben Rum1_{TN} néven beépítettem egy tagot, amely a nukleusz közeli Rum1 aktivitását kívánja leírni. Erre az új komponensre írtam fel azt a kifejezést, hogy a mennyisége a sejttömeggel fordítottan arányosnak vélhető.

Régebben is vizsgáltak mutánsokat szimulációval (Sveicz et al., 2000). A *rum1⁻* mutáns 0,99; a vad típusú sejt 1,00 és a *ste9⁻* mutáns 0,89 relatív mérettel született. A G₁-fázis *rum1⁻* mutáns esetében 31 perc, *ste9⁻* mutáns 12 perc hosszú volt.

5.2.2. Vad típusú sejt analízise

Legelőször megvizsgáltam a vad típusú hasadó élesztő sejtciklusát steady state körülmények között. A ciklusidő 200 perc lett, de elhanyagoltuk a ciklus első 5 percében bekövetkező növekedést.

A Modell-B segítségével elkészített méretkontroll ábrákon regresszió analízissel 11,0 μm -nél adódott a töréspont. Úgy tűnik, hogy az új tag, a Rum1T_N beépítésével a modell jobban megközelíti a kísérletes eredményeket (34. ábra). A Modell-B szerint a töréspontnál nagyobb méretű sejtek M-fázisban egyre többet nőnek, pedig ennek szinte egy vízszintes egyenesnek kellene lennie. Ez a probléma azonban nem releváns, hiszen elég kicsi az egyenes meredeksége (34. ábra). A 34. ábra és a 35. ábra is azt mutatja, hogy a vad típusú sejt esetén a G₂-fázisú méretkontroll a meghatározó, mert a teljes ciklusra vonatkozó egyenesek meredeksége majdnem megegyezik az S+G₂-fázisra vonatkozó egyenesek meredekségével.

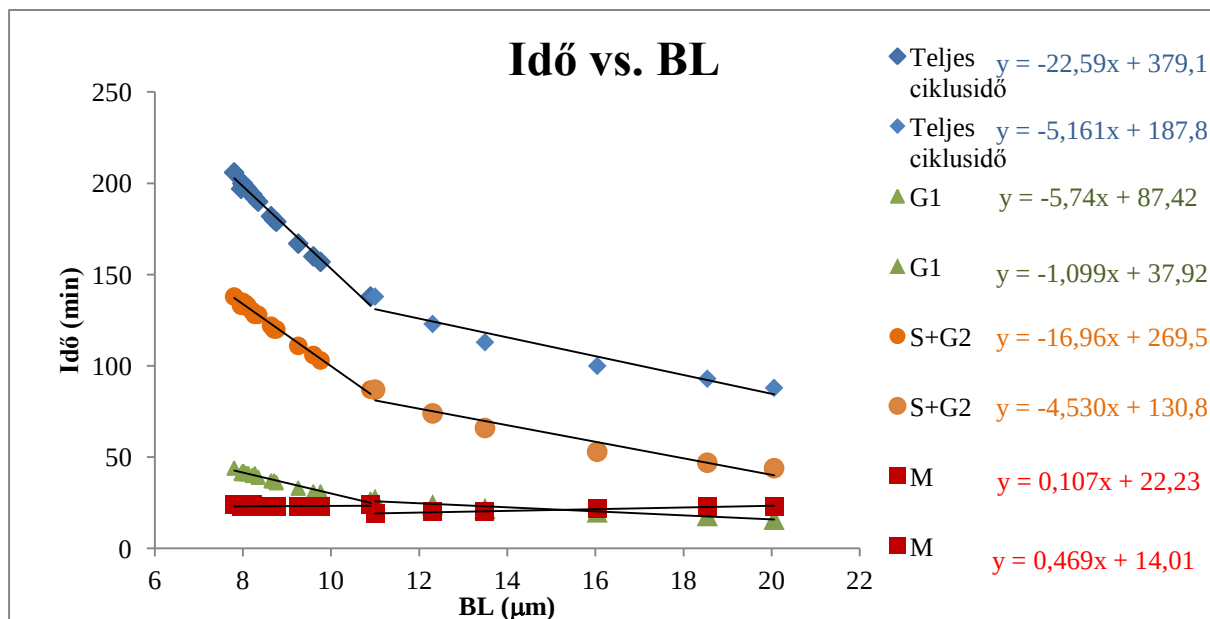


34. ábra:
A Modell-B méretkontroll vizsgálata vad típus esetén, a sejtnövekedés születéskori méret függvényében ábrázolva.

6. táblázat: A 34. ábrához tartozó szimulált és a mért eredményekből kapott egyenesek meredekségei.

Fázis (sejtciklus) sejt méret	Meredekség (szimulált adat)	Meredekség (kísérletes adat)*
Total, kis	-0,5747	-0,41
Total nagy	-0,052	-0,07

* (Sveicz et al., 1996)



35. ábra:
A Modell-B méretkontroll vizsgálata vad típus esetén, a ciklusidő, ill. az egyes fázisok hosszának a születéskori méret függvényében való ábrázolása.

7. táblázat: A 35. ábrához tartozó szimulált és mért eredményekből kapott egyenesek meredekségei.

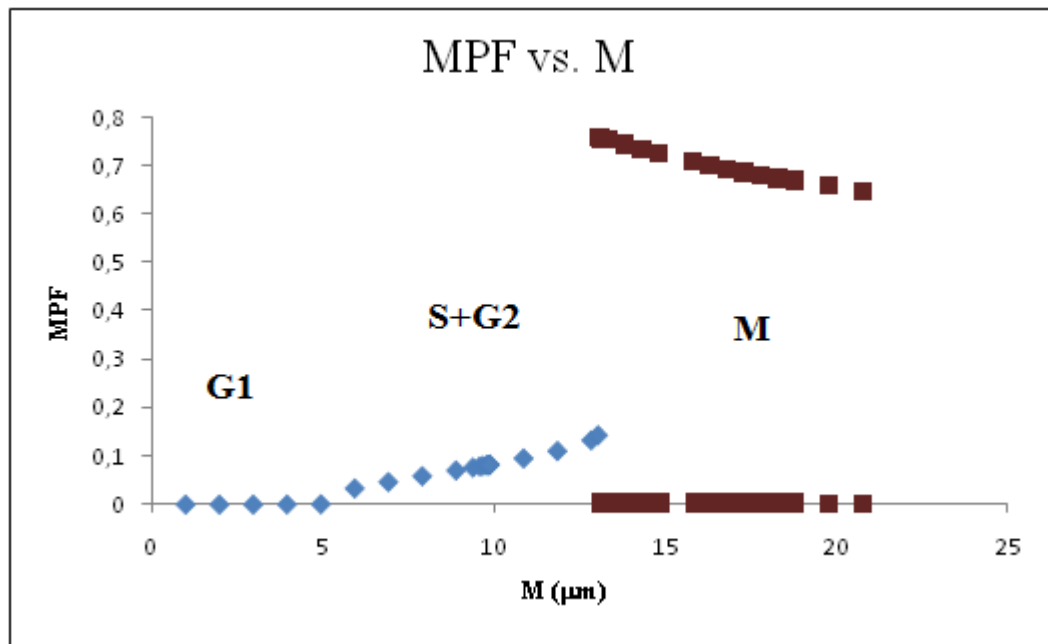
Fázis (sejtciklus) sejt méret	Meredekség (szimulált adat)	Meredekség (kísérletes adat)*
Total, kis	-22,59	-26,9
Total nagy	-5,161	-3,3

* (Sveicz et al., 1996)

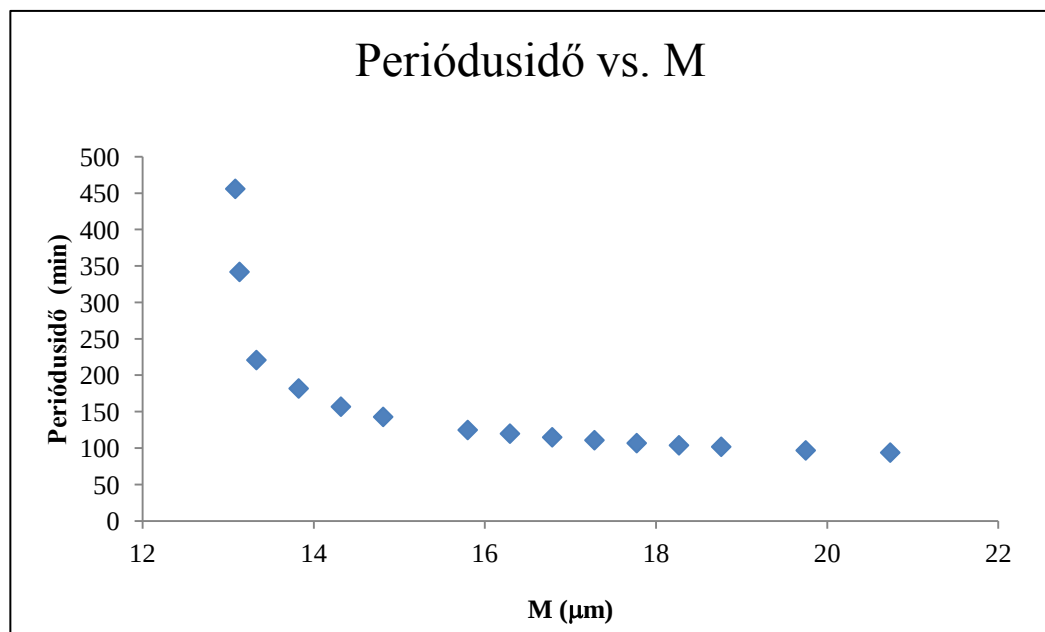
Ugyanez a „probléma” a fázishosszok, illetve a ciklusidő vizsgálatánál: a G_1 -fázis egyre rövidebb, míg az M-fázis egyre nagyobb lesz az átlagos méretnél nagyobb sejtek esetén. A kísérletes adatokat (Sveicz et al., 1996) viszont jobban megközelítik, mint a Modell-A.

5.2.3. Bifurkációs diagramok vad típusú sejt esetén

Ez is egy SNIC bifurkáció (36. és 37. ábra) melynek bifurkációs pontja $13,82 \mu\text{m}$ -nél van. Periódusidő-M grafikon (37. ábra) esetén is a végtelenből indul a függvény és egy értékhez tart.



36. ábra:
A Modell-B bifurkációs diagramja vad típusú, hasadó élesztő esetén.

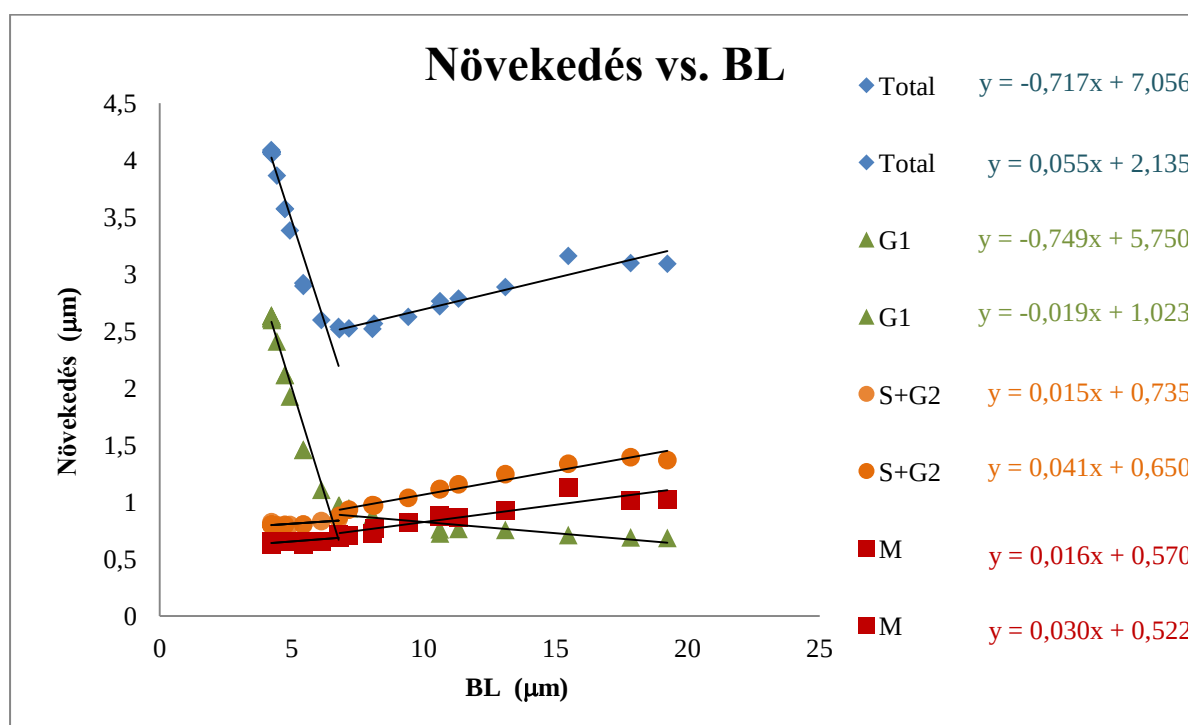


37. ábra:
A Modell-B tömeg és periódusidő összefüggését mutató bifurkációs diagramja vad típusú hasadó élesztőnél.

5.2.4. A *wee1*⁻ mutáns sejt analízise

A steady state körülmények közötti szimuláció szerint a ciklusidő 200 perc lett, ami megegyezik a vad típusú sejtével. A töréspont pedig 6 μm körül van. Regresszió analízissel is megvizsgáltam a töréspont nagyságát, így 6,1 μm értéket kaptam.

Az S+G₂-fázis és az M-fázis hossza közel független a születéskori mérettől (39. ábra), ami az Irodalmi áttekintés című fejezetemben ismertetett korábbi kísérletes eredményeket adja vissza. Ez azt jelenti, hogy szinte ugyanakkora egy kisebb és egy nagyobb méretű sejt M-, és S+G₂-fázisa. A G₁-fázisra jellemző egyenesek (39. és 40. ábra) közel párhuzamosak a ciklusidővel, ami azt jelenti, hogy a ciklus nagy részét a G₁-fázis teszi ki. Azonban túl nagyméretű sejtnél a G₁-fázis rövidebb, mint az S+G₂-fázis. A 10 μm nagyságú *wee1*⁻ mutáns sejtnél a Modell-B szerint ugyanolyan hosszú G₁-, S+G₂-, M-fázisa van. Nincs szüksége hosszú G₁-fázisra ekkora méretnél, hiszen az állandósult állapotban mért *wee1*⁻ mutáns születéskori méretének kétszeresét is elérte. Ha ennél nagyobb születéskori méretnél szimulálunk, akkor azt látjuk, hogy a G₁-fázis „sokkal” rövidebb, mint az M-, vagy az S+G₂-fázis. Állandósult körülmények között született *wee1*⁻ mutáns osztódáskori méreténél is nagyobb ebben az esetben a születéskori méret. A Modell-B szerint M-, és S+G₂-fázis független a tömegtől, tehát a gyors osztódáshoz csak a G₁-fázis hosszának csökkenése vezet.

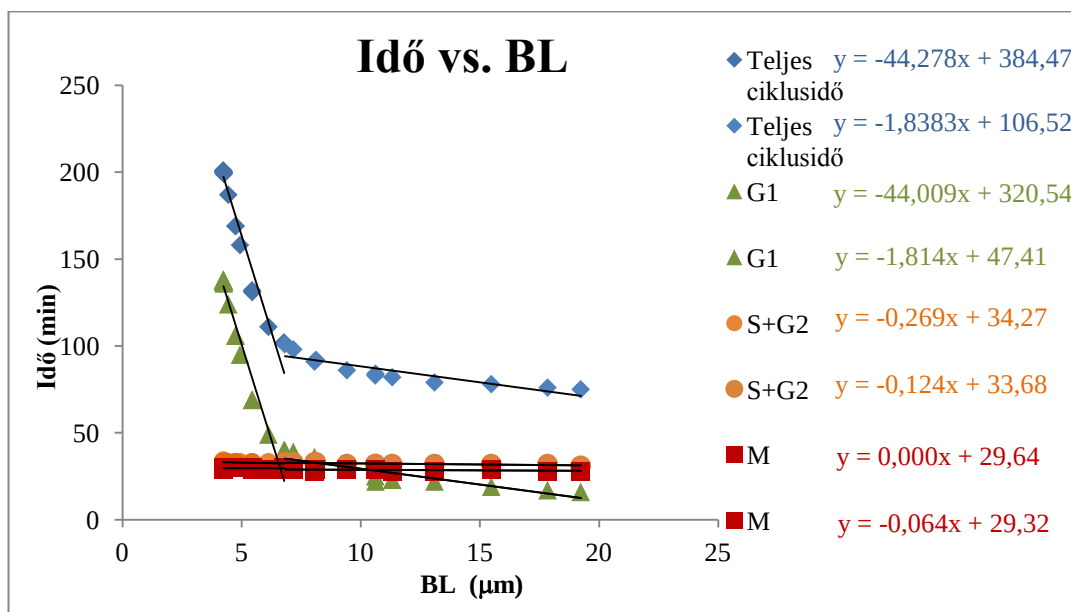


38. ábra:
A Modell-B méretkontroll vizsgálata *wee1*⁻ mutáns esetén, a sejtnövekedés születéskori méret függvényében ábrázolva.

8. táblázat: A 38. ábrához tartozó szimulált és mért eredményekből kapott egyenesek meredekségei.

Fázis (sejtciklus) sejtméret	Meredekség (szimulált adat)	Meredekség (kísérletes adat)*
Total, kis	-0,717	-0,46
Total nagy	0,055	0,05

*(Sveicz et al., 1996)



39. ábra:

A Modell-B méretkontroll vizsgálata *wee1* mutáns esetén, a sejtnövekedés születési méret függvényében ábrázolva.

9. táblázat: A 39. ábrához tartozó szimulált és mért eredményekből kapott egyenesek meredekségei.

Fázis (sejtciklus) sejtméret	Meredekség (szimulált adat)	Meredekség (kísérletes adat)*
Total, kis	-44,278	-48,8
Total nagy	-1,8383	-4,9

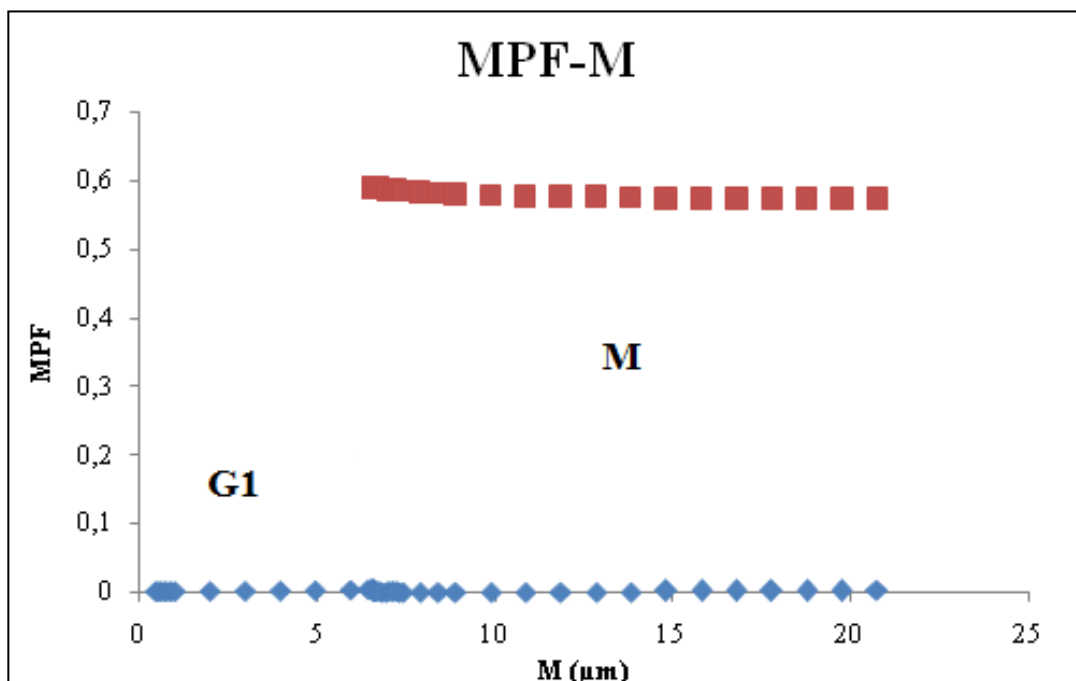
*(Sveicz et al., 1996)

A sejtnövekedést eredményesebben írja le a Modell-B, mint a Modell-A. Ezt az bizonyítja, hogy előbbi modell esetén az egyenesek meredeksége sokkal jobban megközelíti a kísérletesen meghatározott egyenesek meredekségének értékét.

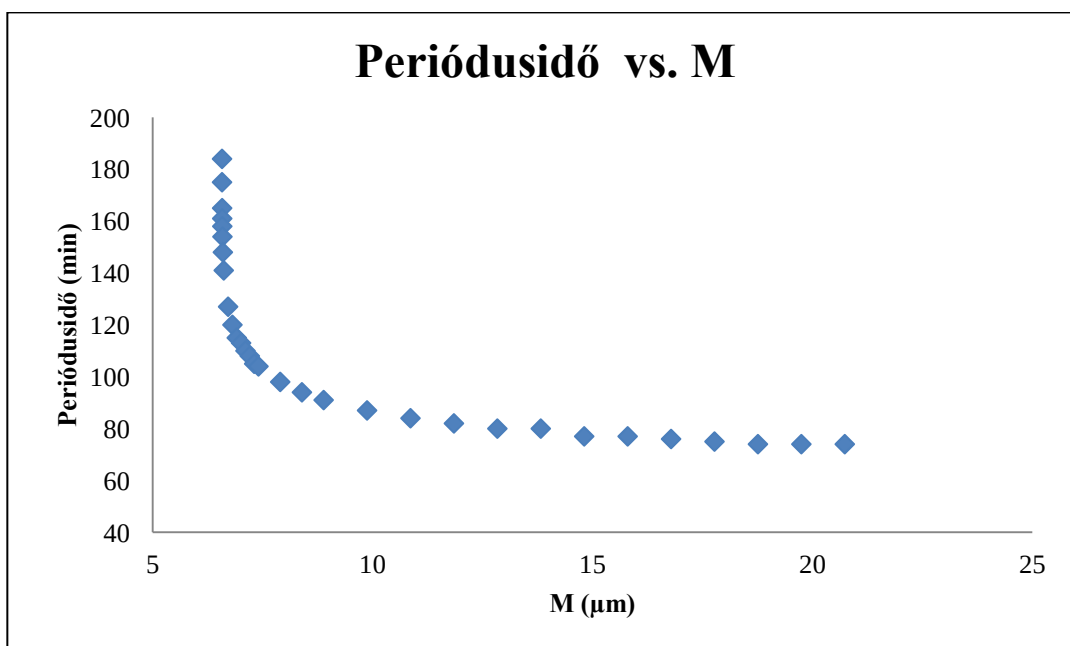
5.2.5. Bifurkációs diagramok *wee1* mutáns sejt esetén

A periódusidőt vizsgálva szintén arra a következtetésre jutottam, hogy a bifurkációs pontnál a periódusidő végtelenhez tart (41. ábra), tehát ismét egy SNIC bifurkáció jellemzi a

rendszer stabilitását. A bifurkációs pont előtt gyakorlatilag az MPF aktivitás nulla, továbbra sincs stabil S+G₂-es fázisa a mutáns fenotípusú sejtnek (40. ábra).



40. ábra
A Modell-B bifurkációs diagramja *wee1* mutánsú, hasadó élesztő esetén.



41. ábra
A Modell-B tömeg és periódusidő összefüggését mutató bifurkációs diagramja *wee1*⁻ mutánsú hasadó élesztőnél.

6. Összefoglalás

A OTDK dolgozatomban a kitűzött cél az volt, hogy az előzőleg elkészített modellt (Németh, 2012), tovább fejlesszem, illetve a G_1 -fázisú méretkontrollt részletesebben vizsgáljam. A modellt igyekeztem úgy alakítani, hogy mind a vad típusú, mind a *wee1⁻* mutáns sejt esetében a kísérletes adatokhoz közeli értéket mutasson.

A modell kinetikai egyenletekkel közelíti az egyes fehérjék mennyiségének változását. Munkám során a WinPP[®] differenciálegyenleteket numerikusan megoldó szoftverrel dolgoztam, melynek segítségével meghatároztam a releváns fehérjék aktivitását a sejtciklus pontjaiban. A program által kiírt adatokból a fázisok hosszát, egyes fázisok illetve a teljes ciklus alatti növekedést, a ciklusidőt tudtam meghatározni. A kapott adatok felhasználásával méretkontroll ábrákat készítettem, amelyeket a kísérletesen kapott eredményekkel hasonlítottam össze (Sveiczter et al., 1996).

Az egyik feladatom az előzőleg elkészített modell (Németh, 2012) paramétereinek tovább finomítása, „csiszolása” volt, mind a vad típusú, mind a *wee1⁻* mutánsú sejtre nézve. A Modell-A kifejlesztésével kiküszöböltem azt a problémát, hogy a vad típusú és *wee1⁻* mutánsú sejtek a ciklusideje eltért. Mindkét modellben ugyanakkora lett a két sejtípusra jellemző ciklusidő, továbbá születéskori méreteik hányadosa is megegyezik a kísérletesen mért születéskori méretek arányával.

Másik feladatom volt a G_1 -fázisú méretkontroll vizsgálata. Különböző mutánsok analízisével vizsgáltam, melyik fehérjének lesz nagyobb szerepe a G_1 -fázis hosszára. A Rum1 fehérjét gondoltam megfelelőnek, bár a Ste9 fehérjét is választhattam volna. Megállapítottam, hogy feltételezhető, hogy a nukleusz közeli Rum1 koncentrációja a sejtömeggel fordítottan arányos. A Modell-B méretkontroll ábrái is sokkal jobban megközelítik a kísérletes eredményeket (Sveiczter et al., 1996), mint az előzőleg kifejlesztett modell (Németh, 2012) ugyanazon grafikonjai.

Nagyon érdekes, hogy a bifurkációs diagramok alapján azt feltételezhetjük mind a Modell-A, mind a Modell-B esetén, hogy a *wee1⁻* mutánsnak nincs olyan jellemző tömege, ami G_2 -fázisban stabilan maradna.

7. Irodalomjegyzék

- Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2009. *Essential Cell Biology*. Garland Publishing, Inc., New York.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Berthelot-Grosjean, M., and S. Martin. 2009. Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature*. 459:852-856.
- Cohen-Fix, O. 2010. Import and nuclear size. *Nature*. 468:513-516.
- Creanor, J., and J.M. Mitchison. 1979. Reduction of perturbations in leucine incorporation in synchronous cultures of *S. pombe* made by elutriation. *J. Gen. Microbiol.* 112:385-388.
- Deshaies, R.J. 1995. The self-destructive personality of a cell cycle in transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:781-789.
- Fantes, P.A. 1977. Control of cell size and cycle time in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* 24:51-67.
- Forsburg, S.L., and P. Nurse. 1991. Cell-cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:227-256.
- Grallert, A., Y. Connolly, L.D. Smith, V. Simanis, and M.I. Hagan. 2012. The *S. pombe* cytokinesis NDR kinase Sid2 activates Fin1 NIMA kinase to control mitotic commitment through Pom1/Wee1. *Nature Cell Biol.* 14:738-745.
- Hachet, O., M. Berthelot-Grosjean, K. Kokkoris, V. Vincenzetti, J. Moosbrugger, and S.G. Martin. 2011. A phosphorylation cycle shapes gradients of the DYRK family kinase Pom1 at the plasma membrane. *Cell*. 145:1116-1128.
- Hartwell, L.H. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bact. Rev.* 38:164-198.
- Hunt, T. 1989. Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:268-274.
- Li, B., B. Shao, C. Yu, Q. Ouyang, and H. Wang. 2010. A mathematical model for cell size control in fission yeast. *J. Theor. Biol.* 264:771-781.
- Lygeros, J., K. Koutroumpas, S. Dimopoulos, I. Legouras, P. Kouretas, C. Heinricher, P. Nurse, and Z. Lygerou. 2008. Stochastic hybrid modeling of DNA replication across a complete genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:12295-12300.
- Maller, J.L. 1994. Biochemistry of cell cycle checkpoints at the G2/M and metaphase/anaphase transitions. *Semin. Dev. Biol.* 5:183-190.
- Mitchison, J.M. 1971. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge University Press.
- Mitchison, J.M. 1989. Cell cycle growth and periodicities. In *Molecular Biology of the Fission Yeast*. A. Nasim, P. Young, and B.F. Johnson, editors. Academic Press, New York. 205-242.
- Mitchison, J.M., and P. Nurse. 1985. Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* 75:357-376.
- Morgan, D.O. 2007. *The Cell Cycle*. New Science Press Ltd, London, UK.
- Murray, A. 1994. Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:872-876.
- Nasmyth, K. 2001. A prize for proliferation. *Cell*. 107:689-701.
- Neumann, F.R., and P. Nurse. 2007. Nuclear size control in fission yeast. *J Cell Biol.* 179:593-600.
- Novak, B., Z. Pataki, A. Ciliberto, and J.J. Tyson. 2001. Mathematical model of the cell division cycle of fission yeast. *Chaos*. 11:277-286.
- Novak, B., and J.J. Tyson. 1997. Modeling the control of DNA replication in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:9147-9152.

- Nurse, P. 1975. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature*. 256:547-551.
- Nurse, P., and P.A. Fantes. 1981. Cell cycle controls in fission yeast: a genetic analysis. In *The Cell Cycle*. P.C.L. John, editor. Cambridge University Press, Cambridge. 85-98.
- Nurse, P., P. Thuriaux, and K. Nasmyth. 1976. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 146:167-178.
- Sveiczer, A., A. Csikasz-Nagy, B. Gyorffy, J.J. Tyson, and B. Novak. 2000. Modeling the fission yeast cell cycle: quantized cycle times in *wee1⁻cdc25Δ* mutant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:7865-7870.
- Sveiczer, A., and A. Horváth. 2013. Cell cycle, fission yeast. In *Encyclopedia of Systems Biology*. W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, and K.-H. Cho, Yokota H., editors. Springer, Heidelberg - New York. xxx-xxx. (in press)
- Sveiczer, A., B. Novak, and J.M. Mitchison. 1996. The size control of fission yeast revisited. *J. Cell Sci.* 109:2947-2957.
- Sveiczer, A., and A. Rácz-Mónus. 2013. Cell size regulation, cell cycle. In *Encyclopedia of Systems Biology*. W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, and K.-H. Cho, Yokota H., editors. Springer, Heidelberg - New York. xxx-xxx. (in press)
- Sveiczer, A., J.J. Tyson, and B. Novak. 2001. A stochastic molecular model of the fission yeast cell cycle: role of the nucleocytoplasmic ratio in cycle time regulation. *Biophys. Chem.* 92:1-15.
- Turner, J.J., J. C. Ewald, and J. M. Skotheim. 2012. Cell size control in yeast. *Current Biology*. 22:350-359.
- Tyson, J.J., K.C. Chen, and B. Novak. 2003. Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Current Opinion in Cell Biology*. 15:221-231.
- Wood, V., R. Gwilliam, M.-A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, N. Peat, J. Hayles, S. Baker, D. Basham, and S. Bowman. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. 415:871-880.
- Zetterberg, A., O. Larsson, and K.G. Wiman. 1995. What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:835-842.

8. Függelék

F1. táblázat: A Modell-A, illetve az előzőleg elkészített modell (Németh, 2012) differenciál egyenletei, algebrai kifejezései

$$\frac{d[Cdc13_T]}{dt} = k_1 - (k'_2 + k''_2[Ste9] + k'''_2[Slp1]) \cdot [Cdc13_T]$$

$$\frac{dM}{dt} = \mu \cdot M \cdot \left(1 - \frac{M}{M_{star}}\right)$$

$$\frac{d[preMPF]}{dt} = k_{wee}([Cdc13_T] - [preMPF]) - k_{25}[preMPF] - (k'_2 + k''_2[Ste9] + k'''_2[Slp1])[preMPF]$$

$$\frac{d[Ste9]}{dt} = (k'_3 + k''_3[Slp1]) \frac{1 - [Ste9]}{J_3 + 1 - [Ste9]} (k'_4[SK] + k_4[MPF]) \frac{[Ste9]}{J_4 + [Ste9]}$$

$$\frac{d[Slp1_T]}{dt} = k'_5 + k''_5 \frac{[MPF]^4}{J_5^4 + [MPF]^4} - k_6[Slp1_T]$$

$$\frac{d[Slp1]}{dt} = k_7[IEP] \frac{[Slp1_T] - [Slp1]}{J_7 + [Slp1_T] - [Slp1]} - k_8 \frac{[Slp1]}{J_8 + [Slp1]} - k_6[Slp1]$$

$$\frac{d[IEP]}{dt} = k_9[MPF] \frac{1 - [IEP]}{J_9 + 1 - [IEP]} - k_{10} \frac{[IEP]}{J_{10} + [IEP]}$$

$$\frac{d[Rum1_T]}{dt} = k_{11} - (k_{12} + k'_{12}[SK] + k''_{12}[MPF])[Rum1_T]$$

$$\frac{d[SK]}{dt} = k_{13}[TF] - k_{14}[SK]$$

$$[Trimer] = \frac{2[Cdc13_T][Rum1_T]}{\Sigma + \sqrt{\Sigma^2 - 4[Cdc13_T][Rum1_T]}}$$

$$[MPF] = \frac{([Cdc13_T] - [preMPF])([Cdc13_T] - [Trimer])}{[Cdc13_T]}$$

$$[TF] = G(k_{15}M, k'_{16} + k''_{16}[MPF], J_{15}, J_{16})$$

$$k_{wee} = k'_{wee} + k''_{wee} \cdot \frac{B}{M} \cdot G(V_{awee}, V_{iwee}[MPF], J_{awee}, J_{iwee})$$

$$k_{25} = k'_{25} + (k''_{25} - k'_{25})G(V_{a25}[MPF], V_{i25}, J_{a25}, J_{iwee})$$

$$\Sigma = [Cdc13_T] + [Rum1_T] + K_{diss}$$

$$G(a, b, c, d) = \frac{2ad}{b - a + bc + ad + \sqrt{(b - a + bc + ad)^2 - 4ad(b - a)}}$$

F2. táblázat: Az előzőleg elkészített modell paraméterei (Németh, 2012):

Sebességi állandók vad típus esetén (min^{-1}) $k_1 = 0,025, k_2' = 0,03, k_2'' = 1, k_2''' = 0,1, k_3' = 1, k_3'' = 10, k_4 = 35, k_4' = 1,1, k_5'' = 0,005, k_5''' = 0,3, k_6 = 0,1, k_7 = 1, k_8 = 0,25, k_9 = 0,1, k_{10} = 0,04, k_{11} = 0,1, k_{12} = 0,01, k_{12}' = 1, k_{12}'' = 3, k_{13} = 0, k_{13}' = 0,1, k_{14} = 0,1, k_{15} = 1,5, k_{15}'' = 0, k_{16} = 1, k_{16}'' = 2, k_{25} = 0,05, k_{25}'' = 4,95, K_{diss} = 0,001, k_{wee}' = 0,15, k_{wee}'' = 0,85, \mu = 0,004$ $V_{awee} = 0,25, V_{iwee}' = 0, V_{iwee}'' = 1, V_{a25}' = 0, V_{a25}'' = 1, V_{i25} = 0,25$ Sebességi állandók $wee1^-$ mutáns esetén (min^{-1}) $k_1 = 0,025, k_2' = 0,03, k_2'' = 1, k_2''' = 0,1, k_3' = 1, k_3'' = 10, k_4 = 35, k_4' = 1,1, k_5'' = 0,005, k_5''' = 0,3, k_6 = 0,1, k_7 = 1, k_8 = 0,25, k_9 = 0,1, k_{10} = 0,04, k_{11} = 0,1, k_{12} = 0,01, k_{12}' = 1, k_{12}'' = 3, k_{13} = 0, k_{13}' = 0,1, k_{14} = 0,1, k_{15} = 1,5, k_{15}'' = 0, k_{16} = 1, k_{16}'' = 2, k_{25} = 0,05, k_{25}'' = 4,95, K_{diss} = 0,001, k_{wee}' = 0,15, k_{wee}'' = 0,15, \mu = 0,004$ $V_{awee} = 0,25, V_{iwee}' = 0, V_{iwee}'' = 1, V_{a25}' = 0, V_{a25}'' = 1, V_{i25} = 0,25$ Michaelis és egyéb konstansok (vad típus és $wee1^-$ mutáns esetén) (dimenziómentes) $J_3 = 0,01, J_4 = 0,01, J_5 = 0,3, J_7 = 0,001, J_8 = 0,001, J_9 = 0,01, J_{10} = 0,01, J_{15} = 0,01, J_{16} = 0,01, J_{a25} = 0,01, J_{i25} = 0,01, J_{awee} = 0,01, J_{iwee} = 0,1, M_{star} = 7, B = 0,9$

F3. táblázat : A Modell-A paraméterei

Sebességi állandók vad típus esetén (min^{-1}) $k_1 = 0,025, k_2' = 0,03, k_2'' = 1, k_2''' = 0,1, k_3' = 1, k_3'' = 10, k_4 = 35, k_4' = 1,1, k_5'' = 0,005, k_5''' = 0,3, k_6 = 0,1, k_7 = 1, k_8 = 0,25, k_9 = 0,1, k_{10} = 0,04, k_{11} = 0,1, k_{12} = 0,01, k_{12}' = 1, k_{12}'' = 3, k_{13} = 0, k_{13}' = 0,1, k_{14} = 0,1, k_{15} = 1,5, k_{15}'' = 0, k_{16} = 1, k_{16}'' = 2, k_{25} = 0,05, k_{25}'' = 4,95, K_{diss} = 0,001, k_{wee}' = 0,15, k_{wee}'' = 0,7, \mu = 0,004$ $V_{awee} = 0,25, V_{iwee}' = 0, V_{iwee}'' = 1, V_{a25}' = 0, V_{a25}'' = 1, V_{i25} = 0,25,$ Sebességi állandók $wee1^-$ mutáns esetén (min^{-1}) $k_1 = 0,025, k_2' = 0,03, k_2'' = 1, k_2''' = 0,1, k_3' = 1, k_3'' = 10, k_4 = 35, k_4' = 1,1, k_5'' = 0,005, k_5''' = 0,3, k_6 = 0,1, k_7 = 1, k_8 = 0,25, k_9 = 0,1, k_{10} = 0,04, k_{11} = 0,1, k_{12} = 0,01, k_{12}' = 1, k_{12}'' = 3, k_{13} = 0, k_{13}' = 0,1, k_{14} = 0,1, k_{15} = 1,5, k_{15}'' = 0, k_{16} = 1, k_{16}'' = 2, k_{25} = 0,05, k_{25}'' = 4,95, K_{diss} = 0,001, k_{wee}' = 0,15, k_{wee}'' = 0,15, \mu = 0,004$ $V_{awee} = 0,25, V_{iwee}' = 0, V_{iwee}'' = 1, V_{a25}' = 0, V_{a25}'' = 1, V_{i25} = 0,25,$ Michaelis és egyéb konstansok (vad típus és $wee1^-$ mutáns esetén) (dimenziómentes) $J_3 = 0,01, J_4 = 0,01, J_5 = 0,3, J_7 = 0,001, J_8 = 0,001, J_9 = 0,01, J_{10} = 0,01, J_{15} = 0,01, J_{16} = 0,01, J_{a25} = 0,01, J_{i25} = 0,01, J_{awee} = 0,01, J_{iwee} = 0,1, B = 0,9, M_{star(vad)} = 8,5; M_{star(wee)} = 5$
--

F4. táblázat: A Modell-B differenciál egyenletei, algebrai kifejezései, valamint paraméterei

$$\frac{d[Cdc13_T]}{dt} = k_1 - (k'_2 + k''_2[Ste9] + k'''_2[Slp1]) \cdot [Cdc13_T]$$

$$\frac{dM}{dt} = \mu \cdot M \cdot \left(1 - \frac{M}{M_{star}}\right)$$

$$\frac{d[preMPF]}{dt} = k_{wee}([Cdc13_T] - [preMPF]) - k_{25}[preMPF] - (k'_2 + k''_2[Ste9] + k'''_2[Slp1])[preMPF]$$

$$\frac{d[Ste9]}{dt} = (k'_3 + k''_3[Slp1]) \frac{1 - [Ste9]}{J_3 + 1 - [Ste9]} (k'_4[SK] + k_4[MPF]) \frac{[Ste9]}{J_4 + [Ste9]}$$

$$\frac{d[Slp1_T]}{dt} = k'_5 + k''_5 \frac{[MPF]^4}{J_5^4 + [MPF]^4} - k_6[Slp1_T]$$

$$\frac{d[Slp1]}{dt} = k_7[IEP] \frac{[Slp1_T] - [Slp1]}{J_7 + [Slp1_T] - [Slp1]} - k_8 \frac{[Slp1]}{J_8 + [Slp1]} - k_6[Slp1]$$

$$\frac{d[IEP]}{dt} = k_9[MPF] \frac{1 - [IEP]}{J_9 + 1 - [IEP]} - k_{10} \frac{[IEP]}{J_{10} + [IEP]}$$

$$\frac{d[Rum1_T]}{dt} = k_{11} - (k_{12} + k'_{12}[SK] + k''_{12}[MPF])[Rum1_T]$$

$$\frac{d[SK]}{dt} = k_{13}[TF] - k_{14}[SK]$$

$$[Trimer] = \frac{2[Cdc13_T][Rum1_T]}{\Sigma + \sqrt{\Sigma^2 - 4[Cdc13_T][Rum1_T]}}$$

$$[MPF] = \frac{([Cdc13_T] - [preMPF])([Cdc13_T] - [Trimer])}{[Cdc13_T]}$$

$$Rum1_{TN} = Rum1_T * \frac{D}{M}$$

$$[TF] = G(k_{15}, k'_{16} + k''_{16}[MPF], J_{15}, J_{16})$$

$$k_{wee} = k'_{wee} + k''_{wee} \cdot \frac{B}{M} \cdot G(V_{awee}, V_{iwee}[MPF], J_{awee}, J_{iwee})$$

$$k_{25} = k'_{25} + (k''_{25} - k'_{25})G(V_{a25}[MPF], V_{i25}, J_{a25}, J_{iwee})$$

$$\Sigma = [Cdc13_T] + [Rum1_T] + K_{diss}$$

$$G(a, b, c, d) = \frac{2ad}{b - a + bc + ad + \sqrt{(b - a + bc + ad)^2 - 4ad(b - a)}}$$

F5. táblázat: A Modell-A paramétereit, és változóit

Sebességi állandók vad típus esetén (min^{-1}) $k_1 = 0,025$, $k_2' = 0,03$, $k_2'' = 1$, $k_2''' = 0,1$, $k_3' = 1$, $k_3'' = 10$, $k_4 = 35$, $k_4' = 1,1$, $k_5'' = 0,005$, $k_5''' = 0,3$, $k_6 = 0,1$, $k_7 = 1$, $k_8 = 0,25$, $k_9 = 0,1$, $k_{10} = 0,04$, $k_{11} = 0,1$, $k_{12} = 0,01$, $k_{12}' = 1$, $k_{12}'' = 3$, $k_{13} = 0$, $k_{13}' = 0,1$, $k_{14} = 0,1$, $k_{15} = 1,034$, $k_{15}'' = 0$, $k_{16} = 1$, $k_{16}' = 2$, $k_{25} = 0,05$, $k_{25}' = 4,95$, $K_{\text{diss}} = 0,001$, $k_{\text{wee}} = 0,15$, $k_{\text{wee}}'' = 0,7$, $\mu = 0,004$ $V_{\text{awee}} = 0,25$, $V_{\text{iwee}}' = 0$, $V_{\text{iwee}}'' = 1$, $V_{\text{a25}}' = 0$, $V_{\text{a25}}'' = 1$, $V_{\text{i25}} = 0,25$ Sebességi állandók wee mutáns esetén (min^{-1}) $k_1 = 0,025$, $k_2' = 0,03$, $k_2'' = 1$, $k_2''' = 0,1$, $k_3' = 1$, $k_3'' = 10$, $k_4 = 35$, $k_4' = 1,1$, $k_5'' = 0,005$, $k_5''' = 0,3$, $k_6 = 0,1$, $k_7 = 1$, $k_8 = 0,25$, $k_9 = 0,1$, $k_{10} = 0,04$, $k_{11} = 0,1$, $k_{12} = 0,01$, $k_{12}' = 1$, $k_{12}'' = 3$, $k_{13} = 0$, $k_{13}' = 0,1$, $k_{14} = 0,1$, $k_{15} = 1,034$, $k_{15}'' = 0$, $k_{16} = 1$, $k_{16}' = 2$, $k_{25} = 0,05$, $k_{25}' = 4,95$, $K_{\text{diss}} = 0,001$, $k_{\text{wee}} = 0,15$, $k_{\text{wee}}'' = 0,15$, $\mu = 0,004$ $V_{\text{awee}} = 0,25$, $V_{\text{iwee}}' = 0$, $V_{\text{iwee}}'' = 1$, $V_{\text{a25}}' = 0$, $V_{\text{a25}}'' = 1$, $V_{\text{i25}} = 0,25$ Michaelis és egyéb konstansok (vad típus és wee1 mutáns esetén) (dimenziómentes) $J_3 = 0,01$, $J_4 = 0,01$, $J_5 = 0,3$, $J_7 = 0,001$, $J_8 = 0,001$, $J_9 = 0,01$, $J_{10} = 0,01$, $J_{15} = 0,01$, $J_{16} = 0,01$, $J_{\text{a25}} = 0,01$, $J_{\text{i25}} = 0,01$, $J_{\text{awee}} = 0,01$, $J_{\text{iwee}} = 0,1$, $B = 0,9$, $D = 0,15$, $M_{\text{star (vad)}} = 8,5$, $M_{\text{star (wee)}} = 5$
--

F6. táblázat: A Modell-A vad típusú sejtekre vonatkozó adatai

BL	DL	Ext	CT	Idő (min)			Növekedés (μm)		
μm	μm	μm	min	G1	S+G2	M	G1	S+G2	M
8	15,91	7,91	201	38	145	18	0,81	6,20	0,90
8,01	15,94	7,92	201	28	153	20	0,84	6,13	0,94
8,02	15,95	7,93	201	28	154	19	0,85	6,13	0,95
8,03	15,92	7,89	200	27	155	18	0,81	6,17	0,90
8,05	15,94	7,89	200	27	154	19	0,82	6,13	0,95
8,13	15,93	7,8	197	26	153	18	0,79	6,11	0,90
8,18	15,98	7,79	196	26	151	19	0,80	6,05	0,95
8,22	15,95	7,72	194	25	151	18	0,77	6,06	0,90
8,39	15,98	7,59	189	24	147	18	0,75	5,94	0,90
8,39	15,98	7,59	189	24	147	18	0,75	5,94	0,90
8,5	16,01	7,51	186	24	144	18	0,76	5,85	0,90
8,58	16,04	7,46	184	23	143	18	0,73	5,83	0,90
8,74	16,1	7,36	180	23	139	18	0,74	5,72	0,91
8,95	16,19	7,24	175	22	134	19	0,72	5,56	0,96
9,32	16,31	6,99	166	22	126	18	0,75	5,38	0,87
9,47	16,39	6,92	163	22	123	18	0,76	5,24	0,92
10,06	16,73	6,66	152	21	112	19	0,76	4,92	0,98
10,1	16,73	6,63	151	22	111	18	0,80	4,89	0,93
10,46	16,95	6,48	145	21	105	19	0,79	4,70	0,99
10,68	17,01	6,42	142	20	103	19	0,76	4,66	1,00
11,17	17,43	6,26	135	20	96	19	0,79	4,45	1,01
11,71	17,85	6,14	129	20	90	19	0,82	4,29	1,03
12,53	18,58	6,05	122	21	82	19	0,91	4,08	1,06
12,96	18,88	5,91	117	19	78	20	0,85	3,94	1,13
14,19	20,06	5,88	110	19	70	21	0,91	3,73	1,24
14,96	20,86	5,9	107	21	65	21	1,05	3,59	1,27
15,43	21,28	5,85	104	18	64	22	0,92	3,58	1,35
16,43	22,26	5,83	100	18	60	22	0,96	3,49	1,39
17,36	23,34	5,98	99	20	57	22	1,11	3,44	1,43
19,74	25,85	6,10	94	20	51	23	1,21	3,31	1,58

Megjegyzés: Zöld sor: állandósult állapotbeli adatok, többi sor indukciós szinkronizációval való szimulációs vizsgálatokat mutatják.

BL - Születéskori méret;

DL - Osztódáskori méret;

Ext - Teljes ciklus során bekövetkező növekedés

Növekedés - egyes fázisok alatt bekövetkező méretváltozás

CT – Ciklusidő

F7. táblázat: A Modell-A vad típusú sejtekre vonatkozó bifurkációs adatai

M	MPF		T_p
μm	min	max	min
0,94	4,10E-03	-	-
1,88	8,54E-07	-	-
2,83	1,42E-06	-	-
3,77	2,32E-06	-	-
4,71	4,13E-06	-	-
5,65	1,07E-06	-	-
6,60	2,76E-02	-	-
7,54	6,08E-02	-	-
8,48	7,08E-02	-	-
9,42	8,02E-02	-	-
11,31	1,01E-01	-	-
12,25	1,13E-01	-	-
13,19	1,31E-01	-	-
13,38	1,37E-01	-	-
13,48	1,41E-01	-	-
13,52	1,44E-01	-	-
13,57	1,18E-04	7,35E-01	499
13,76	1,21E-04	7,32E-01	261
14,13	1,29E-04	7,26E-01	199
14,32	1,34E-04	7,23E-01	186
14,51	1,38E-04	7,20E-01	175
14,70	1,40E-04	7,17E-01	166
16,02	1,80E-04	7,00E-01	131
16,96	1,91E-04	6,88E-01	120
17,90	1,95E-04	6,77E-01	113
18,85	1,90E-04	6,67E-01	107
19,79	2,02E-04	6,58E-01	103
20,73	2,07E-04	6,50E-01	99
21,67	2,07E-04	6,43E-01	96
22,62	2,09E-04	6,37E-01	94
23,56	2,11E-05	6,31E-01	92

Megjegyzés:

MPF - a bifurkációsérték, ahol csak az MPF minimuma (min) látható, ott stabil fókuszponthoz tart a rendszer. míg, abban az esetben, ha MPF maximumát (max) meghatároztam, határciklusos oszcilláció lép fel

T_p - Periódusidő (csak oszcilláció esetén)

M - Sejtméret (μm-ben átszámolva), bifurkációs paraméter

F8. táblázat: A Modell-A *wee1⁻* mutáns sejtekre vonatkozó adatai

BL	DL	Ext	CT	Idő (min)			Növekedés (μm)		
μm	μm	μm	min	G1	S+G2	M	G1	S+G2	M
4,72	9,45	4,73	202	139	37	26	2,97	1,00	0,76
4,75	9,46	4,72	202	139	37	26	2,95	1,00	0,76
4,75	9,47	4,72	202	139	37	26	2,96	1,00	0,76
4,83	9,45	4,63	197	134	37	26	2,86	1,00	0,76
5,04	9,45	4,41	185	123	36	26	2,68	0,97	0,76
5,13	9,46	4,33	180	117	37	26	2,56	1,03	0,73
5,84	9,47	3,63	144	81	36	27	1,87	0,97	0,79
6,42	9,45	3,03	116	53	37	26	1,27	1,00	0,76
6,54	9,46	2,92	111	48	37	26	1,16	1,00	0,76
7,20	9,69	2,49	88	25	37	26	0,63	1,01	0,84
7,57	9,95	2,38	84	22	36	26	0,58	1,02	0,79
7,61	10,04	2,43	85	23	36	26	0,61	1,02	0,80
7,76	10,15	2,40	83	21	36	26	0,56	1,03	0,80
9,06	11,64	2,57	80	18	37	25	0,54	1,18	0,85
10,04	12,80	2,76	80	19	36	25	0,61	1,23	0,91
10,27	13,03	2,76	79	18	36	25	0,59	1,25	0,92
11,44	14,36	2,91	78	17	36	25	0,60	1,34	0,98
12,12	15,09	2,97	77	17	36	24	0,62	1,38	0,97
12,42	15,47	3,05	78	18	36	24	0,67	1,40	0,98
14,74	18,07	3,33	78	18	35	25	0,74	1,53	1,06
17,02	20,49	3,47	77	18	35	24	0,79	1,58	1,10

Megjegyzés: Zöld sor: állandósult állapotbeli adatok, többi sor indukciós szinkronizációval való szimulációs vizsgálatokat mutatják.

BL - Születéskori méret;

DL - Osztódáskori méret;

Ext - Teljes ciklus során bekövetkező növekedés

Növekedés - egyes fázisok alatt bekövetkező méretváltozás

CT – Ciklusidő

F9. táblázat: A Modell-A *wee1⁻* mutáns sejtekre vonatkozó bifurkációs adatai

M	MPF		T _p
	μm	min	max
0,94	1,20E-06	-	-
1,89	1,96E-06	-	-
2,83	2,83E-06	-	-
3,77	4,14E-06	-	-
4,71	6,85E-06	-	-
5,66	1,68E-05	-	-
6,60	2,20E-04	-	-
6,79	3,69E-04	-	-
6,80	3,98E-04	-	-
6,81	4,37E-04	-	-
6,82	4,98E-04	-	-
6,82	5,49E-04	-	-
6,82	5,96E-05	6,55E-01	661
6,83	5,91E-05	6,55E-01	275
6,88	6,06E-05	6,53E-01	186
7,07	6,28E-05	6,44E-01	145
7,54	6,71E-05	6,15E-01	122
7,64	6,81E-05	6,09E-01	116
8,48	7,56E-05	5,79E-01	104
9,43	8,34E-05	5,72E-01	99
10,37	9,70E-05	5,69E-01	97
11,31	1,23E-04	5,67E-01	94
12,25	1,55E-04	5,66E-01	90
13,20	1,99E-04	5,70E-01	83
14,14	2,29E-04	5,73E-01	78
15,08	2,37E-04	5,72E-01	77
16,02	2,40E-04	5,71E-01	77
16,97	2,42E-04	5,71E-01	77
17,91	2,43E-04	5,70E-01	76
18,85	2,45E-04	5,70E-01	76
19,80	2,46E-04	5,69E-01	76
20,74	2,47E-04	5,69E-01	76

Megjegyzés:

MPF - a bifurkációsérték, ahol csak az MPF minimuma (min) látható, ott stabil fókuszponthoz tart a rendszer. míg, abban az esetben, ha MPF maximumát (max) meghatároztam, határciklusos oszcilláció lép fel

T_p - Periódusidő (csak oszcilláció esetén)

M - Sejtméret (μm-ben átszámolva), bifurkációs paraméter

F10. táblázat: A Modell-B vad típusú sejtekre vonatkozó adatai

BL	DL	Ext	CT	Idő (min)			Növekedés (μm)		
μm	μm	μm	min	G1	S+G2	M	G1	S+G2	M
7,80	15,64	7,84	206	44	138	24	1,34	5,56	0,94
7,96	15,72	7,76	197	41	133	23	1,43	5,43	0,90
7,99	15,67	7,68	200	42	135	23	1,30	5,48	0,90
8,00	15,69	7,69	200	42	135	23	1,30	5,49	0,90
8,01	15,65	7,64	199	42	134	23	1,30	5,44	0,90
8,03	15,68	7,66	199	42	134	23	1,31	5,45	0,90
8,06	15,68	7,62	198	41	134	23	1,28	5,45	0,89
8,10	15,71	7,61	197	41	133	23	1,28	5,43	0,90
8,12	15,70	7,57	196	41	132	23	1,29	5,39	0,90
8,21	15,75	7,54	194	40	130	24	1,26	5,32	0,95
8,27	15,75	7,48	192	41	128	23	1,31	5,27	0,90
8,35	15,78	7,43	190	39	128	23	1,25	5,28	0,90
8,64	15,86	7,22	182	37	122	23	1,22	5,10	0,91
8,71	15,87	7,16	180	37	120	23	1,23	5,03	0,91
8,76	15,90	7,14	179	36	120	23	1,20	5,04	0,91
9,26	16,08	6,82	167	33	111	23	1,14	4,81	0,87
9,60	16,25	6,65	160	31	106	23	1,11	4,62	0,92
9,77	16,35	6,58	157	31	103	23	1,12	4,53	0,93
10,90	17,06	6,16	138	27	87	24	1,11	4,04	1,01
11,00	17,15	6,15	138	27	87	24	1,07	4,06	1,01
12,31	18,13	5,82	123	24	74	25	1,04	3,67	1,11
13,50	19,13	5,63	113	22	66	25	1,03	3,45	1,16
16,04	21,56	5,51	100	20	53	27	1,23	2,90	1,38
18,54	24,12	5,58	93	18	47	28	1,06	2,96	1,55
20,06	25,62	5,56	88	16	44	28	1,06	2,90	1,61

Megjegyzés: Zöld sor: állandósult állapotbeli adatok, többi sor indukciós szinkronizációval való szimulációs vizsgálatokat mutatják.

BL - Születéskori méret;

DL - Osztódáskori méret;

Ext - Teljes ciklus során bekövetkező növekedés

Növekedés - egyes fázisok alatt bekövetkező méretváltozás

CT – Ciklusidő

F11. Táblázat: A Modell-B vad típusú sejtekre vonatkozó bifurkációs adatai

M	MPF		T _p
	μm	min max	min
0,99	2,15E-05	-	-
1,97	8,74E-05	-	-
2,96	2,09E-04	-	-
3,95	4,11E-04	-	-
4,94	7,47E-04	-	-
5,92	3,32E-02	-	-
6,91	4,64E-02	-	-
7,90	5,83E-02	-	-
8,89	7,01E-02	-	-
9,38	7,60E-02	-	-
9,58	7,84E-02	-	-
9,68	7,96E-02	-	-
9,78	8,08E-02	-	-
9,83	8,15E-02	-	-
9,84	8,16E-02	-	-
9,85	8,17E-02	-	-
9,86	8,18E-02	-	-
9,86	8,19E-02	-	-
9,87	8,20E-02	-	-
9,87	8,20E-02	-	-
10,86	9,49E-02	-	-
11,85	1,10E-01	-	-
12,84	1,32E-01	-	-
13,03	1,42E-01	-	-
13,08	6,40E-04	0,7558	456
13,13	6,48E-04	0,755155	342
13,33	6,67E-04	0,751897	221
13,82	7,17E-04	0,742228	182
14,32	8,50E-04	0,7329	157
14,81	8,29E-04	0,723767	143
15,80	9,70E-04	0,7068	125
16,29	1,28E-03	0,699122	120
16,79	1,11E-03	0,691765	115
17,28	1,18E-03	0,685095	111
17,77	1,28E-03	0,679187	107
18,27	1,35E-03	0,673389	104
18,76	1,37E-03	0,668	102
19,75	1,65E-03	0,658372	97
20,74	1,87E-03	0,647367	94

Megjegyzés: MPF - a bifurkációsérték, ahol csak az MPF minimuma (min) látható, ott stabil fókuszponthoz tart a rendszert. míg, abban az esetben, ha MPF maximumát (max) meghatároztam, határciklusos oszcilláció lép fel

T_p - Periódusidő (csak oszcilláció esetén)

M - Sejtméret (μm-ben átszámolva), bifurkációs paraméter

F12. táblázat: A Modell-B *wee1⁻* mutáns sejtekre vonatkozó adatai

BL	DL	Ext	CT	Idő (min)			Növekedés (μm)		
μm	μm	μm	min	G1	S+G2	M	G1	S+G2	M
4,23	8,32	4,09	201	138	33	30	2,63	0,80	0,65
4,23	8,30	4,07	200	138	33	29	2,64	0,80	0,63
4,23	8,30	4,07	200	138	33	29	2,64	0,80	0,63
4,23	8,30	4,07	200	138	33	29	2,64	0,80	0,63
4,24	8,31	4,07	200	137	34	29	2,61	0,83	0,63
4,24	8,31	4,07	200	137	33	30	2,62	0,80	0,65
4,24	8,32	4,07	200	137	33	30	2,62	0,80	0,65
4,24	8,32	4,08	200	137	33	30	2,62	0,80	0,66
4,25	8,31	4,05	199	136	33	30	2,60	0,80	0,65
4,44	8,31	3,87	187	124	33	30	2,41	0,80	0,65
4,74	8,31	3,57	169	106	33	30	2,12	0,80	0,65
4,74	8,32	3,58	169	69	33	30	1,46	0,80	0,66
4,93	8,32	3,38	158	69	33	29	1,46	0,81	0,63
5,44	8,36	2,92	132	49	33	29	1,11	0,84	0,65
5,44	8,34	2,90	131	40	32	30	0,97	0,85	0,71
6,12	8,72	2,60	111	39	33	29	0,95	0,88	0,69
6,78	9,32	2,54	102	36	33	29	0,88	0,94	0,71
6,81	9,32	2,52	101	30	33	28	0,82	0,98	0,72
7,17	9,69	2,53	98	30	33	29	0,83	0,97	0,77
8,06	10,58	2,52	91	25	32	29	0,76	1,04	0,82
8,12	10,69	2,57	92	22	32	29	0,73	1,11	0,88
9,42	12,04	2,63	86	23	32	29	0,77	1,12	0,88
10,61	13,33	2,72	83	22	32	28	0,76	1,16	0,87
10,62	13,38	2,76	84	19	32	28	0,71	1,25	0,93
11,32	14,11	2,79	82	17	32	29	0,69	1,34	1,13

Megjegyzés: **Zöld sor: állandósult állapotbeli adatok**, többi sor indukciós szinkronizációval való szimulációs vizsgálatokat mutatják.

BL - Születés kori méret;

DL - Osztódási kori méret;

Ext - Teljes ciklus során bekövetkező növekedés

Növekedés - egyes fázisok alatt bekövetkező méretváltozás

CT – Ciklusidő

F13. táblázat: A Modell-B *weel1*⁻ mutáns sejtekre vonatkozó bifurkációs adatai

M	MPF		T _p
	μm	min	max
0,49	2,52E-05	-	-
0,59	3,41E-05	-	-
0,69	4,39E-05	-	-
0,79	5,45E-05	-	-
0,89	6,57E-05	-	-
0,99	7,77E-05	-	-
1,97	2,33E-04	-	-
2,96	4,65E-04	-	-
3,95	8,15E-04	-	-
4,94	1,37E-03	-	-
5,92	2,31E-03	-	-
6,42	3,13E-03	-	-
6,52	3,38E-03	-	-
6,58	3,60E-03	-	-
6,58	2,96E-04	5,89E-01	184
6,58	2,96E-04	5,89E-01	175
6,58	2,97E-04	5,89E-01	165
6,58	2,96E-04	5,89E-01	161
6,58	2,96E-04	5,89E-01	158
6,59	2,96E-04	5,89E-01	154
6,60	2,98E-04	5,89E-01	148
6,62	2,99E-04	5,89E-01	141
6,71	3,04E-04	5,88E-01	127
6,81	3,11E-04	5,87E-01	120
6,91	3,18E-04	5,87E-01	115
7,01	3,24E-04	5,86E-01	113
7,11	3,29E-04	5,86E-01	110
7,21	3,37E-04	5,86E-01	108
7,31	3,44E-04	5,84E-01	105
7,41	3,52E-04	5,85E-01	104
7,90	3,88E-04	5,83E-01	98
8,39	4,19E-04	5,81E-01	94
8,89	4,57E-04	5,80E-01	91
9,87	5,37E-04	5,78E-01	87
10,86	6,30E-04	5,77E-01	84
11,85	7,27E-04	5,76E-01	82
12,84	8,32E-04	5,76E-01	80
13,82	9,60E-04	5,75E-01	80
14,81	1,11E-03	5,75E-01	77
15,80	1,24E-03	5,74E-01	77
16,79	1,49E-03	5,74E-01	76
17,77	1,59E-03	5,74E-01	75
18,76	1,82E-03	5,74E-01	74
19,75	2,04E-03	5,74E-01	74
20,74	2,32E-03	5,74E-01	74

Megjegyzés: MPF - a bifurkációsérték, ahol csak az MPF minimuma (min) látható, ott stabil fókuszponthoz tart a rendszert. míg, abban az esetben, ha MPF maximumát (max) meghatároztam, határciklusos oszcilláció lép fel

T_p - Periódusidő (csak oszcilláció esetén)

M - Sejtméret (μm-ben átszámolva), bifurkációs paraméter

9. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Sveiczer Ákosnak**, aki nemcsak lehetőséget adott munkám elvégzéséhez, de korlátlan türelmet, biztatást, és szakmai tudást.

Köszönettel tartozom **Horváth Annának**, akitől szintén sokat tanulhattam, és mindig kész volt segíteni. Köszönetet szeretnék még mondani **Vörös Eszternek**, akitől nagyon sok támogatást kaptam, továbbá **Dr. Wittmann Marian** tanárnőnek kiváló szakmai ötleteiért.

És végül, de nem utolsó sorban **Rácz-Mónus Annának** szeretnék köszönetet mondani, aki a modellezés alapjaiba bevezetett.