

Válasz Prof. Derényi Imre opponensi véleményére

Köszönöm Derényi Imre professzor Úrnak, hogy elvállalta dolgozatom bírálását, azt alapos részletességgel végigolvasta és, hogy azt védésre alkalmasnak értékelte.

Sajnálom, hogy nem sikerült igazán jól kihasználnom a tézises dolgozat adta lehetőségeket, Ez a formátum főként 2017 előtt (amikor ez a dolgozat is készült), volt elfogadott és gyakorlott a Biológiai Osztályra benyújtott dolgozatok között. Azt hiszem, azok közül nem lóg ki rövidegével dolgozatom. Ez a formai struktúra vezetett ahhoz, hogy a kutatás magját adó modellek ismertetésére nem maradt helyem. Későbbiekben próbálkoztam, hogy a dolgozatot kicseréljem egy kibővített változatra, de erre az akadémiai szabályzat sajnos nem adott lehetőséget.

Szintén sajnálatos, hogy a többes szám első személyben leírt eredményeimből nem átlátható, hogy, mint általában egy kutató karrierje folyamán, posztdoktorként még a kutatás nagy részét magam vittem, én elemeztem az irodalmat, dolgoztam ki a modelleket és parametrizáltam azokat. Cikkekben, melyekben első szerzőként szerepelek általánosságban én vettem fel a problémát és dolgoztam ki a kutatási koncepciót. Kollaborációban zajló kutatásaink alatt ugyanezeket a feladatokat láttam el, főleg a modellek kidolgozásában az egyenletrendszerek megszerkesztésében és azok esetleges módosításaiban vettem ki a legnagyobb részt. Témavezetőként már a kutatások irányait is én szabtam meg, a pályázati források előteremtéséről is én gondoskodtam, míg a kutatás érdemi részét diákjaim végezték, folyamatos konzultáció alatt. Kísérletes együttműködéseinkben részt vettem a kísérletek megtervezésében és azok eredményeinek az értékelésében. Szinte minden cikkemben a kéziratok elkészítésekor aktív szerzőként vettem részt.

A három tézispont mindegyike saját eredményen alapszik. A sejtciklus visszacsatolási és előreccatolási hurkainak vizsgálatát első és utolsó szerzős cikkeim tartalmazzák, a sejtnövekedés és sejtosztódás kapcsolatának eredményei szintén utolsó szerzős cikkekből, vagy pedig olyanokból állnak, ahol a kísérletes együttműködő partner lett utolsó szerző, míg én az elméleti rész témavezetőjeként valamelyik utolsóelőtti szerzői pozícióba kerültem. Ez a szokásos formátum biológiai együttműködésekénél. Megfigyelhető, hogy ugyanezen kollégák utolsóelőtti szerzők az általam utolsó szerzőként jegyzett inkább elméleti, kevésbé kísérletes kollaboratív munkákon. A napi ritmus és sejtciklus kapcsolatának eredményei csakis utolsó szerzős munkákon alapulnak. Ezek közül egy tartalmaz kísérleteket, amelyeket az első szerző végzett a kettőnk által kidolgozott stratégia alapján.

Valóban a dolgozat részét képező publikációk apró betűsek és az eredeti cikkek mellékleteit sem tartalmazza. A bíráló ezért nem találta meg az általa keresett egyenleteket, mert azok az említett cikk mellékletében, és az ahhoz tartozó honlapon (http://mpf.biol.vt.edu/research/generic_model/main/pp/) részletesen ismertetettek.

Korábbi témavezetőim ezt megelőző munkáiban hasonló struktúrájú, de részleteiben eltérő modelleket alkalmaztak.

Sajnálom, hogy a többször is átnézett helyesírással tovább bosszantottam a bírálót.

Az opponensi kérdésekre, megjegyzésekre az alábbiakban válaszolnék:

1. A modellek újdonságai a leginkább biológiailag értelmezhetőek. Dolgozatomat pontosan ezen okból nyújtottam be az MTA Biológiai osztályára. A vizsgált biológiai rendszerekben általunk meghatározott dinamikai viselkedések és a modellek vizsgálata alapján meghatározott szabályozási hálózatok a fő újdonságok. Ezeket korábbi munkáinkban modellel bizonyított predikcióként közöltük. Témavezetésemmel született munkák folyamán kísérletes partnerekkel együttműködve a modellek által igazolt hipotéziseket kísérletesen bizonyítottuk. Munkámban főként reakciókinetikai módszereket alkalmaztam különböző biológiai rendszerek vizsgálatára. Új fizikai, vagy modellezési módszertani újítást nem igazán fejlesztettünk a dolgozat tárgyát képező munkáinkban. Azóta ez változott és nagyobb hálózatok szimulációira új megközelítéseket dolgoztunk ki (Rizzetto és mtsai.2015).
2. A bíráló által tett megállapítás teljesen igaz. A biológiai modellek paramétereinek az identifikálhatóságának igen nagy irodalma van, amelyben leírták, hogy igen sok paraméter értékét nem tudjuk pontosan becsülni a rendelkezésre álló kísérleti eredmények alapján (Chis és mtsai. 2011). A rendszerbiológiai modellek általános tulajdonsága, hogy a paraméterek nagy részére a viselkedés kevésbé érzékeny, míg egy kevés paraméterre nagyon érzékeny tud lenni (Gutenkunst és mtsai. 2007). Ezek az utóbbiak azok melyeket pontosan meg tudtunk becsülni. A legtöbb esetben a paraméterek kis százaléka mérhető (pl. fehérjék lebomlási sebessége). A leggyakoribb módszer a változók időlefutásainak mérése és az így felvett dinamikai viselkedéshez igazítás alapján a paraméterek optimalizációja.
3. Több modell alapú hipotézisünk nyert kísérletes bizonyítást. Ezek közül néhányat kollaborációban közösen publikáltunk:
 - Bajpai és mtsai. 2009: Modellünk megmutatta, hogy a hasadó élesztő sejtosztódását szabályozó hálózat kulcsfehérjéje a Cdc11 különböző módon kell, hogy szabályozódjon a Cdk és a Sid2 molekulák által. Kísérletesen megmutattuk, hogy más foszforilációs helyen módosítja a Cdc11-et a két említett molekula.
 - Vaggi és mtsai. 2012: Hálózatelemzési módszerünkkel azt jósoltuk, hogy az Sts5 fehérje összekapcsolja a sejtciklust és a sejtpolarizáció szabályozásával hasadó élesztőben. Kísérletesen megmutattuk, hogy az Sts5 korábban igazolt sejtpolarizációt szabályozó hatása mellett a fehérje lokalizációja sejtciklus szabályozott. Később mások részletesebben is felderítették ezt a kapcsolatot (Nunez és mtsai. 2016).
 - Dodgson és mtsai. 2013: Modellünkkel azt jósoltuk, hogy a Tea1 molekula multimerizációja felelős azért, hogy a az pontszerű klaszterekben figyelhető meg

a sejtek végein és nem az, hogy a mikrotubulusok szállítják azt oda. Kísérletesen megmutattuk, hogy egy trimerizációs régió deléciójával megszűnik a fehérjék pontszerű lokalizációja, míg a mikrotubulusok növekedésének gátlására ez nem történik meg.

- Hong és mtsai. 2015: A cikk mellékletében szereplő modellünk alapján azt jósoltuk, hogy a *Neurospora crassa* fonalas gomba sejtmagjai a napi ritmus által szabályozottan lépnek mitózisba. Még ha a sejtciklusuk rövidebb is, mint 24 óra, a mitózisok eloszlása napi ritmus szerinti szabályozást kell, hogy mutasson. Mindezt kísérletesen igazoltuk is.

Nem saját cikkben igazolt modell alapú hipotéziseink:

- Chen és mtsai. 2004: A modellünkkel 131 mutáns élesztő törzs viselkedését szimuláltuk. 122 esetben ez sikeres volt, a maradék 9 eset, mind a hálózat egy részéhez kapcsolódott. Egy új foszfatáz (a modellben PPX) jelenlétét feltételeztük és ezzel a kiegészítéssel már igazítani tudtuk a modellt az összes szimulált kísérlethez. Queralt és mtsai 2006-ban megmutatták, hogy a PP2A CDC55 foszfatáz a feltételezésünknek megfelelő dinamikát mutat. Annyi eltérést tapasztaltak, hogy nem közvetlenül az általunk feltételezett gátló fehérje gátolja a foszfatázt, hanem egy azáltal gátolt aktivátor aktiválja a foszfatázt.
- Novák és mtsai. 2007: A sejtciklus átmeneteinek irreverzibilitásáért modelljeink alapján felelős regulációs hálózatokat írtunk le. Ezek közül az egyiket López-Avilés és mtsai. 2009-ben azonosították.
- Csikász-Nagy és mtsai. 2008: Reakciódiffúziós térbeli modellünkkel azt jósoltuk, hogy a hasadó élesztő sejtek egy Turing mintázatnak megfelelően három végen is tudnak nőni. Ilyen sejteket Casagetti és mtsai fedeztek fel cikkünk bírálata alatt és publikáltak még 2007-ben.
- Csikász-Nagy és mtsai 2009: A modelljeink és bioinformatikai analízisünk alapján feltételezett sejtciklus szabályzásában fontos motívumként megjelenő előreccsitolási hurkok közül többet is valósnak talált Kaizu és mtsai (2010) analízise.

Az itt hivatkozott cikkek közül néhányat és ezen kívül más munkákat is, melyek modelljeimet alapul veszik a dolgozathoz csatolt hivatkozások szövegkörnyezeti kiemelése részben is bemutattam.

4. Multiplikatív zajt a sejtciklus és a napi ritmus kapcsoltságának vizsgálatakor írtunk fel a sejtciklus modellváltozóinak a viselkedésére. Mélyebb fizikusi előképzettség híján, ezzel mások korábbi munkáját követtük (Steuer 2004, Rao és mtsai 2002), hogy a sejtciklusok periódusának eloszlását becsülni tudjuk anélkül, hogy a rendszer átlagos viselkedését megzavarnánk. Minden x_i változóra vonatkozó differenciálegyenletet átírtuk a következő formára:

$$\frac{dx_i}{dt} = f_i[\dots] + g(x_i)\xi_i(t),$$

ahol $f_i[.]$ az eredeti determinisztikus egyenletet jelöli, és $\xi_i(t)$ pedig Gauss eloszlású fehér zajt jelöl. Ezt egy Wiener folyamatnak feltételezve a zaj eloszlásának a várható értéke nulla és ahogy a bíráló írja, a zaj autókorrelációjának a koefficiense egységnyi:

$$\langle \xi(t) \rangle = 0, \quad \langle \xi(t)\xi(t') \rangle = \delta(t - t')$$

Az eredeti angol szöveg valóbban nem volt egyértelmű.

A $g(x)$ függvényre feltételeztük, hogy a relatív fluktuációk a koncentrációk inverzének négyzetgyökével arányos:

$$\frac{g(x_i)}{x_i} \sim \frac{1}{\sqrt{x_i}} \rightarrow g(x_i) = \sqrt{2D_i x_i},$$

Az itt megjelenő D együttható adja a zaj amplitúdóját, amelyet kísérleti eredmények híján minden változóra azonosnak vettünk.

Végezetül megköszönöm Derényi professzor Úr részletekbe menő kérdéseit, és remélem, hogy azokra adott válaszaimat elfogadhatónak fogja találni.

Budapest, 2018. március 19.



Csikász-Nagy Attila

Hivatkozott irodalom:

Bajpai A., Feoktistova A., Chen JS., McCollum D., Sato M., Carazo-Salas RE., Gould KL., Csikász-Nagy A. (2013) Dynamics of SIN Asymmetry Establishment. PLOS Computational Biology 9(7):e1003147

Castagnetti, S., Novák, B., & Nurse, P. (2007). Microtubules offset growth site from the cell centre in fission yeast. Journal of cell science, 120(13), 2205-2213.

Chen KC., Calzone L., Csikász-Nagy A., Cross FR., Novak B., Tyson JJ. (2004) Integrative Analysis of Cell Cycle Control in Budding Yeast. Mol Biol Cell 15, 3841-3862.

Chis, O. T., Banga, J. R., & Balsa-Canto, E. (2011). Structural identifiability of systems biology models: a critical comparison of methods. PLoS ONE, 6(11), e27755.

Csikász-Nagy, A., Gyórfy, B., Alt, W., Tyson, J.J. & Novák, B., (2008) Spatial controls for growth zone formation during the fission yeast cell cycle. Yeast, 25: 59–69.

Csikász-Nagy A., Kapuy O., Toth A., Pal C., Jensen, L.J. Uhlmann, F. Tyson, J.J. & Novák B. (2009) Cell cycle regulation by feed-forward loops coupling transcription and phosphorylation. Mol Sys Biol 5:236

Dodgson J., Chessel A., Yamamoto M., Vaggi F., Cox S., Rosten E., Albrecht D., Geymonat M., Csikász-Nagy A., Sato M., Carazo-Salas RE. (2013) Spatial segregation of polarity factors into distinct cortical clusters is required for cell polarity control. *Nature Communications* 4:1834

Ferrezuelo F., Colomina N., Palmisano A., Garí E., Gallego C., Csikász-Nagy A. & Aldea M. (2012) The critical size is set at a single-cell level by growth rate to attain homeostasis and adaptation. *Nature Communications* 3:1012

Gutenkunst RN, Waterfall JJ, Casey FP, Brown KS, Myers CR and Sethna JP (2007) Universally sloppy parameter sensitivities in systems biology models. *PLoS Comput Biol* 3: e189

Hong Cl., Zámorszky J., Baek M., Labiscsak L., Ju K., Lee H., Larrondo LF., Goity A., Chong HS., Belden WJ., Csikász-Nagy A. (2014) Circadian Rhythms Synchronize Mitosis in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(4):1397-402

Kaizu K, Ghosh S, Matsuoka Y, Moriya H, Shimizu-Yoshida Y and Kitano H (2010) A comprehensive molecular interaction map of the budding yeast cell cycle. *Molecular Systems Biology* 6: 415

López-Avilés S, Kapuy O, Novák B and Uhlmann F (2009) Irreversibility of mitotic exit is the consequence of systems-level feedback. *Nature* 459: 592-95

Novák B., Tyson JJ., Gyórfy B. & Csikász-Nagy A. (2007) Irreversible cell cycle transitions due to systems-level feedback. *Nat Cell Biol*, 9, 724 – 728

Nunez I, Pino MR, Wiley DJ, Das ME, Chen C, Goshima T, Kume K, Hirata D, Toda T and Verde F (2016) Spatial control of translation repression and polarized growth by conserved NDR kinase Orb6 and RNA-binding protein Sts5. *eLife* 5: e14216

Queralt, E., Lehane, C., Novak, B., & Uhlmann, F. (2006). Downregulation of PP2A Cdc55 phosphatase by separase initiates mitotic exit in budding yeast. *Cell*, 125(4), 719-732.

Rao, C. V., Wolf, D. M., & Arkin, A. P. (2002). Control, exploitation and tolerance of intracellular noise. *Nature*, 420(6912), 231.

Rizzetto S., Priami C., Csikász-Nagy A. (2015) Qualitative and Quantitative Protein Complex Prediction Through Proteome-Wide Simulations. *PLoS Comput Biol*. 11(10):e1004424.

Steuer, R. (2004). Effects of stochasticity in models of the cell cycle: from quantized cycle times to noise-induced oscillations. *Journal of theoretical biology*, 228(3), 293-301.

Vaggi F., Dodgson J., Bajpai A., Chessel A., Jordan F., Sato M., Carazo-Salas RE., Csikász-Nagy A. (2012) Linkers of cell polarity and cell cycle regulation in the fission yeast protein interaction network. *PLoS Computational Biology* 8(10): e1002732