

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar

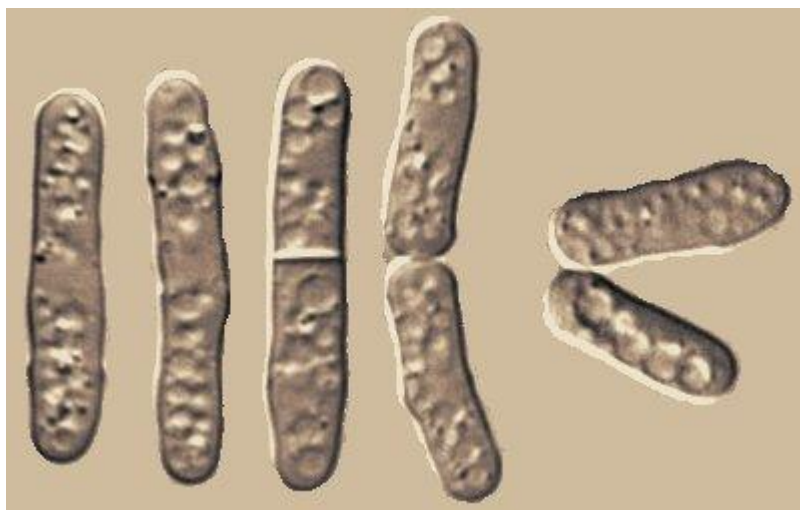
**A hasadó élesztő sejtciklusában működő G_1 - és G_2 -fázisú méretkontroll
matematikai modellezése inhibitor higulás által**

TDK dolgozat

Készítette: **Lovász Krisztina**

VI. éves biomérnök hallgató

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



Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék, 2014.

Tartalomjegyzék

1.	Ábrajegyzék	3
2.	Bevezetés	4
3.	Irodalmi áttekintés	6
3.1.	Az eukarióta sejtciklus	6
3.2.	A sejtciklus szabályozása.....	11
3.3.	A sejtciklus szabályozás molekuláris mechanizmusa.....	14
3.4.	A méretkontroll és az azt meghatározó tényezők	18
3.5.	A sejtciklus mutánsok	19
3.6.	Szinkronizálási módszerek.....	20
3.7.	A hasadó élesztő sejtciklusát működtető molekuláris hálózat.....	21
3.8.	A sejtmag térfogatának változása a sejtciklus során.....	24
3.9.	A sejtciklus modellezése	26
4.	Célkitűzések.....	28
5.	Vizsgálati módszerek	29
5.1.	Felhasznált szoftverek.....	29
5.2.	A matematikai modellezés	30
5.3.	Egyszerűsítések a modellben	30
5.4.	A sejtciklus vizsgálatának módszerei	31
5.4.1.	A méretkontroll vizsgálata	31
5.4.2.	Bifurkációs diagram.....	32
6.	Eredmények	34
6.1.	Modell-A, a kiindulási modell	34
6.2.	Modell-B.....	35
6.2.1.	Paraméter optimalizálás	36
6.2.2.	A vad típusú sejt méretkontroll ábra elemzése	37
6.2.3.	Bifurkációs diagramok vad típusú sejt esetén.....	39
6.2.4.	A <i>wee1⁻</i> mutáns sejt analízise	41
6.2.5.	Bifurkációs diagramok <i>wee1⁻</i> mutáns sejt esetén.....	43
7.	Összefoglalás	45
8.	Irodalomjegyzék	46
9.	Függelék.....	49
10.	Köszönetnyilvánítás	62

1. Ábrajegyzék

1. ábra: Az eukarióta sejtciklus	6
2. ábra: Az eukarióta sejtciklus fázisai	7
3. ábra: A mitózis fázisai	8
4. ábra: A metafázisos síkra rendezett kromoszómák	9
5. ábra: A mikrotubulusok kapcsolódása a kromoszómához	9
6. ábra: A kohezin-gyűrűk proteolízise.....	10
7. ábra: A hasadó élesztő vad típusú sejtjére jellemző fázisarányok és ellenőrzési pontok ..	13
8. ábra: A <i>wee1⁻</i> mutáns sejtje jellemző fázisarányok és ellenőrzési pontok	14
9. ábra: A központi kontrollrendszer legfontosabb eleme: a ciklinfüggő kináz	15
10. ábra: A replikáció és a rereplikációs gátlás mechanizmusa	16
11. ábra: B-típusú ciklinek degradációja	17
12. ábra: A kinázok foszforilációs módosításai a Cdk1-en.....	17
13. ábra: Az aktív MPF kialakulása.....	18
14. ábra: A molekuláris hálózat működésének sematikus ábrázolása	22
15. ábra: A G ₂ -fázis fontos szereplői	23
16. ábra: A Pom1, Tea4 és Dis2 fehérjék általi szabályzásának mechanizmusa	23
17. ábra: A Sid2 és Fin1 kinázok működésének sémája	24
18. ábra: A sejt és a sejtmag mérete közötti összefüggés	25
19. ábra: A sejtmag és a sejt térfogatának hányadosa konstans	26
20. ábra: A WinPP® szoftverrel lefuttatott szimuláció	29
21. ábra: Indukciós szinkron tenyészetek vizsgálatának eredményei	32
22. ábra: A vad típusú hasadó élesztő méretkontroll ábrája	38
23. ábra: A bifurkációs diagram vad típusú hasadó élesztő esetén.....	40
24. ábra: A Modell-B tömeg és periódusidő összefüggését mutató bifurkációs diagramja vad típusú hasadó élesztőnél.....	40
25. ábra: A Modell-B méretkontroll vizsgálata <i>wee1⁻</i> mutáns esetén.....	42
26. ábra: A Modell-B bifurkációs diagramja <i>wee1⁻</i> mutáns esetén.	44
27. ábra: A Modell-B tömeg és periódusidő összefüggését mutató bifurkációs diagramja <i>wee1⁻</i> mutáns esetén.....	44

2. Bevezetés

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

A mai gyárakban azonban nemcsak egy-két gép van, hanem gépsorok, amik egymással is kapcsolatban állnak. Ahhoz, hogy egy gyár működését megismerjük, a 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 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., 2010). A méretkontroll egy rendkívül fontos ellenőrzési folyamat, amelynek köszönhetően a sejt mérete a populációban és az egymást követő osztódások után kb ugyanakkora marad.

A sejt ciklus szabályozásának megértése modellorganizmusok használatával a legegyszerűbb. Gyakran használják erre a célra 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 hasadó élesztőként is ismert *Schizosaccharomyces pombe* kiváló modellorganizmusként szolgál jellegzetes fiziológiai tulajdonságai (pl. szimmetrikus osztódás) miatt is a sejt ciklus tanulmányozására. Használatának jelentőségét növeli az is, hogy teljes genomja 2002 óta ismert (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 sejt ciklus szabályozásának megértésében tettek nagy lépéseket. Közülük Nurse többnyire a hasadó élesztő sejt ciklusának működésével foglalkozott munkája során. Az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) különlegesen jó vizsgálati rendszernek bizonyult a sejtet M-fázisba vezető fehérje aktivitására nézve (Morgan, 2007).

A matematikai modellezés során az említett molekuláris hálózat tagjai (gének, fehérjék és molekulák) közötti kapcsolatot írjuk le. Tehát a releváns tagokra kinetikai egyenleteket írunk fel, ami a szintézist, lebomlást, aktiválást, gátlást tartalmazza. Így egy bonyolult differenciálegyenletekből 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 matematikai modellezés, mint módszer is nagyon fontos mind elméleti, mind gyakorlati kutatások során.

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

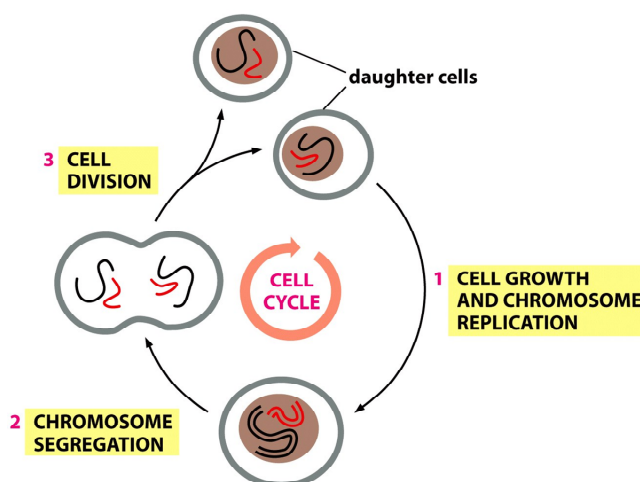
A sejtciklus szabályozásának megértése más okból is fontos, ugyanis hozzájárulhat a rák kezelésére alkalmas gyógymódok kifejlesztéséhez (Nasmyth, 2001). Ha a hasadó élesztő sejtciklusához hasonlóan modelleznénk az emberi sejt osztódását – a helyzetet az egyéb szöveti szignálok jelenléte bonyolítja ugyan – akkor térképet kaphatnánk a szabályozási folyamatban szereplő fontos fehérjéről. Koncentrációjuk változására differenciálegyenleteket felírva számszerűsíthetjük az egyes fázisokban lévő mennyiségüket. Ezáltal információt kapunk, hogy pl. mely gének lehetnek 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.

Munkám során kapott eredményeink fontosságát mutatja az is, hogy 2014. október 15-17. között megtartott Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlésén is bemutattam poszter formájában (Lovász & Sveicz, 2014). Yan és kutatócsoportja 2013-ban nemzetközi folyóiratban publikálták a legfrissebb szimulációs eredményeiket (Yan et al., 2013), amelyek kutatócsoportunk korábbi modelljén (Novak et al., 2001, Sveicz et al., 2001) és más újabb kísérletes eredményeken alapulnak.

3. Irodalmi áttekintés

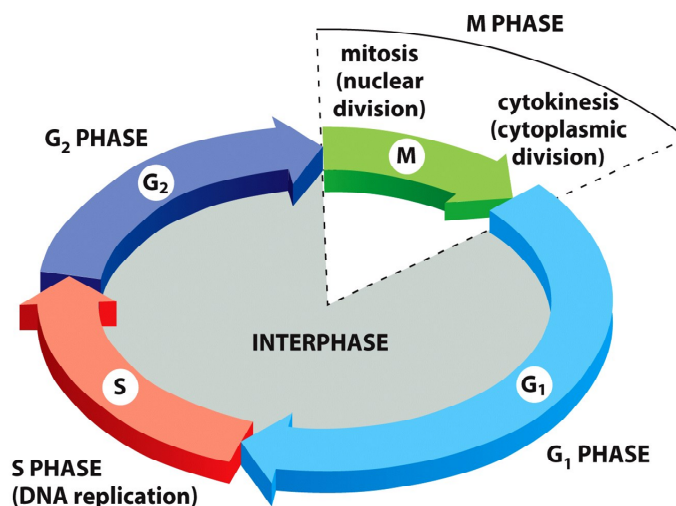
3.1. Az eukarióta sejtciklus

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., 2010). Az osztódás után keletkező két utódsejt hosszú távú fennmaradásához elengedhetetlen, hogy a sejt méretét, kromoszómakészletét, fehérjéit, egyéb sejtalkotóit megkettőzze és mindezen felsorolt molekulákat egyenletesen eloszlassa a két leánysejt között. A sejtciklus egyes eseményei diszkrétnek, azaz szigorú sorrendben kell lejátszódnuk: először a replikációnak, majd a mitózisnak és végül a sejtosztódásnak kell megtörténnie. Arról, hogy pontosan egymás után következzenek ezek az események, egy fehérjéből 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 pedig a sejt megduplázza tömegét és sejtalkotóit. Ezen események folyamatosan mennek végbe, és nem precíz sem a sejt növekedése, sem osztódása: pl. a sejt osztódáskori mérete nem lesz tökéletesen a születéskori méretének kétszerese.



1. ábra:
Az eukarióta sejtciklus (Alberts et al., 2010).

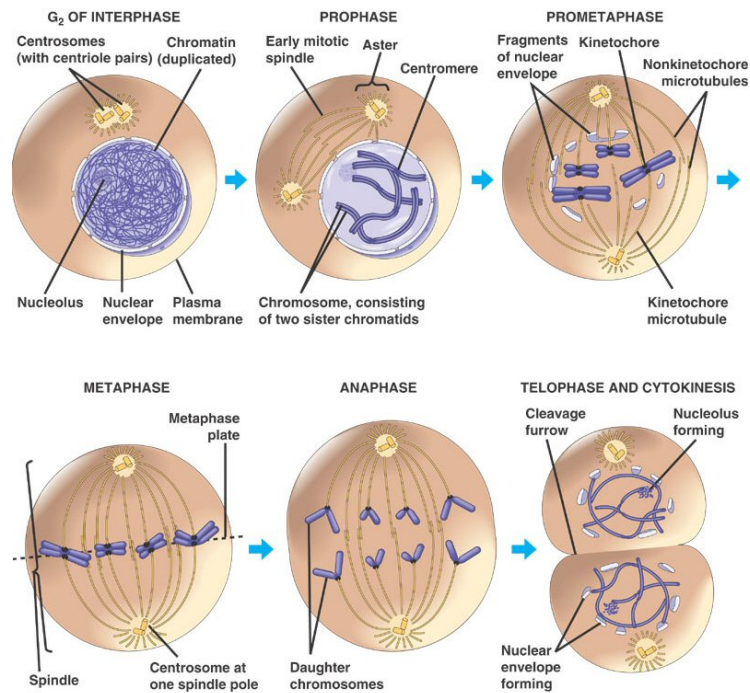
A sejtciklust két fő részre is bonthatjuk: interfázisra és M-fázisra (2. ábra). Az interfázis a két M-fázis közötti szakasz, ami további három részre: G_1 -, S- és G_2 -fázisra bontható. S-fázis során DNS replikáció, M-fázis során pedig mitózis játszódik le, utóbbi folyamat során a sejt egyenlően elosztja a leánykromatidákat a két leánysejt majdani magjaiba (Morgan, 2007). 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.



2. ábra:
Az eukarióta sejtciklus fázisai (Alberts et al., 2010).

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

A *profázis* első lépéseként egy fehérjedimer, az MPF foszforilezi a kondenzineket és a H1-hisztionokat, így a kromoszómák összetömörödött struktúrába rendeződnek, kondenzálódnak. A centromer befűződéseknél kinetochor nevű fehérjekomplex gyűlik össze. A sejtvázas elemek magorsóvá való átalakulása is elkezdődik. Az MPF foszforilez bizonyos mikrotubulus asszociált fehérjéket, amelynek következményeként a mikrotubulusok minden irányba növekedni kezdenek.



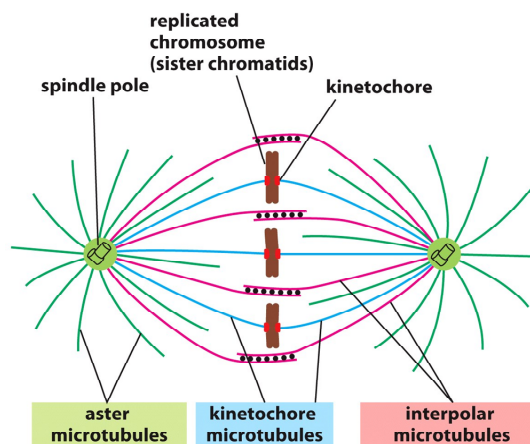
3. ábra:

A mitózis fázisai (<http://patriotapbio2010.wikispaces.com/Unit03-Cells-Mitosis>, letöltés dátuma: 2014.08.08.).

Ha a sejt kortextet eléri, könnyen letapadnak. Néhány ilyen sejt váz elem kapcsolódik a kortexhez, így stabilizálódnak, továbbá a magorsó bipoláris alakját biztosítják. A sejt kortexhez pozitív végükkel tapadó sejt váz elemeket asztrális mikrotubulusoknak hívjuk. Mindkét centroszómából mikrotubulusok erednek, melyek között kapcsolat alakulhat ki; átlapolhatnak egymáson. Ezeket interpoláris mikrotubulusoknak hívjuk.

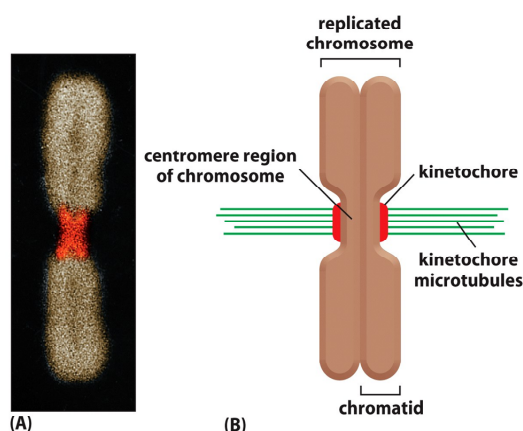
A *prometafázis* legfontosabb eseménye a sejt maghártya szétesése, amelyet a lamina réteg MPF általi foszforileződése idéz elő. A dinamikus mikrotubulusok elkezdhetik „pecázni” a replikált kromoszómákat. Ezek a sejt váz elemek kinetochor komplexen keresztül tudnak a kromoszómához kapcsolódni, innen ered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

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 elkap egy kromoszómát két irányból (5. ábra).



4. ábra:
A metafázisos síkra rendeződött kromoszómák (Alberts et al., 2010).

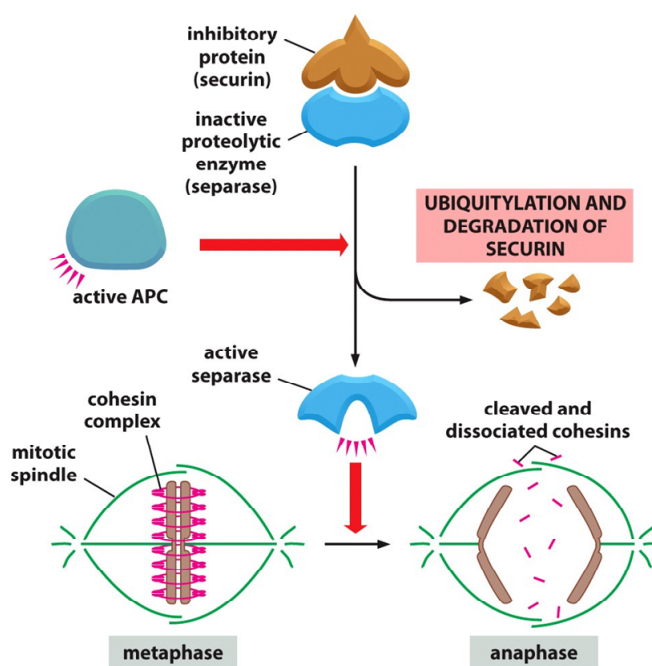
A *metafázis* során a két mikrotubulus köteg egy képzeletbeli, úgynevezett metafázisos síkra rendezi a kromoszómákat. A kromatidokat a kohezin-komplexek tartják össze a metafázis végéig. A *metafázis-anafázis* határon egy szeparáz nevű proteolitikus hatással rendelkező enzim „szétvágja” ezt a kohezin-gyűrűt. 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 konzervált, fajoként különböző hosszúságú (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 proteasóma felismeri, és képes degradálni



5. ábra:
A mikrotubulusok kapcsolódása a kromoszómához (Alberts et al., 2010).

azt. Ez a mechanizmus alkalmas a ciklinek és más egyéb fehérjék specifikus és gyors eltávolítására (Morgan, 2007). Ennek felfedezéséért Avram Hershko két munkatársával 2004-ben kémiai Nobel-díjat kapott.

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 (6. ábra).



6. ábra:
A kohezin-gyűrűk proteolízise (Alberts et al., 2010).

Az *anafázist* két részre oszthatjuk. Az első az *anafázis A*, amely során kinetochor mikrotubulusok rövidülnek depolimerizáció miatt. Ennek 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 *prometáfázis* során MPF foszforilezése által szétesett, most ismét össze tud szerelődni. A sejtmag membránfúzióval épül fel (Alberts et al., 2010).

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).

3.2. A sejtciklus szabályozása

A sejt mérete nemcsak arányos a DNS tartalmával is (Turner et al., 2012). Egy diploid élesztősejt nagyjából kétszer akkora, mint egy haploid, továbbá a sejtmag mérete/citoplazma mérete hányados nagyjából állandó egy sejtciklusra nézve (Neumann & 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).

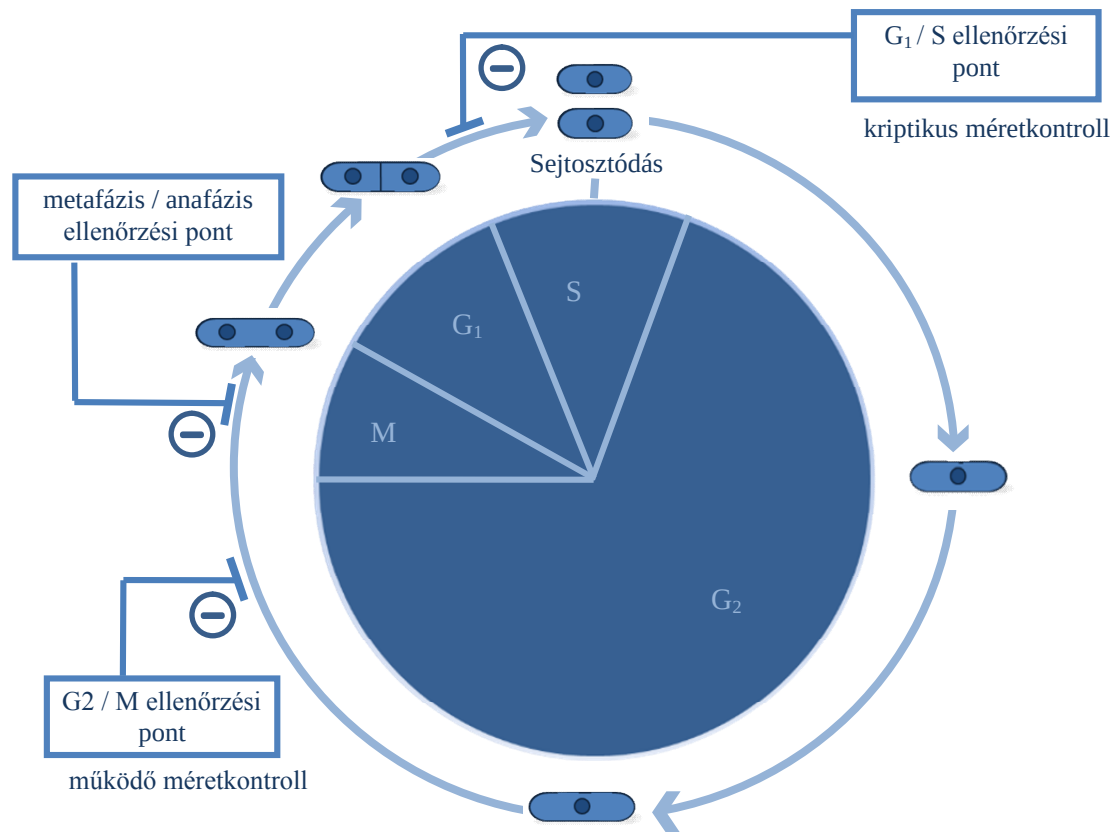
Tehát az egysejtű populációban a fennmaradáshoz elengedhetetlen a sejtek méretének generációkon keresztüli változatlansága, a homeosztázis. Növekvő sejtekben a méret állandóságának biztosítására szükség van a G_1 - és G_2 -fázisokra. A korai embriók esetében ezek a fázisok kimaradnak, éppen a nagy méretük következtében. 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 hosszabb, mint a kromoszómás ciklusé, az azt jelenti, hogy utóbbi gyakrabban fog lejátszódni. Következmény: a sejt genetikailag instabillá válik, ami halálos. 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 összehangoltá válik. De fennállhat a veszély, hogy kisebb lesz, mint a tömegduplázódási idő. Ha ez bekövetkezne 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 kromoszómas ciklus tovább haladjon, míg egy bizonyos méretet el nem ért a sejt (Sveiczner & Rácz-Mónus, 2013).

A sejtciklus szabályozására több elmélet is született. A kutatók növekvő sejteket tanulmányozva megállapították, hogy a sejtciklus eseményei szigorúan egymás után következnek be. Ha egy esemény kimarad, onnantól blokkolódik a folyamat. Nagyon hasonlít a dominók viselkedésére: ha egy eldőlt, vele a többi is el fog. Ezért ezt az elképzelést *dominó modell*nek nevezték el. Később korai embriókat tanulmányozva megállapították, hogy ezekben az élőlényekben nincsenek ellenőrzési mechanizmusok. A sejtciklus folyamatai 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 modell*, amely szerint 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., 2010).

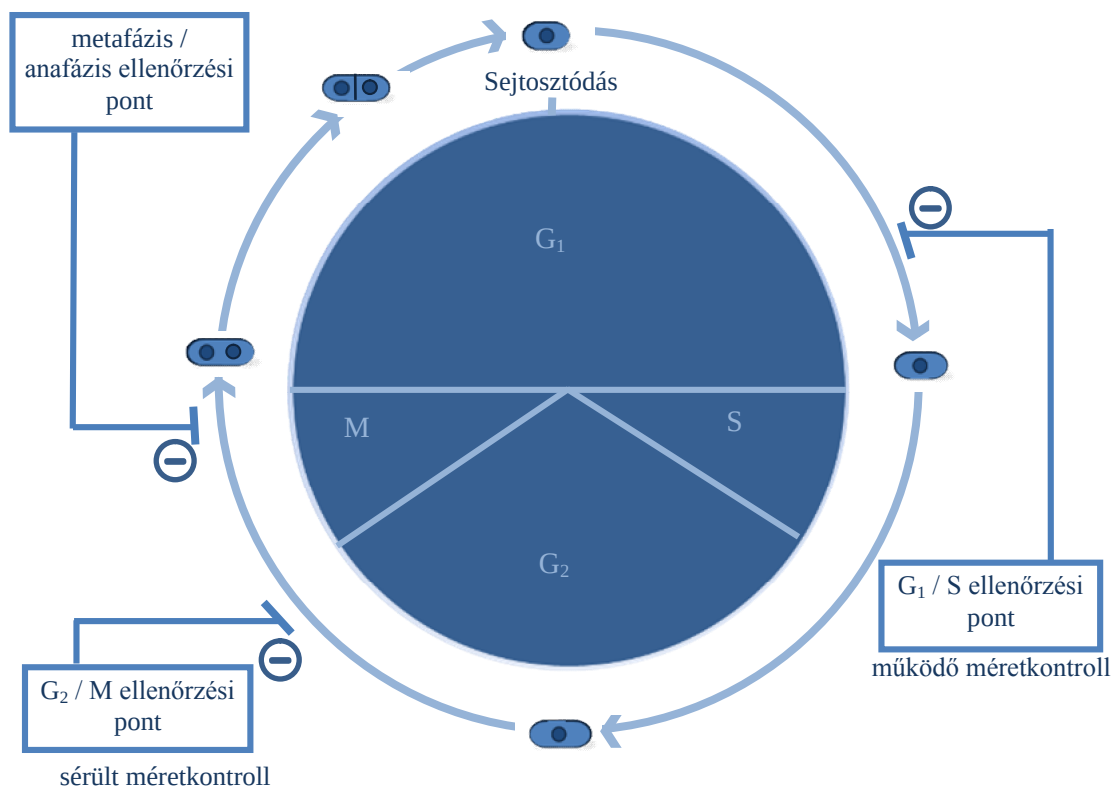
Az eukarióta sejtekben három ellenőrzési pont („checkpoint”) létezik: G_1/S , G_2/M és a mitózisban bekövetkező metafázis/anafázis határán (7. ábra) (Murray, 1994). Az első a G_1/S határán működik, magasabb rendű szervezetekben restrikciós pontnak (Zetterberg et al., 1995) vagy élesztőkben Start pontnak (Forsburg & Nurse, 1991) is hívjuk. Ennél a pontnál ellenőrzi a sejt, hogy megfelelőek-e a környezeti paraméterek, a megfelelő méretet elérte-e, a mitózis szabályosan lejátódott-e, nem sérült-e a DNS. Ha ezeket rendben találja, akkor elkezdheti a DNS szintézisét. 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, a G_1 -fázisban lévő restrikciós pont, amely során a sejtnak az alábbi lehetőségei adódnak: visszatér a sejtciklusba, átmenetileg blokkolódik és ebben a fázisban marad, tehát tartósan elhagyja a sejtciklust (G_0) vagy pedig meiózisba megy át (Alberts et al., 2010). 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).



7. ábra:
A hasadó élesztő vad típusú sejtjére jellemző fázisarányok és ellenőrzési pontok
 (Sveicz & Horváth, 2013).

Az utolsó ellenőrzési mechanizmus a mitózisban hat (Deshaies, 1995). A sejtnek 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 G₁-, és hosszú G₂-fázis jellemzi (7. ábra) (Mitchison, 1989). A G₂/M ellenőrzési ponton csak a méretkontroll az aktív, míg a G₁/S határán kriptikus (rejtett) méretkontroll van. A *wee* mutáns sejteknél fordított a helyzet: a G₁/S határán működő ellenőrzési pont az aktív, míg a G₂/M ellenőrzési ponton ható méretkontroll sérült (8. ábra).

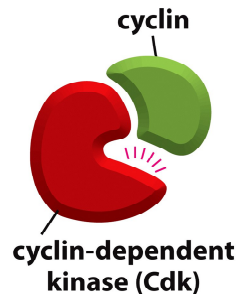


8. ábra:
A *wee1⁻* mutáns sejtre jellemző fázisarányok és ellenőrzési pontok
(Sveiczzer & Horváth, 2013).

3.3. A sejtciklus szabályozás molekuláris mechanizmusa

A sejtciklus eseményeinek precíz szabályozását egy központi kontrollrendszer irányítja, amelynek legfontosabb regulátorai az ún. ciklinfüggő kinázok (10. ábra) (Alberts et al., 2010). Az egyik alegység egy kináz, amit katalitikus alegységnek is hívunk. A kinázok ATP terhére végzik az átalakítást szubsztátjaikon, 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 regulációs, 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., 2010). A kinázok aktivitásához szükséges, de nem elégséges feltétel a ciklinhez való kapcsolódás, ezért ciklinfüggő kinázoknak (cyclin dependent kinase, Cdk) nevezzük (9. ábra). Magasabb rendű szervezetekben többfajta ciklin, míg alacsonyabb rendű szervezetekben kevesebb is elég a szabályozáshoz. A ciklin

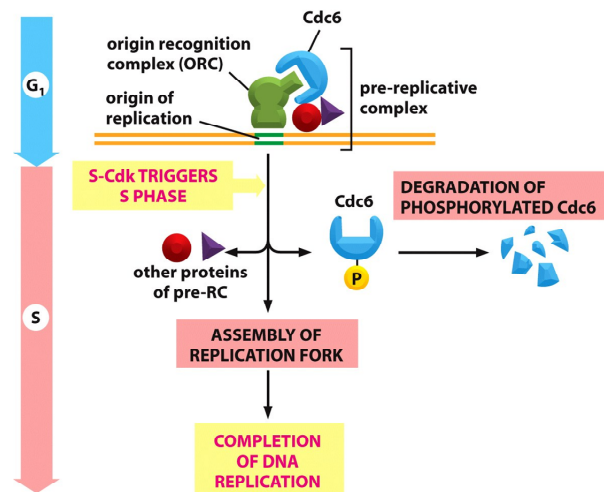
befolyásolja, hogy mi a kináz szubsztrátja, így különböző ciklinekkel elegendő lehet egyes egyszerűbb szervezetekben egy Cdk is a szabályozáshoz. Ez a Cdk1 jelű fehérje az élesztőgombáknál, amit a hasadó élesztőben a *cdc2* gén kódol.



9. ábra:

A központi kontrollrendszer legfontosabb eleme: a ciklinfüggő kináz (Cdk; cyclin dependent kinase) (Alberts et al., 2010).

Magasabb rendű szervezetekben több ilyen Cdk létezik. Az egyik az S-fázist serkentő SPF (ún. S-Cdk). A 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) (10. ábra). A G₁-fázis során termelődik egy fehérje (Cdc6), ami az ORC-hez kapcsolódik (Alberts et al., 2010). 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 SPF 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) kellenek. Replikáció csak akkor indulhat el, ha a Cdc6 képződött és le is bomlott. Az SPF a G₂-fázis során megtartja aktivitását, így lehetetlenné teszi a prereplikációs komplex újbóli létrejöttét, azaz gátolja az ún. rereplikációt, azaz egy abnormálisan ismételt replikációt.

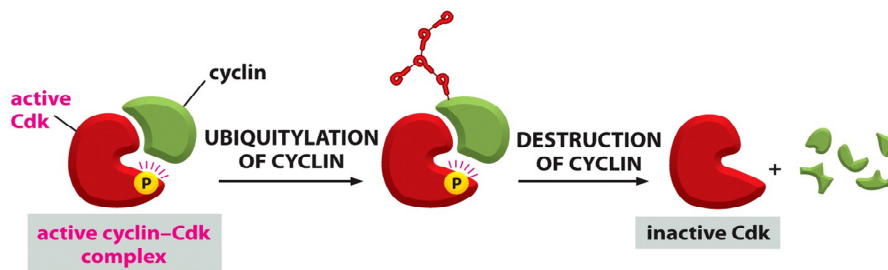


10. ábra:
A replikáció és a rereplikációs gátlás mechanizmusa
(Alberts et al., 2010).

Másik ilyen Cdk molekula az MPF (ún. M-Cdk), ami a mitózist serkenti. Alacsonyabb rendű szervezetekben a két komplex kináz alegységei azonosak, és a ciklinek változtatásával érhetik el az S-, illetve az M- fázist a sejtek (Alberts et al., 2010).

Korai embrionális sejteknél, elsőként az afrikai karmosbékában (*Xenopus laevis*) figyeltek meg egy érdekes jelenséget: ezekből a sejtekből kivont citoplazma beindítja az éretlen oocitákban az érést. Az oocita egy éretlen diploid sejt, amely a petesejt G₂/MI fázishatáron való blokkolódásakor keletkezik. A kutatók azt tapasztalták, hogy ha mitózisos sejtéből kivont citoplazmát injektáltak egy éretlen oocitába, akkor bekövetkezett az érés. Ellenben, ha interfázisos sejtéből 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., 2010). 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 tehát mind a mitózis, mind a meiózis iniciálására alkalmas.

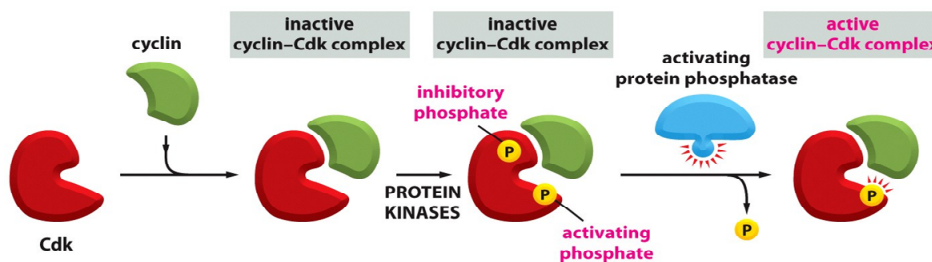
Az interfázis végén az MPF aktivitásának a mitózis kezdete előtt hirtelen kell megnőnie, és a végén hirtelen kell lecsökkennie, hogy tovább léphessen a sejt a ciklusának következő szakaszára. A mitózis fázisainak részletezésekor már említettem, hogy APC molekula ubikvitinezéses jelöléssel a B-típusú ciklineket megjelöli, amelyek így lebomlanak. A folyamat szinte pillanatszerű, az MPF gyorsan inaktiválódik (11. ábra).



11. ábra:
B-típusú ciklinek ubiquitinnel megjelölt degradációja
(Alberts et al., 2010).

Az MPF aktivitásának hirtelen való megnövekedéséről még nem esett szó. A folyamat szabályozása több lépésben történik. A G_1 -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.

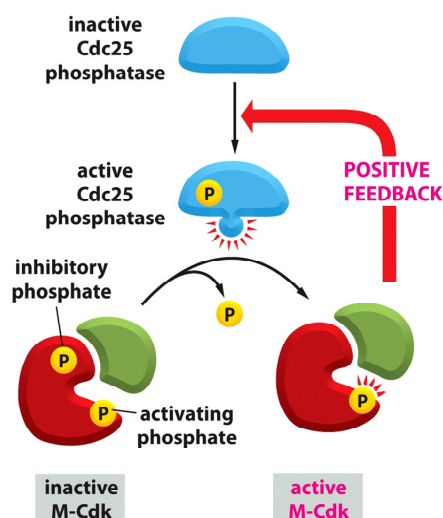
Ez az inhibitor azonban csak a G_1 -fázisban fejt ki a hatását. Az S- és G_2 -fázisban szükség van egy másik fehérje gátló hatására. Két kináz egy-egy foszforilációt hajt végre a Cdk1-en. Az egyik aktiváló foszforiláció a Thr-161 aminosavon (CAK kináz), míg a másik egy inaktíváló foszforiláció a Tyr-15 aminosavon (Wee1). A kétszeresen foszforilált forma inaktív lesz (12. ábra), amelyet az MPF interfázisos ún. preMPF formájának hívunk.



12. ábra:
A kinázok foszforilációs módosításai a Cdk1-en
(Alberts et al., 2010).

A preMPF MPF-fé való átalakulásában több fehérje vesz részt. Az egyik fontos protein a hasadó élesztőben a *wee1* gén terméke (kisebb aktivitású háttérkópiája a *mik1*), amely a Tyr-15 foszforilációját katalizálja. Ez egy erős inaktíváló foszforiláció (12. ábra). A gátló foszfátcsoporthoz egy másik enzim, a *cdc25* gén által kódolt foszfatáz távolítja el (13.

ábra). Utóbbi fehérjének is ismert egy kisebb aktivitású háttérkópiája, a *pyp3* gén terméke. A Cdc25 foszfatáznak 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., 2010). Megjegyezném, hogy az MPF inaktív formájának aktivitása sem teljesen 0.



13. ábra:
Az aktív MPF kialakulása
(Alberts et al., 2010).

3.4. A méretkontroll és az azt meghatározó tényezők

1977-ben Fantes megfigyelte, hogy negatív korreláció van a sejt mérete és a ciklusidő között (Fantes, 1977). Ez azt jelenti, hogy kisebb születéskori méretű hasadó élesztő sejtek esetén hosszabb ideig tart a sejtciklus, mint nagyobb sejteknél. Ez a negatív korreláció a „méretkontroll”. A méretkontroll tehát a sejtciklusban ható ellenőrzési folyamat, amelynek köszönhetően a sejtek mérete generációról generációra illetve a populációban körülbelül állandó marad.

Nemcsak a ciklinfüggő kinázoknak van befolyásolása a sejtek ciklusának szabályozására. Kedvezőbb körülmények között nagyobb sejtek fognak születni, míg rosszabb feltételek mellett kisebb sejtek (Fantes, 1977). Ha az exponenciális fázisban lévő sejteket jobb körülmények közé helyezjük (shift-up), azt tapasztaljuk, hogy az áttöltés után egy darabig még a megszokott életciklusuk „ütemére táncolnak”, majd egy idő után nem

történik osztódás a tenyészetben. Később, amikor eléri a méretkontroll által megszabott új méretet, újra elkezdenek osztódni. Előbbi kísérleteknél a tápközegekben jobban hasznosítható szén- vagy nitrogénforrásokkal biztosítják a kedvezőbb feltételeket. A folyamat magyarázata a következő: azok a sejtek, melyek az ellenőrzési pontjukat elhagyták az előző tápközegekben, azok tudnak szaporodni, a többi sejt egy ideig nem. Az új tápközegekben már más kritériumoknak kell megfelelniük. Ha ezek után a régi tápközegekbe 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 szintje lecsökken.

Az M-, G₁- és S-fázisok hosszát nem befolyásolja a sejt mérete (timer) a hasadó élesztőben. A folyamatok végbemeneteléhez konkrét időtartam szükséges (timer). 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 & 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).

3.5. A sejtciklus mutánsok

A sejtciklus precíz végbemeneteléhez számos fehérjére van szüksége a sejtnek, melyek a *cdc* (cell division cycle = sejtciklus) 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 szerkezete változik. Az *S. pombe cdc^{ts}* mutánsai általában 25°C-on osztódnak, de 35°C-on már nem (Nurse et al., 1976).

A sejtciklus mutánsok közül nagyon gyakran a *wee* mutáns sejttel 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).

3.6. 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 szinkrontenyészet. Szinkrontenyészetben 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.

Szinkrontenyészeteket alapvetően kétféle 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. centrifugálós elutriáció (Creanor & 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 G₁-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.

3.7. A hasadó élesztő sejtciklusát működtető molekuláris hálózat

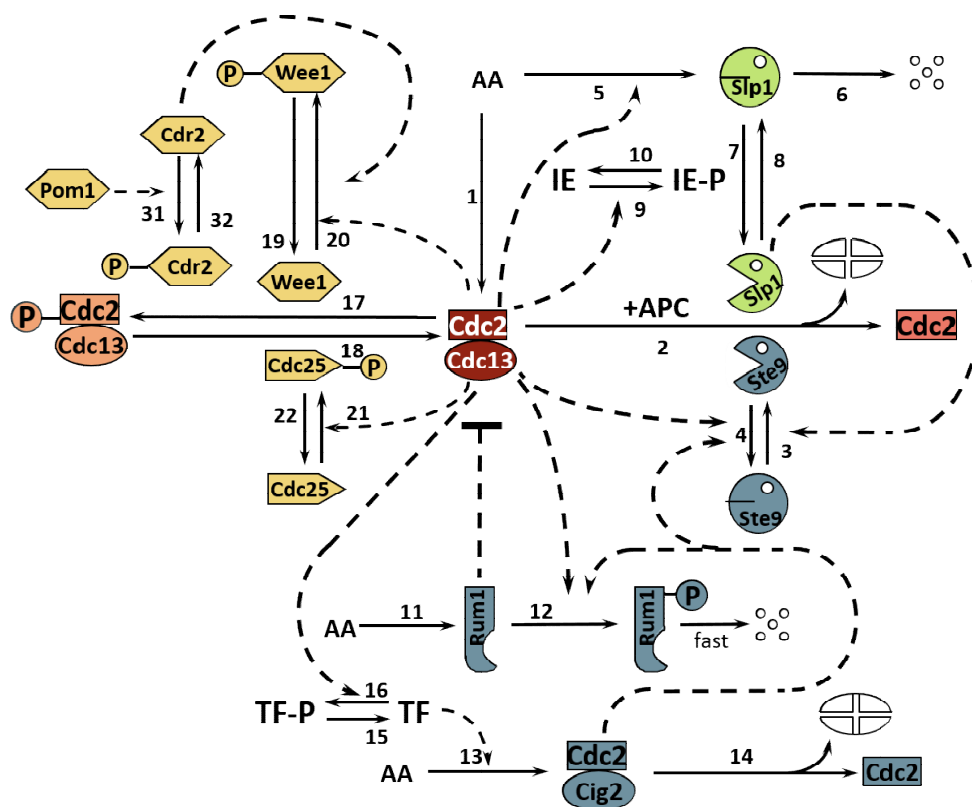
A dolgozatomban már említettem, hogy milyen fázisarányok jellemzik a vad típusú és *wee1⁻* mutáns sejteket. A vad típusú sejtnél rövid a G_1 -fázisa, míg a *wee1⁻* mutánsnak hosszú, a ciklusa 50%-át adja ki. A sejtciklus működését egy molekuláris hálózat biztosítja. A molekuláris hálózatot összefoglaló (14. ábra) kép segítségével egyszerűen áttekinthetjük annak működését. Vegyük sorra az egyes fehérjék funkcióit!

A G_1/S átmenetben fontos szerepet játszó fehérjéket kék (nyomtatásban inkább sörétszürke) színnel jelöltem a 14. ábrán. A G_1 -fázisban fontos szerepe van a Rum1 sztöchiometrikus inhibitornak, egy transzkripciósfaktornak (TF), a starter kináznak (SK, az ábrán Cdc2/Cig2), illetve az APC Ste9 fehérje alegységének is. A Ste9 a G_1 -fázisban gátolja az MPF működését egy bizonyos MPF aktivitási szintig. Az M-fázis végén az Slp1-et közvetve, a G_1 -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 időkéstetést eredményez a negatív visszacsatolásban.

Másik fontos fehérje a Rum1, ami a Cdc13/Cdc2 dimerhez kapcsolódva inhibitorként viselkedik. Azonban a G_1 -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 „transzkripciósfaktor”, és ahogy a 14. 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 inaktiválja őket. Úgyis mondhatjuk, hogy az MPF „barátja” a starter kináz a G_1 -fázisban.

A G_2 -fázisban más fehérjék mutatnak molekuláris kölcsönhatást a sejtciklus középpontjában lévő MPF-fel. A fő szerep a Cdc25 és Wee1 enzimeké, amelyeknek funkcióját a 2.3. fejezetben részleteztem. Az MPF aktív formáját sötétpirossal, inaktív vagy alacsony aktivitással rendelkező formáit narancssárgával illetve világosabb pirossal ábrázoltam. Az MPF aktivitásának csökkentéséért az Slp1 fehérje felel (zöld szín). Ez a fehérje az APC egységhez kapcsolódva az M-fázis végén foszforilezéssel degradációra jelöli ki az MPF egyik alegységét, a Cdc13 ciklint, így a sejtet a G_1 -fázisba juttatja. Ez a fehérje még a kohezin komplex lebomlásáért és a Ste9 fehérje aktiválásért is felelős.

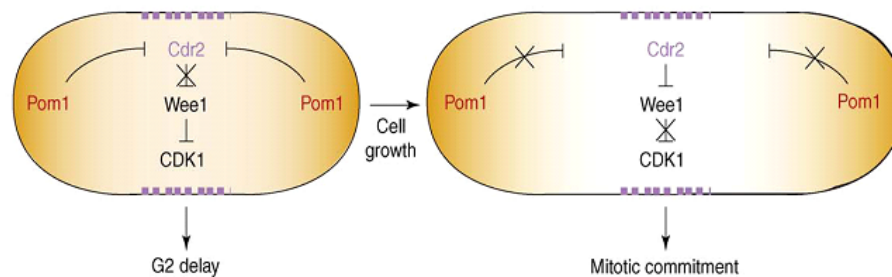


14. ábra:

A hasadó élesztő molekuláris hálózat működésének sematikus ábrázolása.

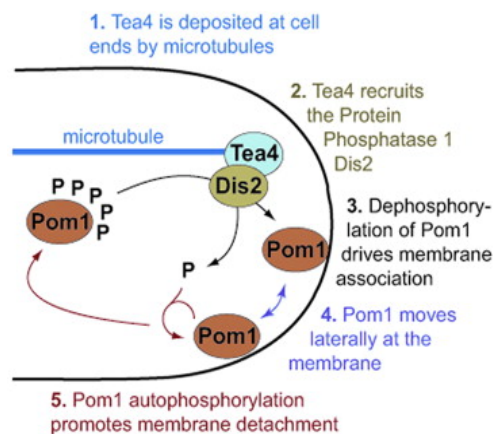
A fenti (14. ábra) azonban egy egyszerűsített séma. A G₂/M átmenetet (sárga színnel jelölt fehérjék játszanak szerepet) kissé ki kell egészítenünk. A Wee1 kináz egy nagy aktivitású molekula, ami megoszlik a citoplazma és sejtmag között és más fehérjék által is szabályozva van. A folyamat legfontosabb fehérjéi a Pom1 és a Nif1, amelyek 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 & Martin, 2009). A két fehérje aktivitása a sejtmag belseje felé haladva csökken.

A Wee1 fehérjét közvetve szabályozzák a fent említett enzimek (15. ábra). Közvetlen hatásukat a Cdr2 kinázra fejtik ki. Amíg a sejt kis mérettel rendelkezik, addig a Pom1 kináz foszforilezéssel gátolja a Cdr2 fehérje működését. Utóbbi enzim feladata a Wee1 inaktiválása ugyanezzel a mechanizmussal. Ha a sejt mérete megnő, akkor a Pom1 aktivitása lecsökken, a Cdr2 kináz módosítani tudja a Wee1 fehérjét és a sejt az M-fázisba léphet (Berthelot-Grosjean & Martin, 2009).



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

A folyamatnak számos más szereplői 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 (16. 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 autofoszforylációra 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 autofoszforyláció miatti sok foszfátcsoport és a plazma membrán foszfátcsoportjai között taszító kölcsönhatás lép fel, melynek eredményeként gyengülni fog a fehérje membránnal való kölcsönhatása.

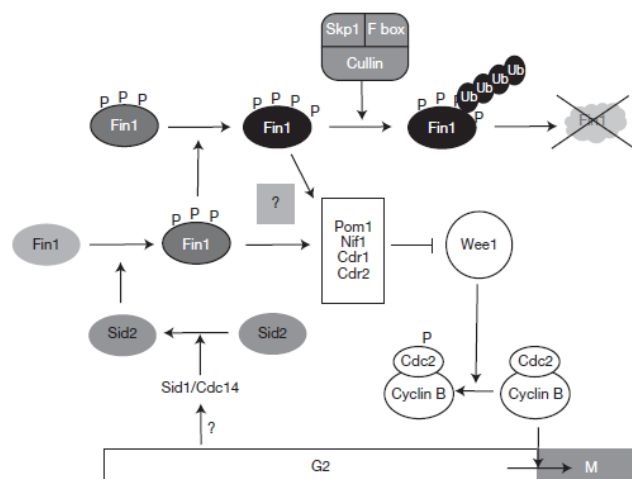


16. ábra:
A Pom1, Tea4 és Dis2 fehérjék általi szabályzásának mechanizmusa (Hachet et al., 2011).

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 a 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 G_2 -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 (17. ábra). Az így kapott formája katalizálja a saját lebomlását is, eredményeként a Fin1 aktivitása a G_2 -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).

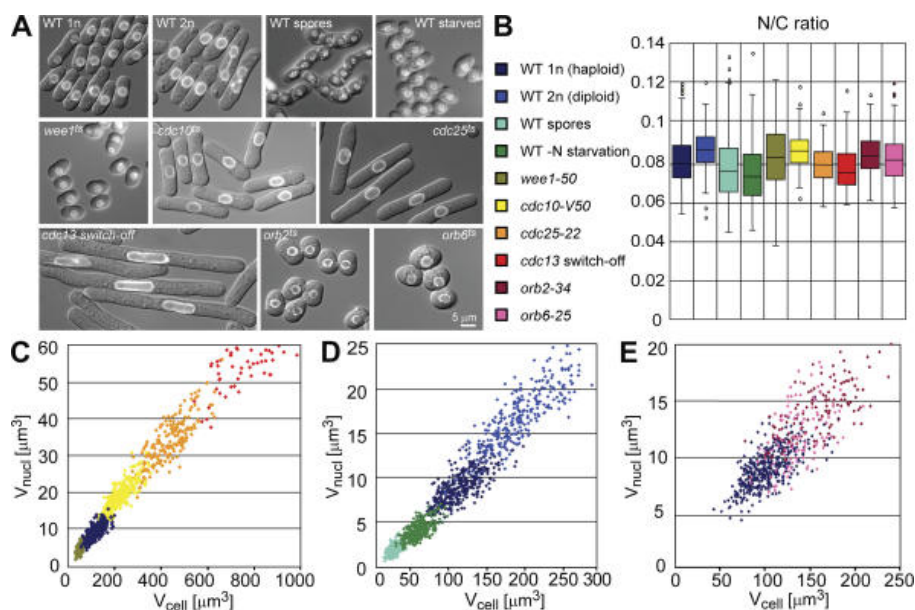


17. ábra:
A Sid2 és Fin1 kinázok működésének sémája (Grallert et al., 2012).

3.8. 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 egyenes arányosság tapasztalható (18. ábra). A vizsgálatot sokfajta sejttel végezték, többek között:

vad típusú hasadó élesztő haploid és G₂-fázisban blokkolt diploid formájával, továbbá *wee1*⁻ és *cdc25* mutáns tenyészetekkel is.

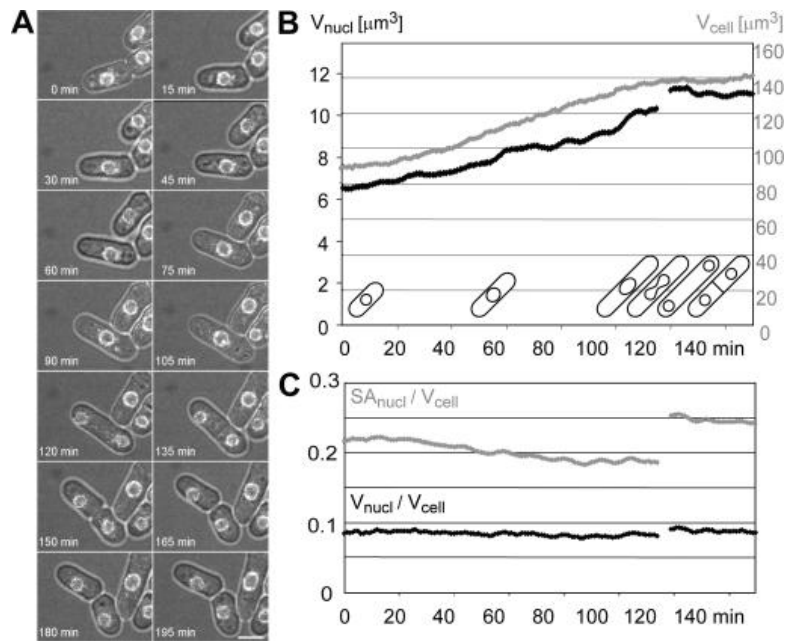


18. ábra:

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

Ha a sejtmag mérete arányos a sejtével, akkor a ciklusban bekövetkező növekedés miatt a sejtmag térfogata is változni fog. Ezt is bizonyították kísérletesen (Neumann & Nurse, 2007). A ciklus során azonos időközönként mikroszkóp segítségével felvételt készítettek a sejt növekedéséről (19. ábra). Meghatározták a sejt és a sejtmag térfogatát, valamint értékük hányadosát. Arányuk 0,08 körüli értéket vesz fel a sejtciklus alatt.

Az utóbbi eredmények alapján felmerül a kérdés: hogyan képes szabályozni a sejt saját, valamint nukleuszának méretét? Részleges választ egy 2010-ben publikált cikk segítségével adhatunk (Cohen-Fix, 2010), amelyben a szerző az összefüggést citoplazmás faktorok importin- α fehérjén keresztüli nukleáris transzportjában látja.



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

3.9. 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 differenciálegyenleteket, 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 következményeként 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 & 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 & Nurse, 2007) a kutatók más irányban kezdtek vizsgálódni. 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 & Martin, 2009). Az első ilyen modell, amelyben felhasználták a 2009-ben publikált cikk kísérletes eredményeit, Németh Márton 2012-ben elkészített szakdolgozatában olvasható.

Biológiai kísérletek szerint a sejt méretét két módon szabályozza: a fehérjeszintézis sebességével és a Pom1 fehérje térbeli gradiensével (Yan et al., 2013), ami a Wee1 mitotikus inhibitor fehérjét szabályozza. Ez a 2013-ban megjelent Yan és munkatársai által megírt publikáció kutatócsoportunk alapmodellét (Novak et al., 2001) vette kiindulásnak.

4. Célkitűzések

A TDK dolgozatom egyik célja volt, hogy az előzőleg elkészített matematikai modellt tovább pontosítsam. Az előzőleg elkészített modellnél (Lovász, 2012) csak közvetve építette be a kutatócsoportunk a Pom1 fehérje térbeli gradiensének hatását, nevezetesen a Wee1 fehérjére. Ez jó kezdeti megoldásnak bizonyult, azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy a fehérjehálózat további két tagjának integrálásával közvetlenül is beépítjük a Pom1 fehérje hatását. Ez a hatás a sejt hosszirányában bekövetkező koncentráció gradienséből adódik. Így a modellben a Pom1 fehérjére feltételeztük a méretfüggést és Cdr2 fehérjére Goldbeter-Koshland egyenletet, amelyben a Pom1 Cdr2 fehérjére gyakorolt negatív hatását is figyelembe vettük. Tehát, ahogy hosszirányban nő a sejt mérete, annál kisebb lesz a Pom1 fehérje gátló hatása a Cdr2 fehérjére nézve. A Cdr2 fehérje így gátló hatást gyakorol a Wee1 fehérjére. A dolgozatomban a vad típusú sejtnél a hasadó élesztő *cdc2-33* törzset fogom érteni, mivel permisszív hőmérsékleten alig tér el a viselkedésük egymástól, ugyanakkor indukciós szinkrontenyészet készíthető ezzel a törzsszel. A *wee1⁻* mutáns sejtként pedig *cdc2-33 wee1⁻* mutánst fogom nevezni.

A modell pontosságát méretkontroll ábrázolásokkal célozom ellenőrizni. Ez azt jelenti, hogy a szimulált sejtek születéskori méretének függvényében ábrázolom a fázisok illetve az egész ciklus hosszát. A kapott függvények meredekségét a kísérletes eredmények megfelelő adataival fogom összehasonlítani (Sveiczner et al., 1996). A méretkontroll ábrázolásokkal az egyes fenotípusok esetében a méretkontroll szempontjából fontos ellenőrzési pontokat határozom meg.

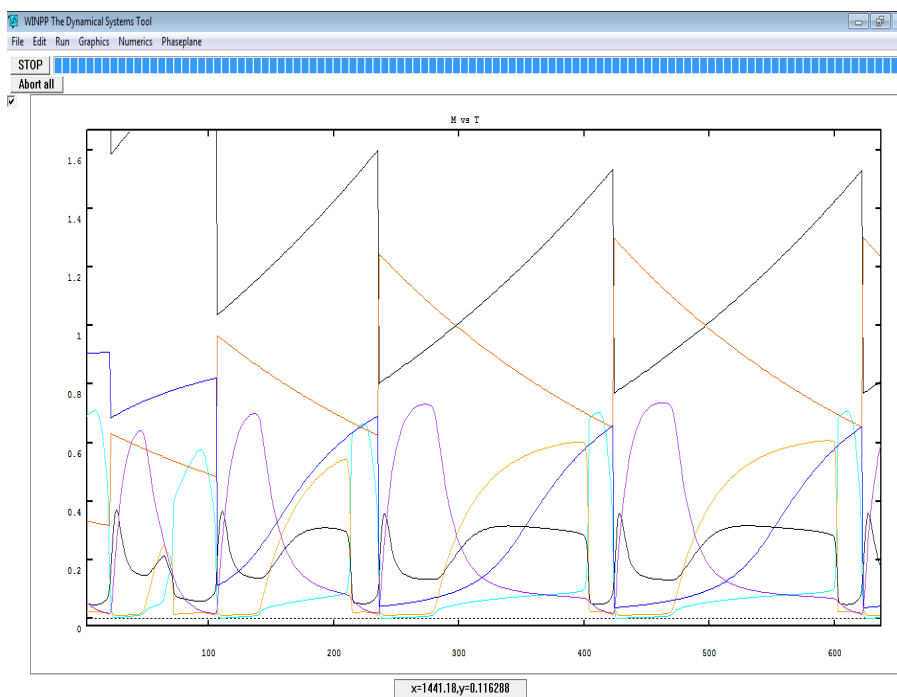
A méretkontroll mechanizmusát bifurkációs diagramok elkészítésével és elemzésével is fogom vizsgálni, mind vad típusú, mind *wee1⁻* mutáns sejtre nézve. A módszer segítségével megerősíthető, hogy az egyes fenotípusokban melyik fázis a fontos méretkontroll szempontjából. Továbbá egy „stabilitási ujjlenyomatot” is kapunk a rendszerről.

5. Vizsgálati módszerek

5.1. Felhasznált szoftverek

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

Munkámat .ode fájlok segítségével végeztem, amely közönséges differenciálegyenleteket tartalmaz. A paraméterek és a változók kezdeti értékeit pedig a program megnyitása után egy .set fájlból lehet betölteni és változtatni. A program segítségével grafikusán tudjuk ábrázolni a ciklus fontos változóinak (sejttömeg, egyes fehérjék koncentrációja) különböző időben felvett értékeit. Ha lefuttatjuk a programot, a differenciálegyenletek megoldásait az időben ábrázolhatjuk (20. ábra), illetve a pontos értékek a „Browser” ablakból kiolvashatóak.



20. ábra:
A WinPP[®] szoftverrel lefuttatott szimuláció.

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

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[®] és SigmaPlot[®] 11.0 szoftverek segítségével végeztem. Az eredmények ábrázolásához Microsoft Office Power Point 2007[®] szoftvert is felhasználtam.

5.2. 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 pillanatbeli állapotát.

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

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

5.3. Egyszerűsítések a modellben

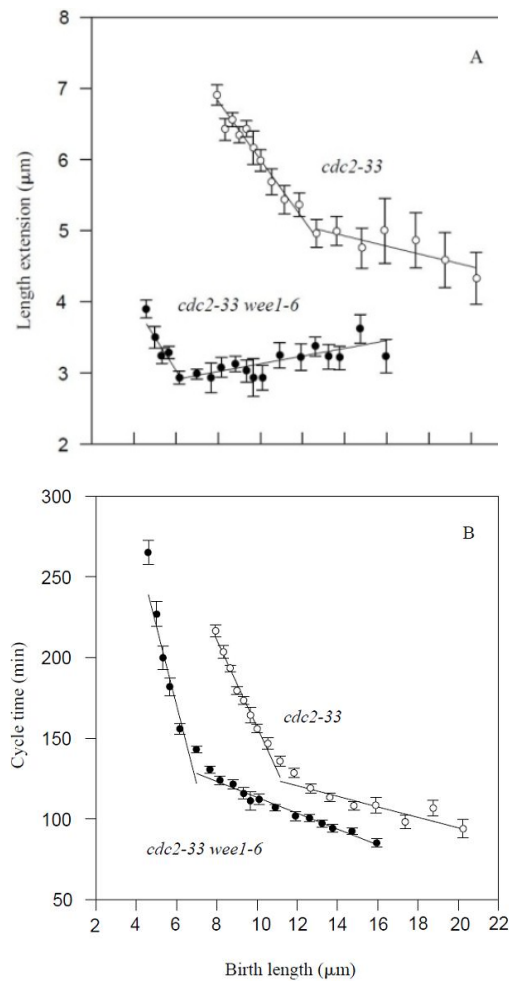
A kísérleti és a számításokból kapott eredmények sohasem fedik egymást tökéletesen a folyamat bonyolultsága miatt alkalmazott egyszerűsítések miatt. A modellben az S-, és a G₂-fázist közösen tárgyaltam (S+G₂), mert nincs a két fázis között nincs jól definiált, éles határvonal (Lygeros et al., 2008). Nincs olyan fehérje, aminek bizonyos aktivitásértékét az S-fázis végéhez tudnánk tenni. Másik egyszerűsítés, hogy a sejtosztódáshoz szükséges szeptum-képzéssel nem foglalkozunk, hiszen az a méretkontroll szempontjából nem jelentős.

5.4. A sejtciklus vizsgálatának módszerei

5.4.1. A méretkontroll vizsgálata

A méretkontroll vizsgálata során legelső lépésként állandósult állapotbeli sejtciklust, majd indukciós szinkrontenyészettel (20. Ábra) a vad típusú sejt állandósult állapotára jellemző születéskori méretnél nagyobb mérettel rendelkező sejtek egymás utáni ciklusait vizsgáltam. Ehhez több adatra van szükségünk: a születéskori (BL, **B**irth **L**ength), az osztódáskori (DL, **D**ivision **L**ength) méret, a hossznövekedés (Ext, **E**xtension), a ciklusidő (CT, **C**ycle **T**ime) értékei nagyon fontosak. A ciklusidőt, és a hossznövekedést közvetve határoztam meg, míg a többi adatot leolvasással a WinPP® szoftver segítségével megadott szimulációs eredményekből. 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 G_1 -fázis végét a Ste9 protein aktivitásának 0,1 alá való eséséhez, az $S+G_2$ -fázis végét az MPF 0,5 nagyságú aktivitás eléréséhez, az M-fázis végét az osztódáshoz kötjük, ahol az MPF aktivitása 0,1 alá esik. A modell megfelelősége a teljes sejtciklus illetve az egyes fázisok időtartama alatti növekedés születéskori méret függvényében való ábrázolásával is vizsgálható. Úgy döntöttünk, hogy a szimulált sejtek születéskori méretének függvényében a fázisok illetve az egész ciklus hosszát fogom ábrázolni. Szimulációs eredményeink azonban a növekedésre is vannak, amelyek a Függelék fejezet F9. és F10. táblázatokban olvashatóak.

A méretkontroll vizsgálatok során az adatokat régebben publikált kísérletes eredményekkel vettem össze, amelyben *cdc2-33* és *cdc2-33 wee1-6* indukciós szinkrontenyészetekkel vizsgálták a fontos paramétereket (Sveicz et al., 1996). Ábrázolták a mért eredményeket (21. ábra), és azt tapasztalták, hogy egy bizonyos méret (töréspont) előtti tartományban erős negatív korreláció, míg utána nagyon gyenge negatív, esetleg gyenge pozitív korreláció tapasztalható (hasonlóan a 2.4. fejezetben említett Fantès által mért kísérletes eredményekhez (Fantès, 1977)). A töréspont azonban nem egyezik meg tökéletesen a két diagramon se a vad típusú, 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. Szimulált eredményeimre illesztett egyenesek egyenleteinek megoldásával kaptam meg a töréspontot külön-külön a vad típusú és a *wee1⁻* mutáns sejtre nézve.



21. ábra:
Indukciós szinkron tenyészetek vizsgálatának eredményei (Sveiczet et al., 1996).

5.4.2. 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 komponenset, 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. Az általam vizsgált rendszer esetén bifurkációs diagramokon, a rendszer állapotát vagy egy stabil fókuszpont, vagy pedig határciklusos oszcilláció jellemzi. 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 pedig 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.

6. Eredmények

6.1. Modell-A, a kiindulási modell

Munkám során 2001-ben kifejlesztett matematikai modellre (Novak et al., 2001, Sveiczter et al., 2001) épülő, BSc szakdolgozatomban taglalt verziót vizsgáltam és alakítottam tovább.

A Modell-A differenciálegyenletei, kinetikai egyenletei, konstansai illetve a vele készült szimulációs eredmények a Függelék F1., F2., F5., F6., F7., F8. táblázataiban találhatóak meg.

Röviden összefoglalnám, mik is voltak ezek az újítások:
exponenciális növekedés feltételezése helyett a logisztikus függvény alkalmaztuk (1):

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

A logisztikus függvényre jellemző maximált érték az M_{star} . A BSc szakdolgozatomban közölt modellben M_{star} értéke más volt vad típus és *wee1⁻* mutáns sejtnél. A vad típusú sejtre jellemző maximális növekedés méretét kísérletes eredményből vettük (Mitchison & Nurse, 1985), és ebből határoztuk meg *wee1⁻* mutáns sejtre jellemző maximális méretet. Ez a változtatás kiküszöbölte a vad típusú és *wee1⁻* mutáns sejt ciklusidejének egyenlőtlenségét.

A másik lényeges változtatás kísérletes eredményekre épült (Berthelot-Grosjean & Martin, 2009). A modellbe a Pom1 kináz sejten belüli eloszlásának hatását közvetve építettük be: a Wee1 fehérje aktivitására feltételeztünk méretfüggést. A Pom1 fehérje aktivitása fordítottan arányos a mérettel, ezért inhibitor híguláson alapuló modellnek nevezték el az így kapott modellt. 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 (2) kell módosítani egy B/M szorzóval, ahol B egy paraméter, M a tömeg, továbbá k_{wee} értékét megváltoztatva az egyenlet egyszerűsíthető (3), ahol G a Goldbeter-Koshland függvényére utal.

$$k_{wee} = k'_{wee} + (k''_{wee} - k'_{wee}) \cdot G(V_{awe}, V_{iwee}[MPF], J_{awe}, J_{iwee}) \quad (2)$$

$$k_{wee} = k'_{wee} + k''_{wee} \cdot \frac{B}{M} \cdot G(V_{awee}, V_{iwee}[MPF], J_{awee}, J_{iwee}) \quad (3)$$

Harmadik lényeges változtatás a G_1 -fázisban fontos Rum1 sztöchiometriai inhibitorra való méretfüggés felírása volt. Ez azért volt jó, mert kísérletes adatot még nem publikáltak a Rum1 fehérje aktivitásának mennyiségéről a sejt növekedése során. A modellezés egyik előnye, hogy hipotézist tudunk feltenni. Megvizsgálhatunk olyan eseteket is, amelyekhez nincsen még kísérletes eredmény. A BSc szakdolgozatomban (Lovasz, 2012) alátámasztottam, hogy ez a feltételezés lehetséges a modellünk szerint.

BSc szakdolgozatomban és ebben a TDK dolgozatomban régi kísérletes eredményekből vettem a fontos adatokat (Sveicz et al., 1996).

6.2. Modell-B

A munkám során determinisztikus modellt használtam, melynek köszönhetően bizonyos fehérjék aktív és inaktív formáinak relatív mennyiségét tudjuk meghatározni a sejtciklus során. Azt is írtam, hogy feladatom a G_2 -fázisú méretkontroll vizsgálata volt a hasadó élesztő vad típusú és *wee1⁻* mutáns sejtek esetén. A Modell-B-ben a G_1 - és G_2 -fázis méretkontrollra vonatkozó differenciál-egyenleteket módosítottam.

Egyes új matematikai modellekben (Vilela et al., 2010, Yan et al., 2013) a Pom1 fehérje térbeli gradiensének szerepét építették be, illetve a sejtciklus szabályozást nukleotidszintézishez és molekuláris hálózathoz kapcsolták (Yan et al., 2013). Utóbbi modellhez a kutatócsoportunk által közölt régebbi modellt vették alapul (Novak et al., 2001).

Újításunk a Pom1 fehérjére felírt méretkontroll és a Cdr2 fehérje aktivitásának Goldbeter-Koshland kinetikával való leírása volt.

A Modell-B vad típusú és *wee1⁻* mutánsú élesztő sejtre vonatkozó szimuláció eredmények a Függelék fejezet F9., F10., F11. illetve F12. táblázataiban olvasható. A Modell-B differenciálegyenletei, algebrai egyenletei illetve paraméterei a Függelék fejezet F3., F4. táblázataiban találhatóak meg.

6.2.1. Paraméter optimalizálás

A paraméter optimalizálás célja a modellbe integrált egyenletekben szereplő paramétereket olyan értékre hozni, hogy a kísérletes eredményekre (Sveicz et al., 1996) illesztett egyenesek meredekségei közel megegyező értékeket adjanak az új modell állandósult állapotbeli szimulációs eredményeire illesztett egyenesek meredekségeivel.

A Pom1 fehérjére a mérethatást, illetve a Cdr2 fehérjére a Goldbeter-Koshland kinetikát feltételezve az alábbi egyenletekhez jutunk (4, 5, 6):

$$\text{Pom1} = \frac{TT}{M} \quad (4)$$

$$\text{Cdr2} = G(k_{31}, k'_{32} + k_{32} \cdot \text{Pom1}, J_{31}, J_{32}) \quad (5)$$

$$k_{wee} = k'_{wee} + k''_{wee} \cdot G(V_{awe}, V'_{iwee} \cdot \text{Cdr2} + V''_{iwee} \cdot \text{MPF}, J_{awe}, J_{iwee}) \quad (6)$$

A modellbe így hat új paraméter került be: TT, k_{31} , k_{32} , k'_{32} , J_{31} , J_{32} . A TT a Pom1 sejten belüli összes mennyiségét jelenti. Ha az M (tömeg) nő, akkor ez a TT mennyiség oszlik meg a sejten belül, azaz a Pom1 aktivitása csökkenni fog a sejt közepén, a sejtmag környezetében.

A Goldbeter-Koshland kinetikát akkor alkalmazhatjuk, ha a fehérjének létezik egy foszforilált és egy foszforilátlatlan formája, ami a Cdr2 fehérjénél teljesül. A k_{31} , k_{32} , k'_{32} sebességi együtthatók a Goldbeter-Koshland kinetika leírásához szükségesek. Meghatározzák a Cdr2 fehérje aktív és inaktív formáinak egymásba alakulását. A J_{31} , J_{32} együtthatók a megfelelő Michaelis-Menten állandók. A V'_{iwee} sebességi együttható a Cdr2 gátló aktivitására jellemző. Ez a sebességi együttható már szerepelt a modellben. A hét paraméter egymáshoz való optimalizálása rendkívül munkaigényes.

Az optimalizálással kapott tényezők értékei (1. táblázat):

1. táblázat: Az optimalizálással kapott paraméter értékek.

TT (-)	k_{31} (min ⁻¹)	k_{32} (min ⁻¹)	k'_{32} (min ⁻¹)	J_{31} (-)	J_{32} (-)	V'_{iwee} (min ⁻¹)
1	1	1	0	0,2	0,02	0,25

6.2.2. A vad típusú sejt méretkontroll ábra elemzése

Legelőször megvizsgáltam a vad típusú hasadó élesztő sejtciklusát állandósult állapotbeli körülmények között a beállított paraméter értékekkel. A ciklusidő 198 perc lett. Az állandósult állapotbeli jellemzők vad típusú hasadó élesztőre nézve az állabiak lettek az új modell esetén (2. táblázat):

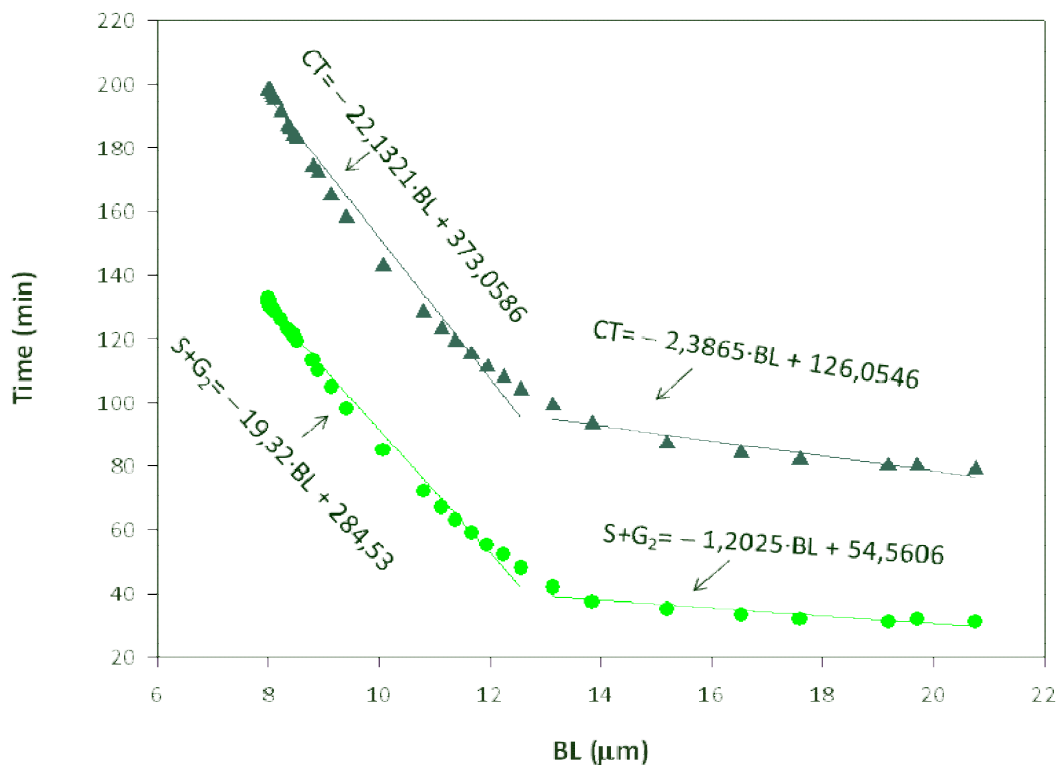
2. táblázat: A vad típusú sejt állandósult állapotbeli körülmények között kapott szimulációs értékei.

	Születéskori méret (μm)	Osztódáskori méret (μm)	Ciklusidő (min)	G_1 (min)	$S+G_2$ (min)	M (min)
Szimulációs eredmények	8	15,9	198	48	131	19
Kísérleti eredmények*	8,5	15,2	197	-	-	-

* (Sveicz et al., 1996)

Az indukciós szinkronizációs sejtjeivel végzett szimulációs eredmények a Függelék fejezet F9. táblázatában találhatóak meg.

Ha megvizsgáljuk a 22. ábrát, elsőre rögtön azt mondanánk, hogy az adathalmazra egy folytonos függvény illeszthető, és a két egyenes ráillesztése nem helyénvaló. Azonban ez fiziológiailag helytelen megoldás lenne. Ugyanis a fiziológiai magyarázat az, hogy bizonyos sejtméretet meghaladó élesztők esetén a ciklusidő illetve a fázisok hossza nem fog gyakorlatilag változni. Viszont azon élesztők esetén, akik nem rendelkeznek ekkora sejtmérettel, a születéskori méretüktől függően kisebb (nagyobb születéskori méret), illetve nagyobb (kisebb születéskori méret) ciklusidővel rendelkeznek. Ezt a bizonyos méretet töréspontnak is hívhatjuk. Munkám során a töréspontot az adathalmazra illesztett két egyenes metszéspontjának meghatározásával határoztam meg. A vad típusú hasadó élesztő esetén ennek értéke: 12,8 μm .



22. ábra:
A vad típusú hasadó élesztő méretkontroll ábrája.

3. táblázat: A vadtípusú sejt szimulációs és kísérleti eredményeinek összehasonlítása.

Időtartam	Szimulációs eredmény (min/μm)	Kísérletes eredmény (min/μm)
Sejtciklus (BL<Töréspont)	-22,1	-26,9
Sejtciklus (BL>Töréspont)	-2,3	-3,3

*(Sveiczet et al., 1996)

A BSc szakdolgozatomban (Lovász, 2012) ismertetett modellel a töréspontnál kisebb sejtekre illesztett egyenes meredeksége -22,59 min/μm, míg ennél nagyobb sejtekre illesztett egyenes meredeksége -5,027 min/μm volt. Mivel a nagy sejtek szimulációs adataira illesztett egyenes meredekségének kísérletes eredmények szerint -3,3 min/μm-nek, míg elvileg 0 min/μm-nek kellene lennie, ezért elmondható hogy a modell bővítése eredményes volt.

A 22. ábrán látható, hogy az S+G₂ fázis időtartam értékeire illesztett egyenesek közel párhuzamosak a teljes ciklusidővel. Ennek magyarázata az, hogy a vad típusú sejtnek G₂-fázisban lévő ellenőrzési ponton hat a méretkontroll. Ez igazolja azt is, hogy a modell jól

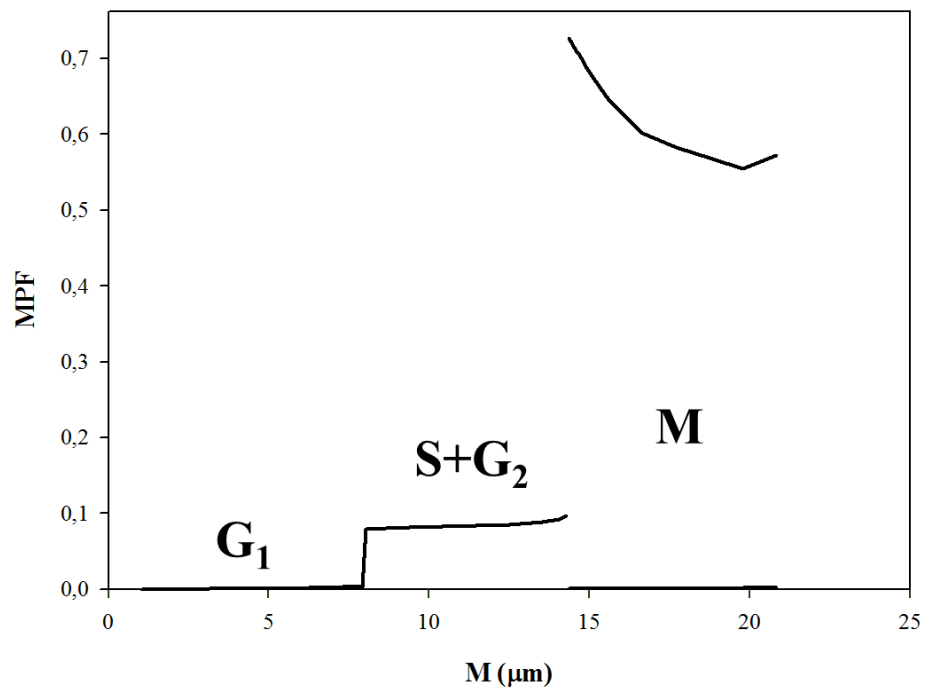
közelíti a valóságot, ugyanis a vad típusú sejtnek ahogy már az irodalmi áttekintésben is részleteztem a G₂-fázisban lévő ellenőrzési pontnál hat a méretkontroll, a G₁-fázisban pedig rejtett. A három legnagyobb születéskori mérettel rendelkező sejthez tartozó ciklusidő körülbelül azonos. Ez arra enged következtetni, hogy nagy mérettel (>18 µm) rendelkező sejteknél mindenképpen van egy minimális ciklusidő. Ez a ciklusidő az S- és M-fázishoz szükséges, hogy precízen végbemenjenek. A G₁-fázishoz illetve a mitózishoz szükséges idő a szimulációs eredmények (Függelék F9. táblázat) szerint körülbelül konstans.

6.2.3. Bifurkációs diagramok vad típusú sejt esetén

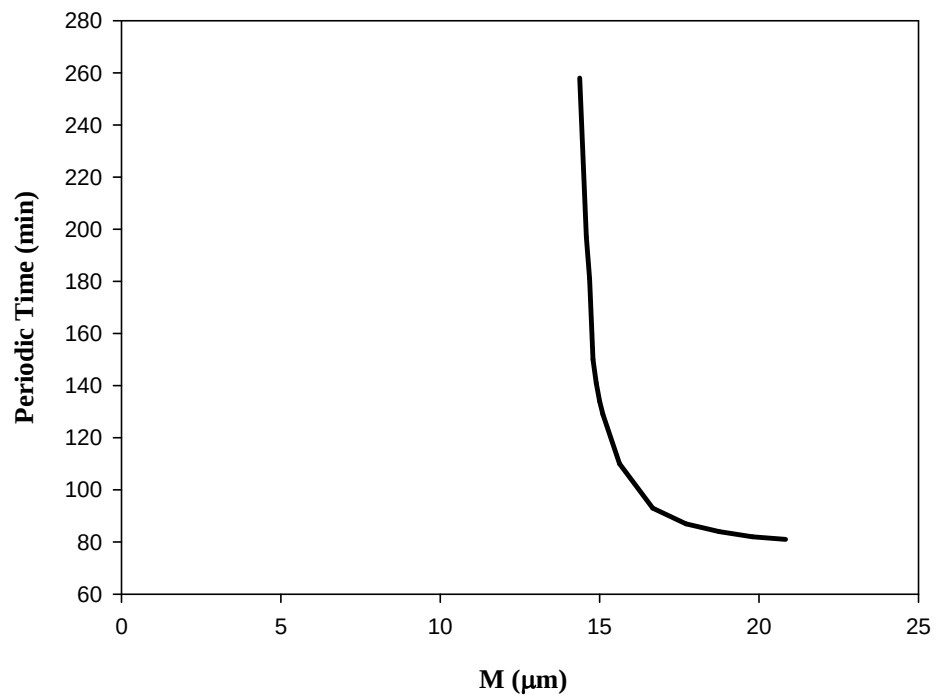
A bifurkációs diagram (23. ábra) azt mutatja, hogy amíg a sejttömeg kicsi, addig a rendszer egy stabil fókuszponthoz tart. Ez igaz mind a G₁-, S-, G₂-fázisokra, csak az MPF aktivitásának nagysága tér el az egyes szakaszokban. A G₁-fázisban közel 0 az MPF aktivitása, S-, és G₂-fázis során csekély mértékben, 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.

Matematikai modellek megállapították az MPF bistabilis kapcsolatát a ciklin fehérjék szintézisének sebességével (Ferrell, 2002, Novak & Tyson, 1993). Ez a bistabilitás a pozitív feedback kapcsolatnak tulajdonítható (az aktív Cdc2 ugyanis segíti a Cdc2 fehérjét aktiváló Cdc25 fehérje szintézisét és gátolja a Wee1 inhibitort). Mivel a modellbe integrált Pom1 fehérjére ható méretfüggés és Cdr2 fehérje a Wee1 fehérjére gátlóan hat, ezért a bifurkációs diagramon mutatott bistabilitás nemcsak a ciklin fehérjék szintézisének, hanem a Pom1 térbeli gradienseinek is eredménye. A szimulált értékekből látható (23. ábra), hogy 13,5 µm nagyságú méretnél tud bekövetkezni az oszcilláció.

A hasadó élesztő *cdc2-33* sejtje átlagosan 8 µm nagysággal születik. Ha megnézzük a diagramon (23. ábra) egy valódi, vad típusú sejt életciklusát, akkor azt látjuk, hogy az S+G₂-fázisban születik meg. A ciklus során egyre nagyobb méretűvé válik, így közeledik a bifurkációs ponthoz. Ha elérte a bizonyos 15 µm nagyságú méretet, akkor M-fázisba léphet. Ha ezt a tömeget eléri a sejt, akkor ciklusa végéhez ér, és 8 µm-re ugrik vissza a mérete, mert kettéosztódik. A diagram pontjai azt mutatják meg, hogy a rendszer végtelen idő alatt



23. ábra:
A bifurkációs diagram vad típusú hasadó élesztő esetén.



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

milyen állapothoz fog beállni (23. ábra). A valóságban nincs végtelen ideje, tehát a valódi rendszer késni fog. A grafikon alatt lesz a valódi sejtre jellemző ciklus során a görbe.

A periódusidő a bifurkációs diagramnál azt jelenti, hogy a bizonyos méretnél nagyobb sejteknél határciklusos oszcilláció lép fel, aminek jellemzője a periódusidő (24. ábra). Ha a méret függvényében ábrázolom a periódusidőt, akkor „fordított arányosság” figyelhető meg. A bifurkációs pontig a rendszer stabil fókuszpontokhoz tart, míg utána két határ között, véges amplitúdóval fog oszcillálni. A bifurkációs ponthoz végtelen periódusidő tartozik, ezért SNIC (Saddle Node Infinite Circle), vagy SNIPER (Saddle Node Infinite Period) bifurkációnak szokás hívni (24. ábra).

A két ábrát (23. és 24. ábra) egymás alatti ábrázolásban a legjobb prezentálni. Az x-tengelyeken a skálát is ezért készítettem ugyanolyan beosztásúra a két diagram esetén. Jól látszik, melyik tömeg a bifurkációs pont, illetve hol fog a rendszer oszcillálni.

A vad típusú hasadó élesztő Modell-B-vel készült szimulációs eredményei a Függelék F10. táblázatában olvashatóak.

6.2.4. A *wee1⁻* mutáns sejt analízise

Az állandósult állapotbeli körülmények közötti szimuláció szerint a ciklusidő 197 perc lett, ami 1 perc különbséggel megegyezik a vad típusú sejt ciklusidejével (4. táblázat).

4. táblázat: A *wee1⁻* mutáns sejt állandósult állapotbeli körülmények között kapott szimulációs eredményei.

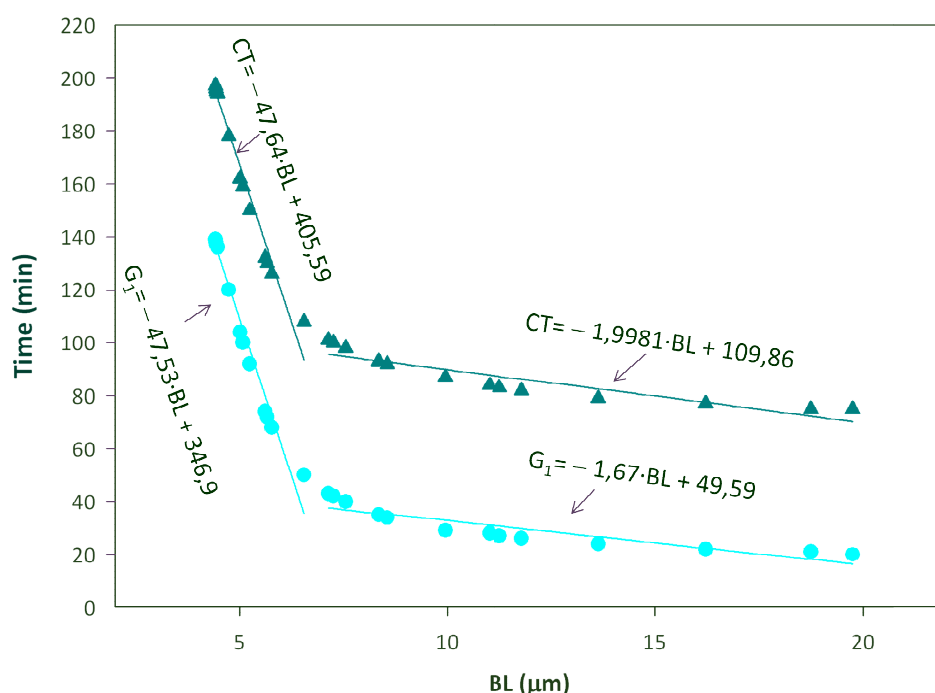
	Születéskori méret (μm)	Osztódáskori méret (μm)	Ciklusidő (min)	G ₁ (min)	S+G ₂ (min)	M (min)
Szimulációs eredmények	4,4	8,8	197	139	33	25
Kísérletes eredmények*	5,2	8,5	217	-	-	-

* (Sveicz et al., 1996)

A töréspontot szintén az adathalmazra illesztett két egyenes metszéspontjával határoztam meg. Értéke 6,48 μm lett ami, azt jelenti, hogy kb 50%-a a vad típusú sejt méretkontroll ábra törésponti értékéhez képest. Megjegyezném, hogy a kísérletesen, *wee1⁻* mutáns sejt esetében kapott 217 perc hosszú ciklusidő mérésénél sajnos csak 40 sejtciklust,

míg a vad típusú sejt kísérleteknél közel 150 sejtciklust mértek le, elemeztek ki. Ezért a vad típusú sejtrel kapott ciklusidőt tartjuk mérvadónak.

A Modell-B *wee1⁻* mutánsú sejt esetén az indukciós szinkrontenyészetekkel kapott szimulációs eredményei a Függelék F11. táblázatában olvashatók.



25. ábra:
A Modell-B méretkontroll vizsgálata *wee1⁻* mutáns esetén.

5. táblázat: A *wee1⁻* mutáns sejt szimulációs és kísérleti eredményeinek összehasonlítása.

Időtartam	Szimulációs eredmény (min/μm)	Kísérletes eredmény (min/μm)
Sejtciklus (BL < Töréspont)	-47,64	-48,8
Sejtciklus (BL > Töréspont)	-1,9981	-4,9

*(Sveicz et al., 1996)

A kísérletes eredményekhez hasonlítva a szimulált eredményeket elmondhatjuk, hogy az illesztett egyenesek meredeksége *wee1⁻* mutáns sejt esetén közeli megegyezést csak a töréspontnál kisebb sejtek esetén ad. Töréspontnál kisebb méretű sejteknél a BSc dolgozatomban kapott érték -48,6 min/μm volt. Ez kis mértékben, de romlott az újítások hatására. A töréspontnál nagyobb sejtek szimulált adataira illesztett egyenes meredeksége a

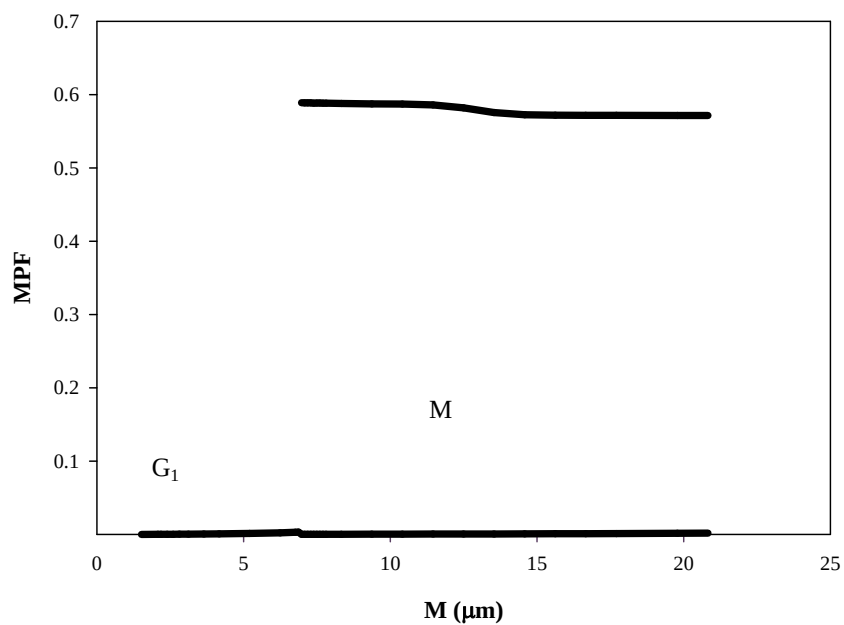
BSc szakdolgozatomban $-0,78 \text{ min}/\mu\text{m}$ volt. Ebben az esetben viszont jelentős javulást eredményezett a Pom1 térbeli gradiens hatásának beépítése.

A 25. ábrán látható, hogy a *wee1⁻* mutáns sejt esetén a méretkontroll a G_1 -fázisban hat. Ezt az reprezentálja, hogy a G_1 -fázis időtartamára kapott szimulált eredményekre illesztett egyenesek közel párhuzamosak a teljes ciklus időtartamára kapott szimulált eredményekre illesztett egyenesekkel. Az $S+G_2$ illetve a mitózishoz konstans idő szükséges.

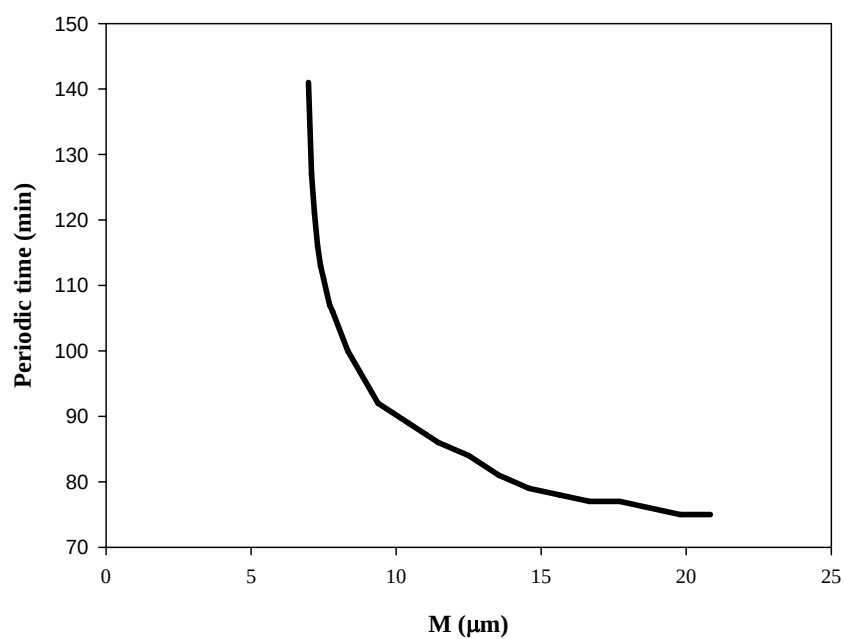
6.2.5. Bifurkációs diagramok *wee1⁻* mutáns sejt esetén

A periódusidőt vizsgálva szintén arra a következtetésre jutottam, hogy a bifurkációs pontnál a periódusidő végtelenhez tart (27. ábra), tehát ismét egy SNIC bifurkáció jellemzi a rendszer stabilitását. A vad típusú sejtre jellemző bifurkációs diagram (23. ábra) esetén az MPF aktivitása fokozatosan emelkedett mielőtt oszcillálni kezdett. A bifurkációs pont ($\sim 7 \mu\text{m}$) előtt az MPF aktivitás közel nulla a *wee1⁻* mutáns esetén, azaz stabil $S+G_2$ -es fázisa a mutáns fenotípusú sejtnek nincsen (26. ábra). Ez nem azt jelenti, hogy nem rendelkezik ilyen fázissal a *wee1⁻* mutáns sejt, hanem azt, hogy rövid időt tölt csak el abban a fázisban. A jelenség ahhoz hasonlítható, mintha egy golyóstollat hegyével az asztalra állítanánk. Meg fog állni egy bizonyos ideig, de ez nem stabil helyzet, ezért el fog dőlni.

A *wee1⁻* mutáns bifurkációs diagramjait (26. és 27. ábra) szintén egymás alatt reprezentálom, így könnyebb átlátni mely tömegekhez tartozik periódusidő. A Modell-B használatával kapott *wee1⁻* mutáns sejtre jellemző bifurkációs eredmények a Függelék F.12. táblázatában olvashatók.



26. ábra
A Modell-B bifurkációs diagramja *wee1⁻* mutáns esetén.



27. ábra
A Modell-B tömeg és periódusidő összefüggését mutató bifurkációs diagramja *wee1⁻* mutáns esetén.

7. Összefoglalás

A TDK dolgozatomban a kitűzött cél az volt, hogy a BSc dolgozatomban (Lovász, 2012) közölt modellt tovább fejlesszem, illetve a G_2 -fázisú méretkontrollt részletesebben vizsgáljam. A modellt igyekeztem úgy alakítani, hogy mind a vad típusú, mind a *wee1⁻* mutáns sejt esetében a kísérletes adatokhoz közelebbi értéket mutasson.

A modell kinetikai egyenletekkel közelíti az egyes fehérjék mennyiségének változását. Munkám során a WinPP[®] differenciálegyenleteket numerikusan megoldó szoftverrel dolgoztam, amelynek 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 Microsoft Excel 2007[®] használatával. A kapott adatok felhasználásával méretkontroll ábrákat készítettem, amelyeket a kísérletesen kapott eredményekkel hasonlítottam össze (Sveiczter et al., 1996). A kapott eredményeket a Sigma Plot 11.0[®] szoftverrel értékeltem ki, majd az ábrákat Microsoft Power Point 2007[®] programmal készítettem el.

A feladatomban a G_2 -fázisú méretkontroll vizsgálata volt. Új egyenletek beépítésével közvetlenül a Pom1 fehérje térbeli gradienseinek szerepét vizsgáltam. Megállapítottam, hogy a vad típusú sejt és a *wee1⁻* mutáns sejtnek a méretkontroll ábráin szereplő egyenesek meredekségei a beépítés után jobban közelítettek a kísérletes adatokhoz.

Nagyon érdekes, hogy a bifurkációs diagramok sem a BSc szakdolgozatomban, sem az itteni Modell-B esetén, nem mutatták ki, hogy a *wee1⁻* mutánsnak lenne olyan jellemző tömege, amivel G_2 -fázisban stabilan maradna.

A dolgozatban közölt modellel kapott eredményeket 2014. október 15-17. között megtartott Magyar Mikrobiológiai Társaság nagygyűlésén bemutattam poszter formájában.

8. Irodalomjegyzék

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P.** (2010). *Essential Cell Biology*. 3rd. ed. New York: Garland Publishing, Inc.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P.** (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
- Berthelot-Grosjean, M. and Martin, S.** (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 Mitchison, J. M.** (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.
- Ferrell, Jr. J. E.** (2002). Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability *Curr. Opin. Cell. Bio.* **14**, 140-148.
- Forsburg, S. L. and Nurse, P.** (1991). Cell-cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Ann. Rev. Cell Biol.* **7**, 227-256.
- Grallert, A., Connolly, Y., Smith, L. D., Simanis, V. and Hagan, M. I.** (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., Berthelot-Grosjean, M., Kokkoris, K., Vincenzetti, V., Moosbrugger, J. and Martin, S. G.** (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., Shao, B., Yu, C., Ouyang, Q. and Wang, H. (2010). A mathematical model for cell size control in fission yeast. *J. Theor. Biol.* **264**, 771-781.

Lovász, K. and Sveicz, A. (2014). A hasadó élesztő sejtciklusában működő G₁- és G₂-fázisú méretkontroll matematikai modellezése inhibitor hígulás által. *A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése*. Keszthely.

Lovász, K. (2012). A hasadó élesztő sejtciklusában működő G₁-fázisú méretkontrolljának vizsgálata matematikai modellezéssel. Szakdolgozat. Budapest: BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar.

Lygeros, J., Koutroumpas, K., Dimopoulos, S., Legouras, I., Kouretas, P., Heinricher, C., Nurse, P. and Lygerou, Z. (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*, (eds A. Nasim P. Young and B. F. Johnson), pp. 205-242. New York: Academic Press.

Mitchison, J. M. and Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **75**, 357-376.

Morgan, D. O. (2007). *The Cell Cycle*. London, UK: New Science Press Ltd.

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 Nurse, P. (2007). Nuclear size control in fission yeast. *J Cell Biol* **179**, 593-600.

Németh, M. (2012). A hasadó élesztőben működő méretkontroll mechanizmusának modellezése. Szakdolgozat (biomérnök). Budapest: BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar.

Novak, B., Pataki, Z., Ciliberto, A. and Tyson, J. J. (2001). Mathematical model of the cell division cycle of fission yeast. *Chaos* **11**, 277-286.

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

Novak, B. and Tyson, J. J. (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 Fantes, P. A. (1981). Cell cycle controls in fission yeast: a genetic analysis. In *The Cell Cycle*, (ed. P. C. L. John), pp. 85-98. Cambridge: Cambridge University Press.

Nurse, P., Thuriaux, P. and Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* **146**, 167-178.

Sveiczer, A. and Horváth, A. (2013). Cell cycle, fission yeast. In *Encyclopedia of Systems Biology*, (eds W. Dubitzky O. Wolkenhauer and K.-H. Cho, Yokota H.), pp. 349-353. Heidelberg - New York: Springer.

Sveiczer, A., Novak, B. and Mitchison, J. M. (1996). The size control of fission yeast revisited. *J. Cell Sci.* **109**, 2947-2957.

Sveiczer, A. and Rácz-Mónus, A. (2013). Cell size regulation, cell cycle. In *Encyclopedia of Systems Biology*, (eds W. Dubitzky O. Wolkenhauer and K.-H. Cho, Yokota H.). Heidelberg - New York: Springer.

Sveiczer, A., Tyson, J. J. and Novak, B. (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., C. Ewald, J. and M. Skotheim, J. (2012). Cell size control in yeast. *Curr. Biol.* **22**, 350-359.

Tyson, J. J., Chen, K. C. and Novak, B. (2003). Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 221-231.

Vilela, M., Morgan, J. J. and Lindahl, P. A. (2010). Mathematical model of a cell size checkpoint. *Plos One* **6**.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S. et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.

Yan, J., Ni, X. and Yang, L. (2013). Robust cell size checkpoint from spatiotemporal positive feedback loop in fission yeast. *Biomed. Res. Int.* **2013**.

Zetterberg, A., Larsson, O. and Wiman, K. G. (1995). What is the restriction point? *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 835-842.

9. Függelék

F1. táblázat: A Modell-A differenciál egyenletei, algebrai kifejezései, valamint paraméterei

$$\begin{aligned}
 \frac{d[Cdc13_T]}{dt} &= k_1 - (k'_2 + k''_2[Ste9] + k'''_2[Slp1]) \cdot [Cdc13_T] \\
 \frac{dM}{dt} &= \mu \cdot M \cdot \left(1 - \frac{M}{M_{star}}\right) \\
 \frac{d[preMPF]}{dt} &= k_{wee}([Cdc13_T] - [preMPF]) - k_{25}[preMPF] - (k'_2 + k''_2[Ste9] + k'''_2[Slp1])[preMPF] \\
 \frac{d[Ste9]}{dt} &= (k'_3 + k''_3[Slp1]) \frac{1 - [Ste9]}{J_3 + 1 - [Ste9]} (k'_4[SK] + k_4[MPF]) \frac{[Ste9]}{J_4 + [Ste9]} \\
 \frac{d[Slp1_T]}{dt} &= k'_5 + k''_5 \frac{[MPF]^4}{J_5^4 + [MPF]^4} - k_6[Slp1_T] \\
 \frac{d[Slp1]}{dt} &= k_7[IEP] \frac{[Slp1_T] - [Slp1]}{J_7 + [Slp1_T] - [Slp1]} - k_8 \frac{[Slp1]}{J_8 + [Slp1]} - k_6[Slp1] \\
 \frac{d[IEP]}{dt} &= k_9[MPF] \frac{1 - [IEP]}{J_9 + 1 - [IEP]} - k_{10} \frac{[IEP]}{J_{10} + [IEP]} \\
 \frac{d[Rum1_T]}{dt} &= k_{11} - (k_{12} + k'_{12}[SK] + k''_{12}[MPF])[Rum1_T] \\
 \frac{d[SK]}{dt} &= k_{13}[TF] - k_{14}[SK] \\
 [Trimer] &= \frac{2[Cdc13_T][Rum1_T]}{\sum + \sqrt{\sum^2 - 4[Cdc13_T][Rum1_T]}} \\
 [MPF] &= \frac{([Cdc13_T] - [preMPF])([Cdc13_T] - [Trimer])}{[Cdc13_T]} \\
 Rum1_{TN} &= Rum1_T \cdot \frac{D}{M} \\
 [TF] &= G(k_{15}, k'_{16} + k''_{16}[MPF], J_{15}, J_{16}) \\
 k_{wee} &= k'_{wee} + k''_{wee} \cdot \frac{B}{M} \cdot G(V_{awe}, V_{iwee}[MPF], J_{awe}, J_{iwee}) \\
 k_{25} &= k'_{25} + (k''_{25} - k'_{25}) \cdot G(V_{a25}[MPF], V_{i25}, J_{a25}, J_{iwee}) \\
 \sum &= [Cdc13_T] + [Rum1_T] + K_{diss} \\
 G(a, b, c, d) &= \frac{2ad}{b - a + bc + ad + \sqrt{(b - a + bc + ad)^2 - 4ad(b - a)}}
 \end{aligned}$$

F2. táblázat: A Modell-A paraméterei, és változói

Sebességi állandók vad típus esetén (min^{-1})

$k_1 = 0,025, k_2' = 0,03, k_2'' = 1, k_2''' = 0,1, k_3' = 1, k_3'' = 10, k_4 = 35, k_4' = 1,1, k_5' = 0,005, k_5'' = 0,3, k_6 = 0,1, k_7 = 1, k_8 = 0,25, k_9 = 0,1, k_{10} = 0,04, k_{11} = 0,1, k_{12} = 0,01, k_{12}' = 1, k_{12}'' = 3, k_{13} = 0, k_{13}' = 0,1, k_{14} = 0,1, k_{15} = 1,034, k_{15}'' = 0, k_{16}' = 1, k_{16}'' = 2, k_{25}' = 0,05, k_{25}'' = 4,95, K_{diss} = 0,001, k_{wee}' = 0,15, k_{wee}'' = 0,7, \mu = 0,004$

$V_{awee} = 0,25, V_{iwee}' = 0, V_{iwee}'' = 1, V_{a25}' = 0, V_{a25}'' = 1, V_{i25} = 0,25$

Sebességi állandók wee mutáns esetén (min^{-1})

$k_1 = 0,025, k_2' = 0,03, k_2'' = 1, k_2''' = 0,1, k_3' = 1, k_3'' = 10, k_4 = 35, k_4' = 1,1, k_5' = 0,005, k_5'' = 0,3, k_6 = 0,1, k_7 = 1, k_8 = 0,25, k_9 = 0,1, k_{10} = 0,04, k_{11} = 0,1, k_{12} = 0,01, k_{12}' = 1, k_{12}'' = 3, k_{13} = 0, k_{13}' = 0,1, k_{14} = 0,1, k_{15} = 1,034, k_{15}'' = 0, k_{16}' = 1, k_{16}'' = 2, k_{25}' = 0,05, k_{25}'' = 4,95, K_{diss} = 0,001, k_{wee}' = 0,15, k_{wee}'' = 0,15, \mu = 0,004$

$V_{awee} = 0,25, V_{iwee}' = 0, V_{iwee}'' = 1, V_{a25}' = 0, V_{a25}'' = 1, V_{i25} = 0,25$

Michaelis és egyéb konstansok (vad típus és wee1⁻ mutáns esetén) (dimenziómentes)

$J_3 = 0,01, J_4 = 0,01, J_5 = 0,3, J_7 = 0,001, J_8 = 0,001, J_9 = 0,01, J_{10} = 0,01, J_{15} = 0,01, J_{16} = 0,01, J_{a25} = 0,01, J_{i25} = 0,01, J_{awee} = 0,01, J_{iwee} = 0,1, B = 0,9, D = 0,15, M_{star(vad)} = 8,5, M_{star(wee)} = 5$

F3. táblázat: A Modell-B differenciál egyenletei, algebrai kifejezései, valamint paramétereit

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$\Sigma = Cdc13_T + Rum1_n + k_D$$

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

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

$$Rum1_N = Rum1 \cdot \frac{D}{M}$$

$$k_{wee} = k'_{wee} + k''_{wee} \cdot G(V_{awee}, V''_{iwee} \cdot Cdr2 + V'_{iwee} \cdot [MPF], J_{awee}, J_{iwee})$$

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

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

$$TF = G(k'_{15} + k''_{15} \cdot SK, k'_{16} + k''_{16} \cdot MPF, J_{15}, J_{16})$$

$$Pom1 = \frac{TT}{M}$$

$$Cdr2 = G(k_{31}, k'_{32} + k_{32} \cdot Pom1, J_{31}, J_{32})$$

F4. táblázat: A Modell-B paramétereit, és változóit

Sebességi állandók vad típus esetén (min^{-1})

$k_1 = 0,025, k_2' = 0,03, k_2'' = 1, k_2''' = 0,1, k_3' = 1, k_3'' = 10, k_4 = 35, k_4' = 1,1, k_5' = 0,005, k_5'' = 0,3, k_6 = 0,1, k_7 = 1, k_8 = 0,25, k_9 = 0,1, k_{10} = 0,04, k_{11} = 0,1, k_{12} = 0,01, k_{12}' = 1, k_{12}'' = 3, k_{13} = 0, k_{13}' = 0,1, k_{14} = 0,1, k_{15}' = 1,034, k_{15}'' = 0, k_{16}' = 1, k_{16}'' = 2, k_{25} = 0,05, k_{25}'' = 4,95, K_{\text{diss}} = 0,001, k_{\text{wee}} = 0,15, k_{\text{wee}}'' = 0,7, k_{31} = 1, k_{32} = 0, k_{32}' = 1$
 $\mu = 0,004$

$V_{\text{awee}} = 0,25, V_{\text{iwee}}' = 0,25, V_{\text{iwee}}'' = 1, V_{a25}' = 0, V_{a25}'' = 1, V_{i25} = 0,25$

Sebességi állandók wee mutáns esetén (min^{-1})

$k_1 = 0,025, k_2' = 0,03, k_2'' = 1, k_2''' = 0,1, k_3' = 1, k_3'' = 10, k_4 = 35, k_4' = 1,1, k_5' = 0,005, k_5'' = 0,3, k_6 = 0,1, k_7 = 1, k_8 = 0,25, k_9 = 0,1, k_{10} = 0,04, k_{11} = 0,1, k_{12} = 0,01, k_{12}' = 1, k_{12}'' = 3, k_{13} = 0, k_{13}' = 0,1, k_{14} = 0,1, k_{15}' = 1,034, k_{15}'' = 0, k_{16}' = 1, k_{16}'' = 2, k_{25} = 0,05, k_{25}'' = 4,95, K_{\text{diss}} = 0,001, k_{\text{wee}} = 0,15, k_{\text{wee}}'' = 0,15, k_{31} = 1, k_{32} = 0, k_{32}' = 1$
 $\mu = 0,004$

$V_{\text{awee}} = 0,25, V_{\text{iwee}}' = 0,25, V_{\text{iwee}}'' = 1, V_{a25}' = 0, V_{a25}'' = 1, V_{i25} = 0,25$

Michaelis és egyéb konstansok (vad típus és wee1 mutáns esetén) (dimenziómentes)

$J_3 = 0,01, J_4 = 0,01, J_5 = 0,3, J_7 = 0,001, J_8 = 0,001, J_9 = 0,01, J_{10} = 0,01, J_{15} = 0,01, J_{16} = 0,01, J_{a25} = 0,01, J_{i25} = 0,01, J_{\text{awee}} = 0,01, J_{\text{iwee}} = 0,1, D = 0,15, M_{\text{star (vad)}} = 8,5, M_{\text{star (wee)}} = 5, TT = 1$

F5. 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
7,804133	15,64259	7,838458	201	44	138	19	1,338235	5,555895	0,944328278
7,961735	15,72001	7,758274	192	41	133	18	1,42849	5,430485	0,899299135
7,992653	15,67251	7,679859	195	42	135	18	1,300276	5,482555	0,897027928
8	15,68545	7,685448	195	42	135	18	1,301322	5,486505	0,897620417
8,006932	15,64674	7,639806	194	42	134	18	1,30231	5,441555	0,895941699
8,027166	15,68219	7,655023	194	42	134	18	1,305193	5,452407	0,897422921
8,060286	15,68318	7,622891	193	41	134	18	1,276665	5,45453	0,89169553
8,102056	15,71132	7,609264	192	41	133	18	1,282462	5,427898	0,898904143
8,123346	15,6973	7,573951	191	41	132	18	1,285414	5,390324	0,898212906
8,214886	15,75368	7,538797	189	40	130	19	1,264401	5,324834	0,949561929
8,271419	15,74865	7,477227	187	41	128	18	1,305895	5,270849	0,900484113
8,348146	15,77738	7,429236	185	39	128	18	1,248245	5,279223	0,901767838
8,641922	15,86063	7,218705	177	37	122	18	1,216587	5,096598	0,905520267
8,710828	15,87169	7,160858	175	37	120	18	1,22501	5,029834	0,906014007
8,760667	15,9022	7,141533	174	36	120	18	1,195909	5,038228	0,907396481
9,259355	16,0836	6,824246	162	33	111	18	1,144649	4,813971	0,865626026
9,602188	16,25276	6,650567	155	31	106	18	1,105959	4,621807	0,922801188
9,765251	16,34518	6,579933	152	31	103	18	1,121927	4,531058	0,926948609
10,89893	17,05736	6,158427	133	27	87	19	1,106966	4,041761	1,009699534
11,00202	17,15018	6,148157	133	27	87	19	1,074182	4,060226	1,013748207
12,30846	18,12927	5,820807	118	24	74	20	1,042879	3,666715	1,111212602
12,8496	18,80056	5,950957	112	23	70	19	0,263361	1,00338	4,684215854
13,49679	19,12771	5,630914	108	22	66	20	1,026783	3,448383	1,155748005
16,04371	21,55573	5,512021	95	20	53	22	1,227933	2,904775	1,37931375
18,54263	24,11794	5,575319	88	18	47	23	1,06095	2,964517	1,549851754
20,05851	25,62346	5,56495	83	16	44	23	1,056407	2,900726	1,607816901

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

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

M	MPF		T _p
μm	min	max	μm
0,987481	2,15•10 ⁻⁵	-	-
1,974962	8,74•10 ⁻⁵	-	-
2,962444	2,09•10 ⁻⁴	-	-
3,949925	4,11•10 ⁻⁴	-	-
4,937406	7,47•10 ⁻⁴	-	-
5,924887	3,32•10 ⁻²	-	-
6,912368	4,64•10 ⁻²	-	-
7,89985	5,83•10 ⁻²	-	-
8,887331	7,01•10 ⁻²	-	-
9,381071	7,60•10 ⁻²	-	-
9,578568	7,84•10 ⁻²	-	-
9,677316	7,96•10 ⁻²	-	-
9,776064	8,08•10 ⁻²	-	-
9,825438	8,15•10 ⁻²	-	-
9,835313	8,16•10 ⁻²	-	-
9,845188	8,17•10 ⁻²	-	-
9,855062	8,18•10 ⁻²	-	-
9,864937	8,19•10 ⁻²	-	-
9,869875	8,20•10 ⁻²	-	-
9,874812	8,20•10 ⁻²	-	-
10,86229	9,49•10 ⁻²	-	-
11,84977	1,10•10 ⁻¹	-	-
12,83726	1,32•10 ⁻¹	-	-
13,03475	1,42•10 ⁻¹	-	-
13,08413	6,40•10 ⁻⁴	0,7558	456
13,1335	6,48•10 ⁻⁴	0,755155	342
13,331	6,67•10 ⁻⁴	0,751897	221
13,82474	7,17•10 ⁻⁴	0,742228	182
14,31848	8,50•10 ⁻⁴	0,7329	157
14,81222	8,29•10 ⁻⁴	0,723767	143
15,7997	9,70•10 ⁻⁴	0,7068	125
16,29344	1,28•10 ⁻³	0,699122	120
16,78718	1,11•10 ⁻³	0,691765	115
17,28092	1,18•10 ⁻³	0,685095	111
17,77466	1,28•10 ⁻³	0,679187	107
18,2684	1,35•10 ⁻³	0,673389	104
18,76214	1,37•10 ⁻³	0,668	102
19,74962	1,65•10 ⁻³	0,658372	97
20,73711	1,87•10 ⁻³	0,647367	94

Megjegyzés:

MPF - a bifurkációs változó, ahol csak az MPF minimuma (min) látható, ott stabil fókuszponthoz tart a rendszert. 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

F7. 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
4,227239	8,316893	4,089653	196	138	33	25	2,633484	0,801183	0,65498641
4,232552	8,299246	4,066694	195	138	33	24	2,636219	0,801933	0,628541663
4,233826	8,301498	4,067672	195	138	33	24	2,636881	0,802111	0,62867991
4,234803	8,303729	4,068926	195	138	33	24	2,637829	0,802289	0,628808283
4,23585	8,305053	4,069203	195	137	34	24	2,614712	0,825603	0,628887281
4,240708	8,314493	4,073785	195	137	33	25	2,617951	0,800995	0,654838288
4,241972	8,315836	4,073864	195	137	33	25	2,617842	0,801094	0,654927161
4,244787	8,320813	4,076026	195	137	33	25	2,619294	0,801489	0,655243155
4,251551	8,305675	4,054124	194	136	33	25	2,599544	0,800284	0,654295173
4,439429	8,305181	3,865752	182	124	33	25	2,411241	0,800245	0,654265549
4,74146	8,314641	3,573181	164	106	33	25	2,117328	0,801005	0,654848162
4,744985	8,32027	3,575284	164	106	33	25	2,118631	0,80145	0,655203656
4,932587	8,316972	3,384384	153	95	33	25	1,928195	0,801193	0,654996285
5,438572	8,3613	2,922727	127	69	33	25	1,460267	0,804718	0,657741482
5,442908	8,340326	2,897418	126	69	33	24	1,461215	0,805212	0,630990616
6,1242	8,72331	2,59911	106	49	33	24	1,110176	0,835439	0,653495313
6,776639	9,315542	2,538903	97	40	32	25	0,970813	0,853174	0,714916644
6,806412	9,324193	2,517781	96	39	33	24	0,948555	0,881613	0,687612789
7,168896	9,694646	2,52575	93	36	33	24	0,882117	0,935688	0,707945027
8,059565	10,58076	2,521198	86	30	33	23	0,822187	0,975286	0,723724977
8,121134	10,6884	2,567264	87	30	33	24	0,826927	0,971188	0,769149112
9,416729	12,04342	2,62669	81	25	32	24	0,763511	1,039126	0,824053067
10,6096	13,32912	2,719523	78	22	32	24	0,726984	1,114274	0,878265786
10,61937	13,38393	2,764552	79	23	32	24	0,766878	1,117335	0,880339496
11,32048	14,10735	2,786869	77	22	32	23	0,758287	1,158019	0,870563432
13,09568	15,98416	2,888481	74	19	32	23	0,712764	1,246794	0,928923571
15,47985	18,64109	3,161233	73	17	32	24	0,692817	1,338136	1,130280864
17,8427	20,94122	3,098519	71	16	32	23	0,687583	1,395706	1,015229429
19,23337	22,32577	3,092396	70	16	31	23	0,700914	1,369933	1,021549309

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

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

M	MPF		T_p
μm	min	max	min
0,444367	2,11•10 ⁻⁵	-	-
0,493741	2,52•10 ⁻⁵	-	-
0,592489	3,41•10 ⁻⁵	-	-
0,691237	4,39•10 ⁻⁵	-	-
0,789985	5,45•10 ⁻⁵	-	-
0,888733	6,57•10 ⁻⁵	-	-
0,987481	7,77•10 ⁻⁵	-	-
1,974962	2,33•10 ⁻⁴	-	-
2,962444	4,65•10 ⁻⁴	-	-
3,949925	8,15•10 ⁻⁴	-	-
4,937406	1,37•10 ⁻³	-	-
5,924887	2,31•10 ⁻³	-	-
6,418628	3,13•10 ⁻³	-	-
6,517376	3,38•10 ⁻³	-	-
6,56675	3,55•10 ⁻³	-	-
6,576625	3,60•10 ⁻³	-	-
6,577119	2,96•10 ⁻⁴	0,589104	184
6,577612	2,96•10 ⁻⁴	0,588813	175
6,579587	2,97•10 ⁻⁴	0,58909	165
6,581562	2,96•10 ⁻⁴	0,589081	161
6,583537	2,96•10 ⁻⁴	0,588997	158
6,5865	2,96•10 ⁻⁴	0,588729	154
6,596374	2,98•10 ⁻⁴	0,588917	148
6,616124	2,99•10 ⁻⁴	0,588778	141
6,714872	3,04•10 ⁻⁴	0,58802	127
6,81362	3,11•10 ⁻⁴	0,587422	120
6,912368	3,18•10 ⁻⁴	0,586977	115
7,011117	3,24•10 ⁻⁴	0,585932	113
7,109865	3,29•10 ⁻⁴	0,586073	110
7,208613	3,37•10 ⁻⁴	0,585632	108
7,307361	3,44•10 ⁻⁴	0,584479	105
7,406109	3,52•10 ⁻⁴	0,584525	104
7,89985	3,88•10 ⁻⁴	0,58299	98
8,39359	4,19•10 ⁻⁴	0,581429	94
8,887331	4,57•10 ⁻⁴	0,580377	91
9,874812	5,37•10 ⁻⁴	0,57843	87
10,86229	6,30•10 ⁻⁴	0,577082	84
11,84977	7,27•10 ⁻⁴	0,576465	82
12,83726	8,32•10 ⁻⁴	0,575875	80
13,82474	9,60•10 ⁻⁴	0,575189	80
14,81222	1,11•10 ⁻³	0,574914	77
15,7997	1,24•10 ⁻³	0,57432	77
16,78718	1,49•10 ⁻³	0,574207	76
17,77466	1,59•10 ⁻³	0,574164	75
18,76214	1,82•10 ⁻³	0,574027	74
19,74962	2,04•10 ⁻³	0,573881	74
20,73711	2,32•10 ⁻³	0,573516	74

Megjegyzés:

MPF - a bifurkációsváltozó, 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

F9. 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
8	15,92435	7,924347	198	48	131	19	1,511418	5,444358	0,968570915
8,010394	15,94299	7,932596	198	48	133	17	1,513158	5,450034	0,969404095
8,014737	15,9508	7,936064	198	47	132	19	1,479914	5,486329	0,969820684
8,015487	15,95215	7,936668	198	48	131	19	1,514001	5,452742	0,969924832
8,016393	15,94257	7,92618	198	48	131	19	1,506867	5,449909	0,969404095
8,020455	15,96101	7,940553	198	47	131	20	1,480851	5,439682	1,020019736
8,022121	15,96403	7,941907	198	48	130	20	1,515105	5,406573	1,020228031
8,026339	15,97163	7,945291	198	48	130	20	1,515813	5,408833	1,02064462
8,050105	15,96184	7,911735	197	47	130	20	1,485673	5,405938	1,020123883
8,056104	15,97257	7,916463	197	47	130	20	1,486652	5,409167	1,02064462
8,08135	15,96528	7,883928	196	47	129	20	1,490756	5,37284	1,020332178
8,085349	15,97236	7,88701	196	47	129	20	1,491412	5,374954	1,02064462
8,114843	15,98361	7,868764	195	47	128	20	1,503462	5,344033	1,021269505
8,230426	15,96694	7,736517	191	46	126	19	1,480289	5,285679	0,970549716
8,356955	15,97788	7,620924	187	45	123	19	1,465271	5,184583	0,971070453
8,396468	15,99038	7,593908	186	45	122	19	1,469072	5,153141	0,971695338
8,460436	15,99881	7,538377	184	44	121	19	1,44592	5,120345	0,972111927
8,516467	16,04183	7,525359	183	44	119	20	1,454304	5,047181	1,02387319
8,807195	16,05797	7,250774	174	42	113	19	1,424934	4,850916	0,974923907
8,899511	16,10525	7,205741	172	42	110	20	1,437932	4,740394	1,027414202
9,133624	16,11723	6,983605	165	41	105	19	1,433485	4,57228	0,977840035
9,410843	16,18847	6,777622	158	40	98	20	1,432881	4,313265	1,031475951
10,07176	16,40468	6,332912	143	37	85	21	1,398408	3,841477	1,093027071
10,79842	16,65973	5,861312	128	35	72	21	1,399116	3,355734	1,106462086
11,13398	16,86261	5,728628	123	34	67	22	1,392555	3,167435	1,16863809
11,37258	16,97603	5,603443	119	34	63	22	1,417446	3,011214	1,174782788
11,66451	17,1761	5,511585	115	33	59	23	1,418384	2,855305	1,237896118
11,95029	17,32263	5,37234	111	33	55	23	1,431402	2,694918	1,246019616
12,24659	17,55186	5,305269	108	32	52	24	1,414218	2,579106	1,311944927
12,55893	17,73953	5,180605	104	32	48	24	1,443691	2,414241	1,32267211
13,13538	18,20497	5,069583	99	31	42	26	1,448378	2,163142	1,458063743
13,84504	18,76174	4,916695	93	30	37	26	1,460043	1,965053	1,49159921
15,19	20,07848	4,888471	87	28	35	24	1,461605	1,975781	1,451085867
16,52799	21,52352	4,995535	84	27	33	24	1,501077	1,969323	1,525134676
17,59341	22,67372	5,080311	82	27	32	23	1,572105	1,991611	1,516594588
19,18302	24,42194	5,238927	80	26	31	23	1,608973	2,037019	1,59293464
19,71104	25,04183	5,330785	80	25	32	23	1,574605	2,137521	1,61865905
20,76335	26,1963	5,432954	79	25	31	23	1,631261	2,137209	1,664483911

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

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

M	MPF		T _p
	Min	max	
μm			min
1,041474	8,94•10 ⁻⁵	-	-
2,082948	2,10•10 ⁻⁴	-	-
3,124422	3,79•10 ⁻⁴	-	-
4,165896	6,29•10 ⁻⁴	-	-
5,207371	1,02•10 ⁻³	-	-
6,248845	1,63•10 ⁻³	-	-
7,290319	2,59•10 ⁻³	-	-
7,811056	3,32•10 ⁻³	-	-
7,915203	3,53•10 ⁻³	-	-
8,019351	7,89•10 ⁻²	-	-
8,123498	7,91•10 ⁻²	-	-
8,227645	7,93•10 ⁻²	-	-
8,331793	7,94•10 ⁻²	-	-
8,43594	7,96•10 ⁻²	-	-
8,540088	7,98•10 ⁻²	-	-
8,644235	8,00•10 ⁻²	-	-
8,748382	8,01•10 ⁻²	-	-
8,85253	8,03•10 ⁻²	-	-
9,373267	8,10•10 ⁻²	-	-
10,41474	8,23•10 ⁻²	-	-
11,45622	8,36•10 ⁻²	-	-
12,49769	8,52•10 ⁻²	-	-
13,53916	8,84•10 ⁻²	-	-
14,0599	9,22•10 ⁻²	-	-
14,2682	9,65•10 ⁻²	-	-
14,37234	6,53•10 ⁻⁴	7,26•10 ⁻¹	258
14,58064	6,72•10 ⁻⁴	0,710551	197
14,68478	6,82•10 ⁻⁴	7,04•10 ⁻¹	181
14,78893	6,94•10 ⁻⁴	6,96•10 ⁻¹	150
14,89308	7,04•10 ⁻⁴	6,89•10 ⁻¹	141
14,99723	7,16•10 ⁻⁴	6,82•10 ⁻¹	134
15,10137	7,27•10 ⁻⁴	6,75•10 ⁻¹	129
15,62211	7,90•10 ⁻⁴	6,44•10 ⁻¹	110
16,66359	9,11•10 ⁻⁴	6,02•10 ⁻¹	93
17,70506	1,04•10 ⁻³	5,83•10 ⁻¹	87
18,74653	1,18•10 ⁻³	5,68•10 ⁻¹	84
19,78801	1,33•10 ⁻³	5,55•10 ⁻¹	82
20,82948	1,88•10 ⁻³	5,73•10 ⁻¹	81

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

F11. táblázat: A Modell-B *weel*⁻ mutáns sejtekre vonatkozó adatai

BL	DL	Ext	CT	Idő (min)			Növekedés (μm)		
μm	μm	μm	min	G1	S+G2	M	G1	S+G2	M
4,420006	8,821765	4,401759	197	139	33	25	2,829466	0,86358	0,708713
4,423432	8,827972	4,40454	197	139	33	25	2,83132	0,864101	0,709119
4,423588	8,828253	4,404665	197	139	33	25	2,831414	0,864121	0,709129
4,426973	8,834387	4,407414	197	138	34	25	2,808293	0,889586	0,709535
4,428515	8,837179	4,408664	197	138	33	26	2,80444	0,867111	0,737114
4,430139	8,81084	4,3807	196	138	33	25	2,810001	0,862674	0,708025
4,432076	8,814297	4,382221	196	138	33	25	2,811043	0,862955	0,708223
4,446282	8,810631	4,364349	195	137	33	25	2,793713	0,862663	0,707973
4,449854	8,817068	4,367213	195	137	33	25	2,795619	0,863195	0,7084
4,473017	8,829367	4,356351	194	136	33	25	2,782923	0,864215	0,709213
4,740019	8,826462	4,086442	178	120	33	25	2,513452	0,863976	0,709015
5,014354	8,817401	3,803047	162	104	33	25	2,2314	0,863226	0,708421
5,081852	8,832919	3,751067	159	100	34	25	2,152175	0,889461	0,709431
5,246395	8,82391	3,577516	150	92	33	25	2,004911	0,863757	0,708848
5,619388	8,862684	3,243296	132	74	33	25	1,664942	0,866975	0,711379
5,664723	8,870131	3,205407	130	72	33	25	1,625949	0,8676	0,711858
5,777796	8,915872	3,138076	126	68	33	25	1,551859	0,871381	0,714837
6,550643	9,447993	2,89735	108	50	33	25	1,233532	0,914914	0,748903
7,133275	10,00219	2,868917	101	43	33	25	1,126417	0,959166	0,783334
7,25644	10,131	2,874562	100	42	33	25	1,114086	0,9693	0,791177
7,552749	10,45015	2,897402	98	40	33	25	1,092902	0,994139	0,810361
8,347363	11,29322	2,945862	93	35	33	25	1,028539	1,057898	0,859424
8,554668	11,51839	2,963723	92	34	33	25	1,017177	1,076186	0,87036
9,953826	13,058	3,104176	87	29	33	25	0,967488	1,182906	0,953782
11,02296	14,22268	3,199721	84	28	32	24	1,00471	1,224357	0,970654
11,26729	14,47087	3,203574	83	27	33	23	0,982631	1,279451	0,941493
11,80053	15,0569	3,256377	82	26	32	24	0,97607	1,273931	1,006376
13,64779	17,0583	3,410515	79	24	32	23	0,988671	1,383807	1,038037
16,22325	19,84498	3,621726	77	22	32	23	0,998774	1,505972	1,116981
18,7507	22,47897	3,728269	75	21	31	23	1,019291	1,541798	1,16718
19,74843	23,53502	3,786592	75	20	32	23	0,989817	1,61616	1,180615

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

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

M	MPF		T _p
	μm	min	max
1,041474	1,23•10 ⁻⁴	-	-
2,082948	2,90•10 ⁻⁴	-	-
2,187096	3,10•10 ⁻⁴	-	-
2,39539	3,52•10 ⁻⁴	-	-
2,603685	3,97•10 ⁻⁴	-	-
2,81198	4,45•10 ⁻⁴	-	-
3,124422	5,25•10 ⁻⁴	-	-
3,645159	6,80•10 ⁻⁴	-	-
4,165896	8,73•10 ⁻⁴	-	-
5,207371	1,42•10 ⁻³	-	-
6,248845	2,34•10 ⁻³	-	-
6,769582	3,14•10 ⁻³	-	-
6,873729	3,39•10 ⁻³	-	-
6,977876	2,99•10 ⁻⁴	5,89•10 ⁻¹	141
7,082024	3,04•10 ⁻⁴	5,89•10 ⁻¹	127
7,186171	3,11•10 ⁻⁴	5,89•10 ⁻¹	121
7,290319	3,17•10 ⁻⁴	5,89•10 ⁻¹	116
7,394466	3,22•10 ⁻⁴	5,88•10 ⁻¹	113
7,498614	3,27•10 ⁻⁴	5,89•10 ⁻¹	111
7,602761	3,34•10 ⁻⁴	5,89•10 ⁻¹	109
7,706908	3,39•10 ⁻⁴	5,88•10 ⁻¹	107
7,811056	3,47•10 ⁻⁴	5,88•10 ⁻¹	106
8,331793	3,77•10 ⁻⁴	5,88•10 ⁻¹	100
9,373267	4,46•10 ⁻⁴	5,87•10 ⁻¹	92
10,41474	5,20•10 ⁻⁴	5,87•10 ⁻¹	89
11,45622	6,02•10 ⁻⁴	5,86•10 ⁻¹	86
12,49769	6,96•10 ⁻⁴	5,82•10 ⁻¹	84
13,53916	8,00•10 ⁻⁴	5,76•10 ⁻¹	81
14,58064	9,18•10 ⁻⁴	5,73•10 ⁻¹	79
15,62211	1,04•10 ⁻³	5,72•10 ⁻¹	78
16,66359	1,18•10 ⁻³	5,72•10 ⁻¹	77
17,70506	1,34•10 ⁻³	5,72•10 ⁻¹	77
19,78801	1,77•10 ⁻³	5,72•10 ⁻¹	75
20,82948	1,92•10 ⁻³	5,72•10 ⁻¹	75

Megjegyzés: MPF - a bifurkációsváltozó, 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

10. 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.

És végül drága vőlegényemnek, aki mindig támogatott.