



Sveiczter Ákos–Horváth Anna

■ BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszék

asveiczter@mail.bme.hu

A hasadó élesztőgomba sejtciklusa

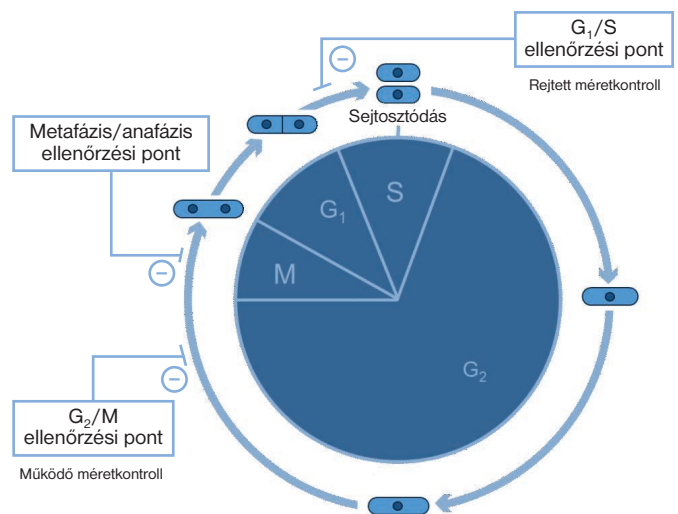
Mérések mikroszkópos filmekken, matematikai modellezés, filogenetika

Bevezetés

A BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszer-tudományi Tanszékén, illetve jogelődjén mintegy 30 éve folynak olyan kutatások, amelyek az eukarióta sejtek osztódási ciklusának jobb megértésére fókuszálnak, és amelyekben gyakran alkalmazott modellorganizmus a *Schizosaccharomyces pombe*, más néven a hasadó élesztőgomba. Az 1980-as évek közepén László Elemér Enzimológiai Kutatócsoportjából Novák Béla alakított ki igen gyümölcsöző nemzetközi együttműködést Murdoch Mitchisonnal (University of Edinburgh, Nagy-Britannia), amelynek keretében hosszú időn keresztül az élesztők sejtciklusa alatti metabolikus oszcillációkat tanulmányoztuk [1, 2]. Az 1990-es évek elején Novák Béla önálló csoportot alapított, amelyet jelentős profilbővítés után, néhány évvel később az MTA is támogatásra méltónak talált, és amely innentől Molekuláris Hálózatok Dinamikája Kutatócsoport néven működött. Ennek az 1990-es, illetve a 2000-es évek során fontos képviselőivé váltak Novák Béla felcseperedett tanítványai: Csikász-Nagy Attila, Tóth Attila, valamint jelen cikk első szerzője. A következő nagy változás 2007-ben történt, amikor Novák Béla elnyert egy professzori állást az Oxfordi Egyetemen (Nagy-Britannia), és ez onnantól fogva teljesen lekötötte szakmai kapacitását. Ugyanabban az időben a csoport más tagjai is külföldre vagy más munkahelyekre távoztak, így alapvetően Sveiczter Ákos lett a műegyetemi sejtciklus kutatások folytatóságos fenntartója. Azóta elért tudományos eredményeink a csoportban dolgozó doktoránsok (időbeli sorrendben Rácz-Mónus Anna és Horváth Anna), valamint karunk néhány BSc és MSc biomérnök hallgatójának munkáján alapulnak. Jelenlegi nevünk Sejtciklus és Genomika Kutatócsoport, az itt folyó tudományos munkát e sorok írói ketten szervezik.

A hasadó élesztő sejtnevekedésének vizsgálata mikroszkópos filmekken

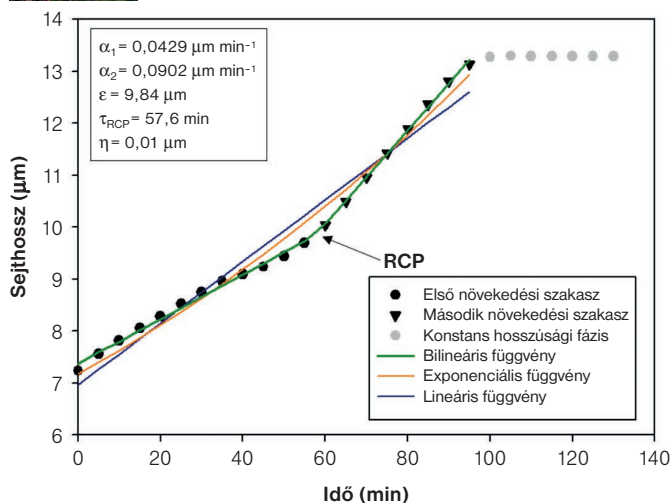
Az Edinburgh-i Egyetemen folytatott együttműködés keretében az 1990-es évek elejétől kezdtük vizsgálni a hasadó élesztőgombasejtek ciklus alatti növekedését. Az egysejtű gomba szaporodó tenyészetéről (vad típusú sejtekről, valamint különböző sejtciklus-mutánsokról) Murdoch Mitchison mikroszkópos filmeket készített, amelyeken utólag nyomon tudtuk követni az egyedi sejtek növekedését születéstől osztódásig. A lekerekedett végű henger alakú sejtek konstans átmérővel, kizárólag a sejtvégeken



1. ábra. A hasadó élesztőgomba vad típusú sejtjeinek mitózis sejtosztódási ciklusa. Az ábra jelöli a legfontosabb ellenőrzési pontokat ([14] alapján)

hosszirányban nőnek (**I. ábra**), így tömegük, térfogatuk és hosszuk egymással arányosnak tekinthető, ezért az egyszerűség kedvéért a sejtössz növekedését tanulmányoztuk az idő függvényében, az egyes sejtek születésétől az osztódásig. Filmanalíziseink során fedeztük fel az egyik mutánsban a ciklusidő megfigyelhető kvantáltságát [3, 4]. A sejtek növekedése kapcsán kezdetben alkalmaztuk azt a többé-kevésbé általánosan elfogadott hipotézist, amely szerint a hossznövekedés lineáris függvényt követ, de a ciklus egy adott pontján (az ún. sebességváltási pontban, angol mozaikszóval az RCP-nél) a növekedés felgyorsul, azaz a teljes növekedés két lineáris szegmensből álló, ún. bilineáris függvényvel írható le a legjobban. Ennek hátterében az állhat, hogy osztódás után a fiatal sejtek csak az egyik végükön (unipolárisan) növekednek, majd a hosszú G2 fázis közepe táján az addig „nyugvó” vég is bekapcsolódik a növekedésbe, így az bipolárisra válik; ezt az eseményt pedig angol rövidítésből származóan NETO (new end take off) névvel illetjük [5]. Fontos megemlíteni azt is, hogy a ciklus végén, azaz a mitózis és a sejtosztódás között a sejtek hosszirányban már nem nőnek, hanem sejtvézük az osztódás folyamatát készíti elő, illetve hajtja végre.

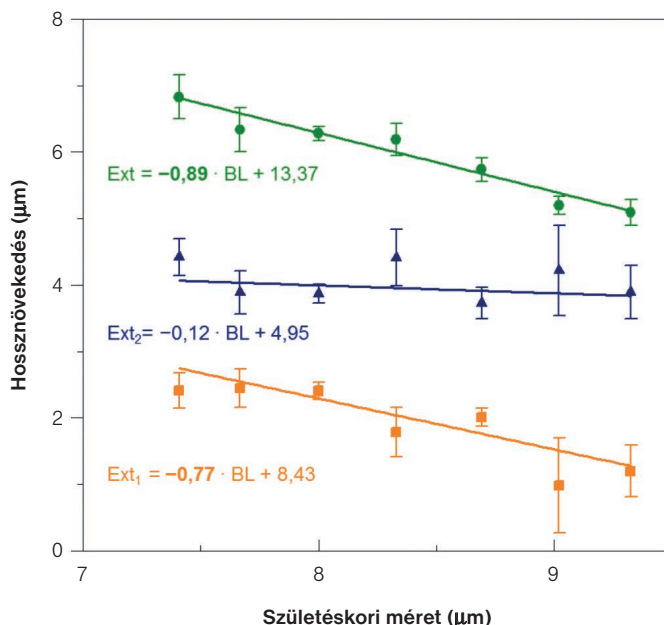
2005-től kezdődően, egy újabb nemzetközi együttműködés keretében Buchwald Péter (University of Miami, USA) segítségével



2. ábra. Egy vad típusú hasadó élesztőgomba sejthossz-növekedése a ciklus alatt. Az ábra jelöli a mérési adatokat, az illesztett függvényeket, a legadekvátabb (a konkrét esetben a bilineáris) modell paramétereit, valamint a növekedési görbe tartományait ([7] alapján)

kidolgoztunk egy matematikai eljárást arra, hogy különböző függvényeket (exponenciális, lineáris, bilineáris) illesszünk az egyes sejthossz-adatsorokra, és közülük modellszelekciós kritériumok (pl. az ún. Akaike információs kritérium, AIC) alapján válasszuk ki minden esetben a legadekvátabb függvényt [6]. Utóbbira azért van szükség, mert az alkalmazott függvények paraméterszáma eltérő: a lineárisé és az exponenciálisé 2-2, míg a bilineárisé 5. A bilineáris modellt egy folytonosan differenciálható függvény formájában írtuk fel, amely az RCP-nél nem éles törést tételez fel, hanem annak környezetében egy átmeneti tartományt, ahol a sejt fokozatosan tér át a lassabb növekedésről a gyorsabbra. Minderre bemutatunk egy konkrét sejt kapcsán egy példát is (2. ábra). Bizonyítottuk, hogy a sejtek növekedésük alapján heterogén tenyészetet alkotnak ugyan, de a bilineáris függvény gyakoriságban dominál a lineáris és exponenciális függvények fölött [7]. A tapasztalt heterogenitást részben mérési hibák is okozhatják [8]: a mikroszkópos felvételeken az optikai felbontóképesség határán található különbségeket kéne tudni igen nagy pontossággal mérni ahhoz, hogy a kapott eredményben teljesen biztosak lehessünk.

Mindezek a vizsgálatok egyrészt abban vihetik előre a sejtciklus-élettani kutatásokat, hogy a sebességváltási pontot egyértelmű kapcsolatba hozzák valamilyen sejtciklus-eseménnyel, másrészt az ún. méretkontroll mechanizmust igazolják, értelmezik, sőt a ciklusban pozicionálják is. A méretkontroll nem más, mint kompenzációs mechanizmus: az osztódási ciklus egy adott pontján csak akkor juthat át egy sejt, ha elért egy kritikus méretet [9, 10]. Ennek megfelelően a nagyobbak született sejtek kevesebbet nőnek, hogy ugyanazt a kritikus szintet elérjék, tehát a ciklus alatti növekedés negatív korrelációt mutat a születési mérettel [3]. Az RCP mint marker segítségével a növekedési szakasz két részre bontható, és regressziós analízissel vizsgálható, hogy melyekben érvényesül a negatív korreláció, azaz hol hat a méretkontroll. A vad típusú sejtek kapcsán a méretkontroll létét igazoltuk, valamint megállapítottuk, hogy az az RCP előtt hat, tehát alighanem valahol a G2 fázis közepén (3. ábra). Régóta ismert tény az is, hogy a hasadó élesztőben a G1 fázisban is létezik egy ún. rejtett méretkontroll (1. ábra), amely bizonyos kisméretű mutánsokban válik csak észlelhetővé. Legújabb eredményeink szerint pedig feltehetően a G2 fázisban két olyan esemény is talál-



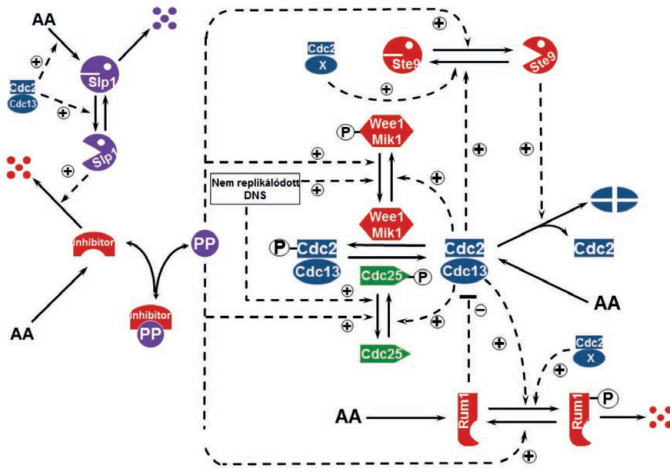
3. ábra. A hasadó élesztőgomba tenyészetében mért sejthossz-növekedés a születési méret függvényében. A teljes ciklus alatti növekedés (Ext) alatt szerepel annak felbontása is a két növekedési szakaszra (Ext₁, Ext₂). A regressziós egyenes meredekségének szignifikanciáját félkövér szedés jelzi, 0,05-es szignifikanciaszinten ([3] alapján)

ható, amelyeket a sejt méret szabályoz: az egyik a fent említett G2 közepi mechanizmus, de közvetlenül a mitózisba lépés előtt is működik még egy méretkompenzáció [11].

A sejtciklus szabályozásának leírása matematikai modellek segítségével

Az 1990-es évek elején kutatócsoportunk egy másik közös témán is elkezdett dolgozni, méghozzá John Tysonnal (Virginia Tech, USA), aki úttörőként igazolta, hogy a sejtciklus matematikai modellek segítségével is tanulmányozható [12]. A módszer lényege, hogy a sejtciklus eseményeinek végrehajtásában és regulációjában kísérletesen igazolt (vagy feltételezett) biokémiai funkcióval rendelkező fehérjéket hálózatként fogjuk fel, és a köztük lejátszódó kölcsönhatásokat a biokémiai reakciókinetika módszerével (tömeghatás-törvény, enzimkinetika) írjuk le. Az egyes komponensek sejtben belüli koncentrációjának változási sebességére közös differenciálegyenleteket (angol mozaikszóval ODE) írunk, ahol minden hatást (szintézis, degradáció, komplexképződés és -felbomlás, poszttranszlációs módosítások: foszforiláció-defoszforiláció stb.) szisztematikusan figyelembe veszünk. Ehhez előbb elkészítjük a matematikai modell egy kapcsolási rajzát (4. ábra).

A hasadó élesztő sejtciklusának legerősebben szabályozott lépése a mitózis iniciálása, amiért leginkább az ún. mitózis serkentő faktor (angol mozaikszóval MPF) felelős, ami fehérje-heterodimer: a Cdc2 és a Cdc13 proteinek komplexe [13, 14]. Az MPF ún. ciklinfüggő kináz: szubsztrátjainak foszforilálását a komplex katalitikus kináz alegysége (a Cdc2) végzi, míg a Cdc13 a regulációs alegység, egy ún. ciklin, aminek koncentrációja a sejtben periodikus ingadozást mutat, és ennek a kötődése szükséges a komplex aktiválódásához. Az ODE-rendszer megoldása számítógépes szimuláció segítségével közelítő módszerekkel történik, amihez először még a modell paramétereinek (pl. az egyenletek-

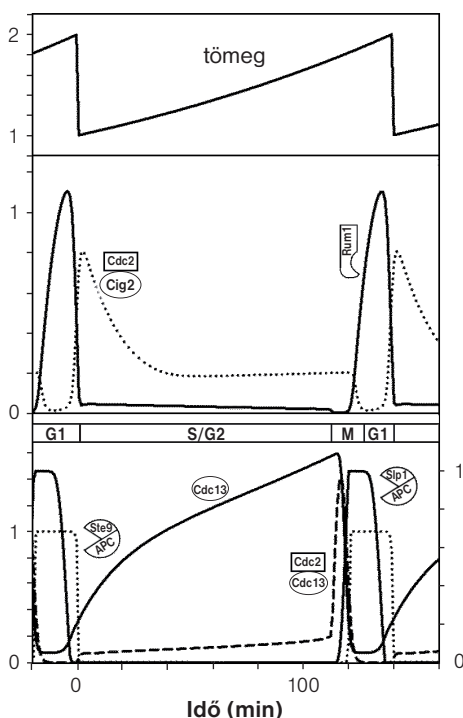


4. ábra. A hasadó élesztő sejtciklusát leíró matematikai modell kapcsolási rajza. A színes szövegdobozokban a proteinhálózat elemei és komplexeik szerepelnek, a folytonos nyilak biokémiai reakciókat jelölnek, a szaggatott vonalak pedig serkentő (+) vagy gátló (-) hatást gyakorolnak ([13] alapján)

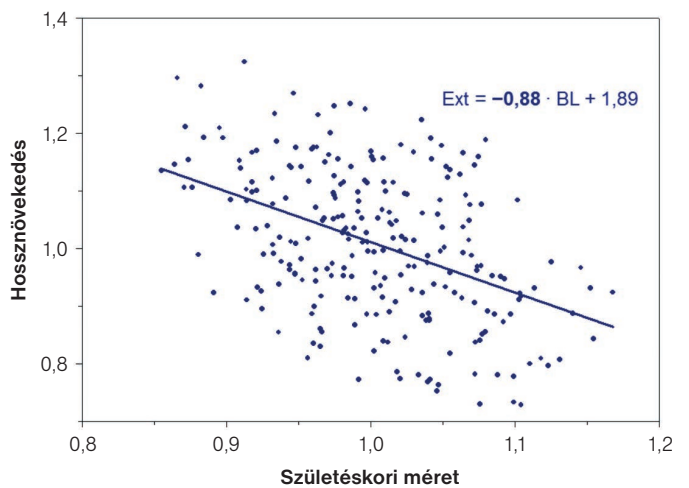
ben szereplő reakciósebességi állandóknak) a becslést kell elvégezni. Mivel kevés mérési adat áll csak rendelkezésre a reakciósebességi állandók értékei, becslésük azon alapul, hogy a szimulációs eredmények mennyire tükrözik az élesztősejtek fiziológiai viselkedését. Az alapvetően determinisztikus típusú modellek szimulációs megoldásai a steady-state tényezetek esetében mindig oszcillációk (5. ábra), ahol az egyes fehérjék koncentrációja jellegzetes profilt mutat egy cikluson belül, majd pedig az változatlan módon ismétlődik a következő ciklusban [15].

A matematikai modellezés révén lehetőségünk nyílik a sejt-ciklus szabályozásának rendszerszintű megértésére. Ennek kere-

5. ábra. A matematikai modellel kapott szimulációs eredmények vad típusú hasadó élesztő esetén. Az ábra mutatja a sejt-tömeg és néhány protein (komplex) koncentrációjának változását a ciklus alatt az idő (illetve a fázisok) függvényében ([15] alapján)



tében nemcsak a vad típusú sejtek vizsgálhatók, hanem különböző (akár többszörös) sejt-ciklus-mutációk esetében is elvégezhetőek a szimulációk. További előnye a modellnek, hogy jóslások is tehetőek vele: olyan mutációk fenotípusa is megadható elméleti síkon, amelyeket a genetikusok még elő sem állítottak. Ezáltal a kísérletes (biokémiai-genetikai) és az elméleti (szimulációs) megközelítésű kutatások kölcsönösen segíthetik egymás fejlődését. A determinisztikus modelleket sztochasztikus változók beépítésével átalakíthatjuk sztochasztikus modellekké. Az utóbbiak végzett szimulációk már nem állandósult oszcillációt adnak megoldásként, hanem az egymás utáni ciklusok szimulációi kissé eltérőek lesznek, ami a sztochasztikus paraméterek megfelelő beállítása esetén a valós sejttenyészetek variabilitását tükrözheti [13]. Az ilyen modell alkalmas lehet a méretkontroll vizsgálatára is [16]: a vad típusú sejtek esetében a szimulált sejt-populáció adataiból nagy pontossággal megkaptuk azt a negatív korrelációt a hossznövekedés és a születési méret között (6. ábra), amit saját kísérleti eredményeink mutattak (3. ábra). Jelen-



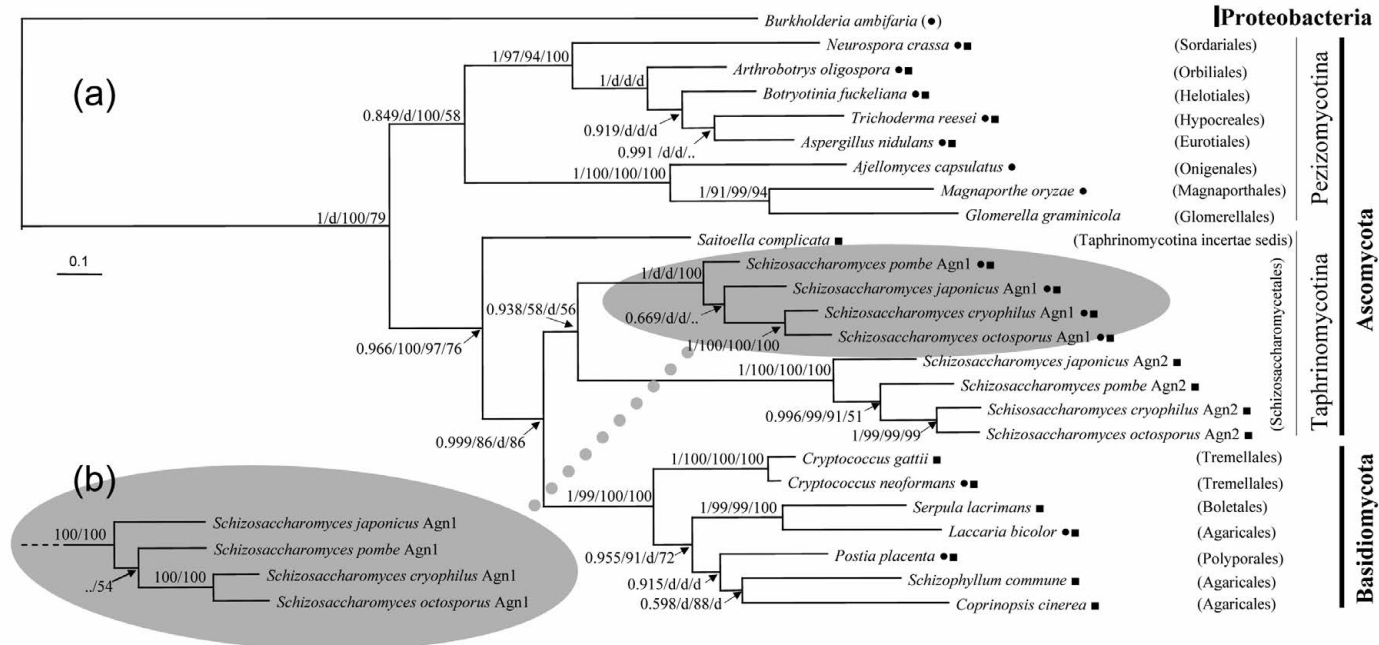
6. ábra. A hasadó élesztőgomba sztochasztikus matematikai modell segítségével szimulált tényészetében tapasztalható sejt-hossznövekedés és a születéskori méret függvényében.

A regressziós egyenes meredekségének szignifikanciáját félköves szedés jelzi, 0,05-es szignifikanciaszinten ([16] alapján)

leg olyan matematikai modellen dolgozunk, amely a G2 közepi méretkontroll működésében nemcsak az időbeli változásokat veszi figyelembe, hanem egyes fehérjék térbeli megoszlását is a sejtben. Néhány éve kiderült ugyanis, hogy az MPF szabályozásának egy közvetett negatív regulátora, az ún. Pom1 kináz a sejtvégeken koncentráldódik, és a sejt középvonala felé haladva egy jellegzetes gradiens mentén fokozatosan csökken a mennyisége. Ily módon a sejt növekedése során ez az inhibitor egyre jobban felhígul a sejt közepe táján, ahol a sejt-mag is található, és végül egy kritikus méret felett már nem tudja betölteni a mitózist gátló szerepét [17, 18].

A hasadó élesztő sejtosztódásában szerepet játszó fehérjék filogenetikája

2011-ben Sipiczki Mátyással (Debreceni Egyetem) együttműködésben a kutatócsoport profilja bővült bioinformatikai vizsgálatokkal is. Munkánk során különböző fehérjék evolúcióját próbáljuk leírni. Ehhez keressük a vizsgált fajokban (a gombavilágban, illetve a teljes élővilágban egyaránt) az adott fehérje rokonait (homológjait). A kereséseket aminosavszekvenciákkal végezzük, és



7. ábra. A hasadó élesztő Agn1 fehérjéjének és homológjainak filogenetikai fája a gombavilágban. Az ábra mutatja az egyes fajokban előforduló leghasonlóbb fehérjetalálatok rokonságát. Az egyes elágazásoknál különböző módszerekhez tartozó olyan numerikus értékek láthatók, amelyek az adott elágazás „megbízhatóságát” jellemzik ([21] alapján)

a rokon fehérjeszekvenciák további vizsgálata után filogenetikai fák (törzsfák) készítettünk, melyek az adott fehérje evolúcióját szemléltetik. Mivel a fehérjét az evolúció során eltérő hatások érik, ezért a fajok ma elfogadott evolúciójához képest nagyon eltérő képet is mutathatnak (pl. génduplikációk, génvesztések miatt), ami hozzájárul ahhoz, hogy ezen fehérjék működését, kialakulását jobban megértsük. Kezdetben kizárólag a gombák körében folytattuk vizsgálatainkat, sejtszeparációs fehérjét vizsgáltunk, melyeknek a sejtszétválás utolsó szakaszában a leánysejtek szétválásában van szerepe [19]. A gombák körében több növekedési forma is előfordul [fonális (hifás), pseudohifás, egysejtű (élesztőszerű)], melyek közt egyes fajok váltani is tudnak; ezt a jelenséget nevezzük di- vagy általánosabban polimorfizmusnak. A sejtszeparációban részt vevő fehérjék jelentősége abban rejlik, hogy egyes gombák esetében a növekedési formák közti váltás összefügg a patogenitás (fertőzőképesség) kialakulásával (pl. *Candida albicans*) [20]. A hasadó élesztő sejtjében jelenlévő α -glükán-hidrolizáló Agn1 és Agn2 (α -glukanáz) fehérjék vizsgálata során arra a meglepő megállapításra jutottunk, hogy a hasadó élesztő fehérjéi a bazídiomos gombákban található homológok közelebbi rokonai lehetnek, míg az aszkuszos gombák (ahova rendszertanilag a hasadó élesztő is tartozik) proteinjei távolabbinak tűnnek [21] (7. ábra).

A gombák sejtszeparációs fehérjéinek vizsgálatán felül az elmúlt években egyre több sejtciklus protein evolúcióját is vizsgáljuk, többek között a fentebb már említett MPF Cdc2 alegységét és az őt szabályozó kinázokat és foszfatázokat. Az evolúció során több sejtciklus-szabályozó fehérjének alakult ki háttérkópiája, a kialakulás megértéséhez pedig hozzájárulnak a filogenetikai vizsgálatok. A törzsfák aminosavszekvenciák alapján készülnek, különböző módszerekkel, melyek eltérő közelítést alkalmaznak az evolúcióra. Erre azért van szükség, mert ha ezek a módszerek egyező vagy nagyon hasonló eredményt adnak, akkor valószínűleg jól írjuk le a folyamatokat, míg ha nagyon eltérő eredményeket kapunk, akkor rossz közelítést alkalmazunk. Mivel a mai napig nincs általánosan elfogadott módszer az evolúció közelíté-

sére, ezért a kapott eredményeket célszerű kísérletekkel is megerősíteni. Ehhez a Debreceni Egyetemen fajok közti komplementációs tesztek végeznek, azaz különböző fajokból vizsít át a fehérjét kódoló génszakaszt egy hiánymutánsba, hogy meggyőződjünk arról, hogy az adott fehérje képes-e tényleg az eredeti fehérje funkciójának ellátására, azaz a hiánymutáns fenotípusa megszűnik vagy enyhül [20, 21]. A közeljövőben szeretnénk analíziseinket fehérjekrisztallográfiai vizsgálatokkal is megerősíteni, ugyanis a fehérjeszerkezet információi segíthetnek a helyes közelítést megtalálni. Ehhez tanszékünkön Vértessy Beáta kutatócsoportjával tervezünk együttműködni.

Köszönetnyilvánítás.

Kutatásainkat az OTKA (projekt azonosító: K-76229) támogatta.

IRODALOM

- [1] B. Novak, J. M. Mitchison, *J. Cell Sci.* (1986) 86, 191.
- [2] B. Novak, A. Sveiczter, J. M. Mitchison, *J. Cell Sci.* (1993) 105, 529.
- [3] A. Sveiczter, B. Novak, J. M. Mitchison, *J. Cell Sci.* (1996) 109, 2947.
- [4] A. Sveiczter, B. Novak, J. M. Mitchison, *J. Cell Sci.* (1999) 112, 1085.
- [5] J. M. Mitchison, P. Nurse, *J. Cell Sci.* (1985) 75, 357.
- [6] P. Buchwald, A. Sveiczter, *Theor. Biol. Med. Model.* (2006) 3, 16.
- [7] A. Horváth, A. Rácz-Mónus, P. Buchwald, A. Sveiczter, *FEMS Yeast Res.* (2013) 13, 635.
- [8] Á. Sveiczter, A. Horváth, P. Buchwald, *FEMS Yeast Res.* (2014) 14, 679.
- [9] P. A. Fantes, *J. Cell Sci.* (1977) 24, 51.
- [10] Á. Sveiczter, A. Rácz-Mónus, in *Encyclopedia of Systems Biology*, Springer, Heidelberg – New York 2013, 343.
- [11] A. Horváth, A. Rácz-Mónus, Á. Sveiczter, *Biol. Cell.* (2016) 108, xxx (közlésre benyújtva).
- [12] J. J. Tyson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88, 7328.
- [13] A. Sveiczter, A. Csikasz-Nagy, B. Györfy, J. J. Tyson, B. Novak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97, 7865.
- [14] Á. Sveiczter, A. Horváth, in *Encyclopedia of Systems Biology*, Springer, Heidelberg – New York 2013, 349.
- [15] A. Sveiczter, J. J. Tyson, B. Novak, *Brief. Funct. Genom. Proteom.* (2004) 2, 298.
- [16] A. Sveiczter, J. J. Tyson, B. Novak, *Biophys. Chem.* (2001) 92, 1.
- [17] S.G. Martin, M. Berthelot-Grosjean, *Nature* (2009) 459, 852.
- [18] J. B. Moseley, A. Mayeux, A. Paoletti, P. Nurse, *Nature* (2009) 459, 857.
- [19] M. Sipiczki, *FEMS Yeast Res.* (2007) 7, 761.
- [20] A. Balazs, G. Batta, I. Miklos, L. Acs-Szabo, C.R.V.D. Aldana, M. Sipiczki, *Fungal Genet. Biol.* (2012) 49, 235.
- [21] M. Sipiczki, A. Balazs, A. Monus, L. Papp, A. Horvath, A. Sveiczter, I. Miklos, *Microrobiology* (2014) 160, 1063.