A *gap* gének vizsgálata kísérletes és hálózatos módszerekkel

Doktori értekezés

Gyurkó Márton Dávid

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezetők: Prof. Csermely Péter, D.Sc., egyetemi tanár
Dr. Sőti Csaba, D.Sc., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Barna János, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Cserző Miklós, Ph.D., tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vásárhelyi Barna, D.Sc., egyetemi docens
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Miklós István, Ph.D., tudományos munkatárs

Budapest
2015

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék 1

2. Rövidítések jegyzéke 3

3. Bevezetés

3.1. Általános áttekintés 6

3.2. A *gap* gének és fehérjéik bemutatása 9

3.3. A tanulás és memória fontosabb jelpályáinak kapcsolatai a Ras/MAPK jelpályával 12

3.4. A Ras/MAPK jelpálya patológiai és farmakológiai vonatkozásai 16

3.5. A *C. elegans* fonálféreg, mint modellrendszer 17

3.6. A tanulás és memória *C. elegans*-ban 19

3.7. Rendszerbiológiai megközelítés, molekuláris hálózatok 21

4. Célkitűzések 24

5. Módszerek

5.1. Kísérletes módszerek

5.1.1. Törzsek és anyagok 25

5.1.2. Kemotaxis teszt 25

5.1.3. Motilitási teszt 27

5.1.4. A tanulás és rövid távú asszociatív memória tesztje 27

5.1.5. A hosszú távú asszociatív memória tesztje 28

5.1.6. Transzgén *gap-1(ga133);sur-5::mDsRed* állatok létrehozása 29

5.1.7. RNS interferencia kísérletek 29

5.2. Bioinformatikai módszerek

5.2.1. A ComPPI adatbázis létrehozásához használt eszközök 29

5.2.2. A RasGAPok jelátvitelének, valamint a tanulás és memória főbb jelpályáinak hálózatos integrációja 30

5.2.3. Statisztikai elemzés, grafikonok és ábrák készítése 32

6. Eredmények

6.1. A *gap* mutánsok fenotipizálása

6.1.1. A *gap* funkcióvesztés hatása a *C. elegans* kemotaxisára 34

6.1.2. A *gap* mutációk nem befolyásolják a férgek mozgását 36
6.1.3. A RasGAPok komplex együttműködése szükséges a tanuláshoz és a rövid távú asszociatív memória kialakulásához 38
6.1.4. **A** RasGAPok szerepet játszanak a hosszú távú memória kialakulásában 41
6.1.5. A *gap* gének szerepeinek validálása géncsendesítéssel és mentett vonalakkal 43
6.1.6. A *let-60* gén szükséges a megfigyelt funkcióvesztő *gap* fenotípusokhoz 45
6.2. ComPPI, a kompartmentalizált fehérje-fehérje interakciós adatbázis
6.2.1. Adatintegráció 46
6.2.2. Felhasználóbarát keresés a keresőrendszerrel 51
6.2.3. Letölthető adatkészletek 54
6.2.4. A RasGAPok szomszédsági hálózata a ComPPI-ban 55
6.3. A RasGAPok lehetséges jelátvitelének hálózata
6.3.1. A Ras/MAPK, IP_3/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI_3K jelpályák és a Ca^{2+} jelátvitelének hálózata 58
6.3.2. A Ras/MAPK jelpályát célzó gyógyszerek 60
7. Megbeszélés 62
8. Következtetések 71
9. Összefoglalás 72
10. Summary 73
11. Irodalomjegyzék 74
12. Saját publikációk jegyzéke
12.1. A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények 93
12.2. A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények 93
13. Köszönetnyilvánítás 94
14. Ábrák és táblázatok jegyzéke
14.1. Ábrák 96
14.2. Táblázatok 97

2. Rövidítések jegyzéke

ADCY1	Adenilát-cikláz 1
AMPA	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav
AMPAR	2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav receptor
APP	Amiloid-β-A4 prekurzor fehérje
ATP2A2	ATPáz 2 A2
BDNF	Agyi eredetű neurotróp faktor
BRAF	Szerin/treonin fehérje kináz B-Raf
C2	Conserved 2 (domén)
CALM	Kalmodulin
CaMKII	Kalcium/kalmodulin függő fehérje kináz II
cAMP	Ciklikus adenozin-monofoszfát
CAPRI	Ras GTPáz aktiváló fehérje-szerű fehérje 2
CBP	CREB-kötő fehérje (CREB-binding fehérje)
ComPPI	Kompartmentalizált fehérje-fehérje interakciós (adatbázis/szoftver)
CREB	cAMP reszponzív elemet kötő fehérje
CSS	Cascading Style Sheets
CSV	Comma Separated Value
CTX	Kemotaxis (puffer vagy lemez)
DAG	Diacil-glicerol
ERBB	Humán epidermális növekedési faktor receptor
ERK	Extracelluláris szignál-regulált kináz
FAS	Fas receptor
FLR	Fenilalanin-leucin-arginin (motívum)
GAP	GTPáz aktiváló fehérje
GDP	Guanozin-difoszfát
GEF	Guanin nukleotid kicserélő faktor
GFR	Növekedési faktor receptor
GIMP	GNU Image Manipulating Program
GTP	Guanozin-trifoszfát
GPA-1	Guanin-nukleotid kötő fehérje, α-1 alegység

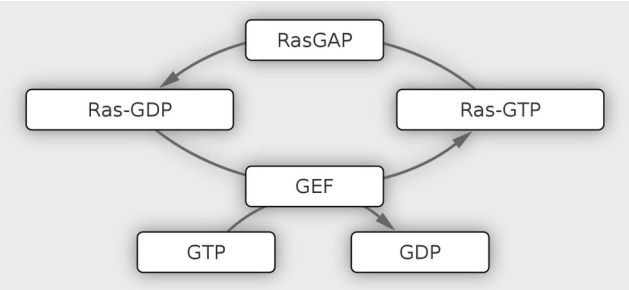
GPC-1	Glypikán-1
GPCR	G-fehérjéhez kapcsolt receptor
GRB2	Növekedési faktor receptorhoz kötött fehérje 2
GRF1	Guanin nukleotid felszabadító faktor 1
HRAS	Harvey rat sarcoma fehérje
HTML	Hypertext Markup Language
HTT	Huntingtin (fehérje)
IGF-1	Inzulinszerű növekedési faktor 1
IP_3	Inozitol-(1,4,5)-triszfoszfát
IP_3R	Inozitol-(1,4,5)-triszfoszfát receptor
IPO7	Importin-7
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KRAS	Kirsten rat sarcoma fehérje
LET-60	Lethal-60 (fehérje)
LTP	Hosszú távú potenciáció (long term potentiation)
MAPK	Ras/mitogén aktivált fehérje kináz
MAP2K	Mitogén aktivált fehérje kináz kináz
MAP3K	Mitogén aktivált fehérje kináz kináz kináz (RAF)
NGM	Nematode Growth Medium (*C. elegans* tenyésztőfolyadék/táptalaj)
NMDA	N-metil-D-aszpartát
NMDAR	N-metil-D-aszpartát receptor
NF1	Neurofibromin 1
NFI	I-es típusú neurofibromatózis
NRAS	Neuroblasztóma rat sarcoma fehérje
NTRK1	I-es típusú neurotróp tirozin-kináz receptor
OCR-1	Szaglóreceptor csatorna 1 fehérje
OCR-2	Szaglóreceptor csatorna 2 fehérje
OP50	*E. coli* OP50 törzs
OSM-9	Szaglóreceptor csatorna 9 fehérje
p120rasGAP	Ras p21 fehérje aktivátor 1
PDGFR	Vérlemezke eredetű növekedési receptor
PH	Plextrin homológia (domén)
PHP	Hypertext Preprocessor programnyelv

PI_3K	Foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát-3-kináz
PKA	Protein kináz A
PKC	Protein kináz C
PLCb	Foszfolipáz C β
PLN	Foszfolambán
PP1c	Szerin/treonin fehérje foszfatáz γ katalitikus alegység
PSD	Posztszinaptikus denzitás
PSD-95	Posztszinaptikus denzitás fehérje 95
PTPN11	11-es típusú fehérje tirozin foszfatáz
RAF1	Raf proto-onkogén szerin/treonin kináz
RAP	Rap GTPáz kötő fehérje
Ras	Rat sarcoma (fehérje)
Ras/MAPK	Ras/mitogén aktivált fehérje kináz
RASA	Ras GTPáz aktiváló fehérje
RASAL	Ras GTPáz aktiváló fehérje-szerű fehérje
RNSi	RNS interferencia
RSK2	90 kDa riboszomális fehérje S6 kináz 2
RTK	Receptor tirozin kináz
SEM-5	Sex muscle abnormal fehérje 5
SH2	Src homológia domén 2
SH3	Src homológia domén 3
SHOC2	Leucingazdag repeat fehérje 2
SOS-1	Son of sevenless 1
SPRED1	Sprouty-related fehérje 1
SQL	Structured Query Language
SynGAP	Szinaptikus GTPáz aktiváló fehérje
TRPV	Transient receptor potential cation channel, V alcsalád, 6-os tag
UCHL1	Ubikvitin karboxi-terminális hidroláz L1
VEGFR	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor

3. Bevezetés

3.1. Általános áttekintés

A tanulási képesség és memóriafunkciók romlásával járó neurokognitív kórképek, valamint a tumoros megbetegedések világszerte az egyénre és társadalomra legnagyobb terhet rovó patológiás állapotok közé tartoznak. Mindkét klinikai terület molekuláris hátteréről hatalmas tudásanyag áll rendelkezésre, az átfedésükről azonban viszonylag keveset tudunk. E metszetben találjuk a GTPáz aktiváló fehérjéket (GAPok). A fehérjecsalád tagjai a G-fehérjék intrinzik guanin-foszfatáz aktivitását fokozzák (Trahey és McCormick, 1987; Bernards, 2003). A RasGAP fehérjék a kis GTPázok családjába tartozó Rat sarcoma fehérje (Ras) specifikus GTPáz aktiváló fehérjéi (Harvey, 1964; Malumbres és Barbacid, 2003). A monomer kis G-fehérje Ras az intracelluláris jelátvitel egy központi molekuláris kapcsolója: inaktív állapotban a purin nukleotid guanozin-difoszfátot (GDP) köti, melyet azonban a guanozin-kicserélő faktorok (GEFek) hatására GTP-re tud cserélni (Bourne és mtsai, 1990, Tocque és mtsai, 1997). A Ras jelátvitele mindaddig aktív marad, míg a fehérje alacsony intrinsic GTPáz aktivitásával a GTP-t GDP-re és foszfátcsoportra bontja. A RasGAPok ezen hidrolízist gyorsítják fel, tehát a Ras jelátvitelének aktivitását a GEFek serkentő és a GAPok gátló hatásának egyensúlya szabályozza (1. ábra).



1. ábra. A RasGAPok és GEFek szerepe sematikusan a Ras szabályzásában.
A RasGAPok a Ras intrinsic GTPáz aktivitását fokozzák, míg a GEFek a GDP GTP-re való cseréjét segítik.

A RasGAP család tanulásban és memóriában legismertebb tagja a humán SynGAP fehérje. Az agyi serkentő szinapszisokban gazdagon előforduló fehérje az N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptorok, valamint a kalcium/kalmodulin kináz II (CaMKII) aktiválódására terjed szét a szinapszisban (Araki és mtsai, 2015). E szétterjedéshez az szükséges, hogy a CaMKII foszforilálja a SynGAPot, mely így aktiválódva képes a szinaptikus Ras-hoz kötődni. A szétterjedés mértéke arányos a szinapszis méretének változásával is. A SynGAP aktiválódása tehát kulcselemként köti össze a CaMKII aktivitást és a kis G-fehérjék által indukált szinaptikus méretnövekedést, AMPA receptor kihelyeződést és szinaptikus potenciációt.

A RasGAPok szerepére tanulásban és memóriában közvetetten a Ras/MAPK jelpálya csíravonali mutációi által okozott kórképek, az úgynevezett Rasopátiák is fényt derítenek (Tidyman és Rauen, 2010; Rauen, 2013). Az egyik leggyakoribb, mintegy minden kétezredik magzatot érintő szindróma az I-es típusú neurofibromatózis (von Recklinghausen betegség), melyet a GAPokat kódoló gének családjába tartozó *neurofibromin 1* (*NF1*) mutációja okoz. Az érintett betegek több, mint felének tanulási nehézségei vannak, illetve jellemzőek a bőrelváltozások és a tumorokra, főképp idegrendszeri neopláziákra való hajlam is.

Emberre vonatkozó felfedezések gyakorta erednek adott esetben kevésbé bonyolult modellorganizmusokból. A *Rattus norvegicus* patkány, *Mus musculus* egér, *Drosophila melanogaster* gyümölcslégy, *Danio rerio* zebrahal és *Caenorhabditis elegans* fonálféreg egyaránt bevált modellállatok a tanulás és memória molekuláris mechanizmusainak kutatásában. A RasGAPok vonatkozásában patkány hippokampusz dendritikus nyúlványaiban a *neurofibromin 1*-et a Ras inaktiválódásával társították (Oliveira és Yasuda, 2014). Egérben a heterozigóta *syngap* mutáns törzs hippokampuszában a hosszú távú potenciáció (long term potentiation, LTP) zavarát figyelték meg, míg a homozigóta *syngap* mutáció posztnatálisan letális (Kim és mtsai, 2003). Gyümölcslégyben a *neurofibromin 1* null mutánsok életképesek ugyan, de kis termetűek, neuropeptid-jelátvitelük és cirkaradián ritmusuk rendellenes (Bernards, 2003), valamint tanulási defektus is jellemzi őket (Guo és mtsai, 2000; Costa és mtsai, 2002). Zebrahalban is a neurofibromatózis modelljei állnak a kutatások középpontjában, ezek kapcsán derült fény az *NF1* mutánsok tanulási defektusára (Shin és mtsai, 2012).

Fonálféregben a *gap* géneket tanulással és memóriával eddig egyáltalán nem hozták kapcsolatba.

A *C. elegans* ugyanakkor több szempontból is előnyös modellrendszer. A tanulással és memóriával kapcsolatos fenotípusok vizsgálatát számos viselkedésbiológiai módszer szolgálja (Ardiel és Rankin, 2010), valamint gazdag molekuláris biológiai eszköztár is rendelkezésre áll. A rövid generációs idő a vizsgálatok időszükségletét csökkenti, a nagy utódszám a statisztikai megbízhatóságot javítja.

A RasGAPok jelátvitelének megértése *C. elegans*-ban egyúttal több kihívással is kecsegtet. Más modellrendszerekben született eredmények alapján feltételezhető a Ras/MAPK jelpálya szerepe, mely azonban központi mivolta révén számos jelátviteli úttal állhat eddig tisztázatlan, vagy nem triviális kapcsolatban. E komplexitás megközelítésében hasznos eszközökkel szolgál a hálózattudomány (Csermely és mtsai, 2013; Gyurkó és mtsai, 2013), mellyel intuitív módon is megérthetővé válhat a megfigyelt fenotípusokat potenciálisan magyarázó molekuláris jelpályák gazdag rendszere. Szintén kihívás, hogy *C. elegans*-ban előzetes vizsgálataim alapján a jelátviteli utak feltérképezettsége lényegesen alacsonyabb például a legtanulmányozottabb emberi jelátvitelhez képest. A tanulás, a memória jelpályái és a Ras/MAPK jelpálya azonban jellemzően konzervált jelátviteli útvonalak, ezért a hálózattudomány és bioinformatika ismét segítségül hívható: a fonálféregben hiányos jelátvitel kiegészíthető a humán jelátvitel elemeivel, mintha csak egy hiányos kép elemeit rekonstruálnánk egy teljesebb kép motívumai alapján. Az így kapott jelátvitel természetesen nem feltétlenül egyezik meg a biológiai valósággal, azonban jó iránymutatást jelent további, célzott kísérletekhez. Szintén kihívás a jelátviteli adatok adatbázisokban való szétosztottsága, valamint a számos eltérő nevezéktan, vagyis az azonos molekulákra, biológiai folyamatokra különféle nevekkel való hivatkozás. Ezekre a nagy léptékű adatintegráció a válasz, vagyis a források szintetizált, azonos nevezéktan szerinti egységesítése, mely bevett rendszerbiológiai és gyógyszerkutatási megoldás.

Doktori munkám során a fentiek alapján a *gap* géneket kísérletesen *C. elegans* fonálféregben, mint modellrendszerben vizsgáltam, az eredményeket pedig

bioinformatikai és rendszerbiológiai megközelítéssel helyeztem élettani, patológiai és klinikai kontextusba.

3.2. A *gap* gének és fehérjéik bemutatása

A *gap* gének filogenetikai fája széles, megtalálhatóak többek között *C. elegans* fonálféregben, *M. musculus* egérben, *R. norvegicus* patkányban, *C. lupus* kutyában, valamint emberben is (Steták és mtsai, 2008). A fonálféreg azonban az egyetlen jelenleg ismert organizmus, melyben nem csupán a három leírt *gap* gén egyszeres mutánsai, de a tetszőlegesen kombinált kettős mutánsok is életképesek.

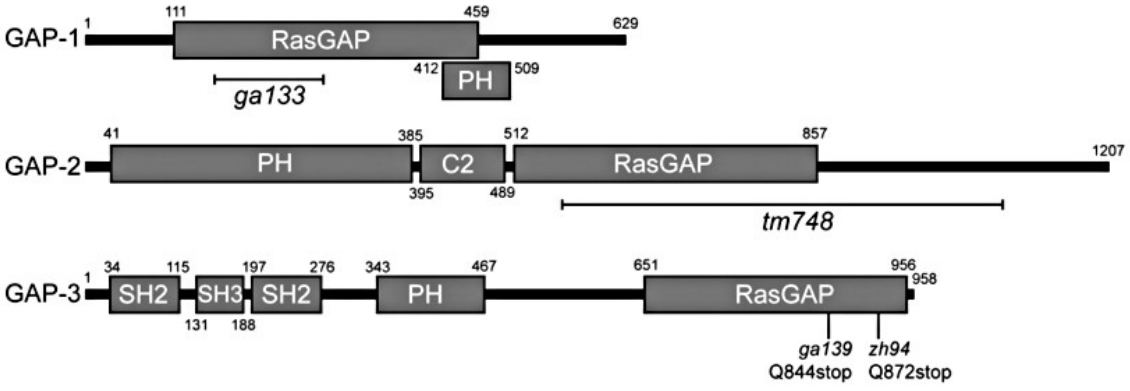
1. táblázat. A *C. elegans gap* gének humán ortológjai, valamint a közöttük fennálló szekvenciahasonlóság az NCBI nucleotide blast eszközének BLASTn algoritmusa alapján (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

C. elegans (Entrez Gene ID)	BLASTn hasonlóság	*H. sapiens* (Entrez Gene ID)
gap-1 (180530)	87%	*rasa3* (22821)
gap-2 (181172)	79%	*rasa2* (5922)
gap-3 (260016)	90%	*rasa1* (5921)

A géncsalád elsőként jellemzett tagja fonálféregben a *gap-1* gén volt (Hajnal és mtsai, 1997), fehérjéje a LET-60 Ras/MPK-1 MAP kináz jelpálya negatív szabályozója vulvális fejlődésben. A *gap-2* gén felfedezésére hasonlóképp a LET-60 Ras negatív regulátoraként, azonban a férgek kiválasztócsövének fejlődésével kapcsolatban került sor (Hayashizaki és mtsai, 1998). A *gap-3* azonosítása szintén a LET-60 Ras jelátvitelének vizsgálata során történt meg (Steták és mtsai, 2008), fehérjéje a p120rasGAP család egyetlen *C. elegans*-ban ismert tagja. A *gap-1* és *gap-2* gén az X kromoszómán, a *gap-3* gén az I-es kromoszómán helyezkedik el. A *C. elegans gap* gének humán ortológjait az 1. táblázat mutatja be.

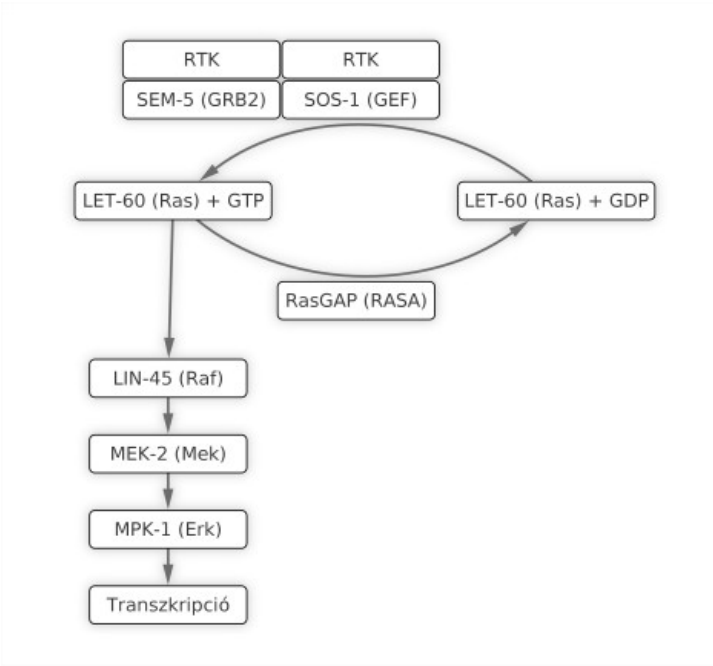
A GAP fehérjék közös vonása a C terminális felőli RasGAP katalitikus régió, mely az enzimfunkcióért felel (2. ábra). Emellett mindegyik GAP fehérjeben található egy plextrin homológia (PH) domén is, a fehérje ezen része a plazmamembrán foszfatidilinozitol lipidjeinek, elsősorban a foszfatidilinozitol-3-kináz (PI_3K)

termékeinek megkötését szolgálja. A GAP-2 tartalmaz egy C2 (conserved 2) domént is, mely a Ca^{2+}-kötő képessége mellett a plazmamembránnal való interakciót is segíti. A GAP-3-ban két Src homológia 2 (SH2) domén is van, ezek a foszforilált tirozin oldalláncokhoz való kötődést szolgálják. Az Src homológia domén 3 (SH3) pedig más fehérjék prolingazdag régióihoz való kötődésben vesz részt.



2. ábra. A GAP fehérjék szerkezete. A sematikus ábrázolás N terminális (bal oldal) felől C terminális felé mutatja be a GAP-1, GAP-2 és GAP-3 fehérjék szerkezetét *C. elegans* fonálféregben. Mindhárom fehérjében megtalálható a RasGAP katalitikus domén, illetve egy plextrin homológia (PH) domén. A GAP-2 ezen kívül tartalmaz egy C2 domént, míg a GAP-3-ban két Src homológia domén 2-t (SH2) és egy Src homológia domén 3-at (SH3) találunk. A *gap-1(ga133)* és a *gap-2(tm748)* mutációk a katalitikus régiót érintő deléció miatt, míg a *gap-3(ga139)* mutáció a katalitikus régióban lévő stop kodon miatt funkcióvesztőek. Az ábra újraközlése Steták és munkatársai (2008) írásos engedélyével történt.

A GAP fehérjék a Ras GTPáz aktivitását fokozzák, mely kapcsolatban három szerkezeti elem kap főszerepet: a katalitikus doménben található arginin ujj hurok, az úgynevezett FLR (fenilalanin-leucin-arginin) motívum, valamint az α7/változó hurok régió (Scheffzek és Ahmadian, 2005). Az arginin ujj hurok kiemelt fontosságú, mivel vonzó kutatási célpontja az onkogén Ras mutációknál létrejövő, hibás Ras-RasGAP kapcsolat megszüntetésének. Az FLR motívum és az α7/változó hurok régió a Ras-specificitásban játszanak szerepet. Az említett szerkezeti megfigyeléseket humán GAP fehérjéken tették, a *C. elegans* ortológok szerkezete még feltárásra vár.



3. ábra. A RasGAPok a Ras GTPáz ciklusában, valamint a prototípus Ras/MAPK jelpályában.

A jelpálya elemeit *C. elegans* fehérjék nevei azonosítják, zárójelben az emberben előforduló fehérjecsaládok neve szerepel. Az aktivált receptor tirozin kinázok (RTK) foszforilált oldalláncaihoz adapterfehérje kapcsolódik, mely a komplexbe toborozza a Rast az azt aktiváló guanozin kicserélő faktorokkal (GEFek) és GTPáz aktiváló fehérjékkel (RasGAPok) együtt. Az aktivált Ras a prototípus jelpálya esetén kináz kaszkádot indít be, mely a sejtmagban ér véget.

A RasGAPok hatása eddigi ismereteink szerint a Ras/mitogén aktivált fehérje kináz (MAPK) jelpályán keresztül érvényesül, melynek prototípusát a 3. ábra szemlélteti. Ez ortológok szintjén azonos emberben és *C. elegans*-ban. A növekedési faktorok először két receptor tirozin kinázhoz (RTK) kötődnek, melyek ennek hatására dimerizálódnak és autofoszforilálják egymást. Az így keletkező foszforilált oldalláncok dokkolóhelyekként szolgálnak adapterfehérjéknek, mint például a SEM-5 (emberben GRB2). Az adapterfehérjék ennek következtében a komplexbe toboroznak guanin nukleotid kicserélő faktorokat (például Son of Sevenless-1, SOS-1), melyek a Ras-t (LET-60 Ras) aktiválják azáltal, hogy a Ras-kötött GDP-t GTP-re cserélik. Az aktivált Ras-GTP ekkor már meg tudja kötni és a plazmamembránhoz horgonyozni a Rafot

(mitogén aktivált fehérje kináz kináz kináz MAP3K), amely ezáltal aktiválódik. Az aktivált Raf foszforilálja, így aktiválja a MEKet (mitogén aktivált fehérje kináz kináz, MAP2K/MAPKK), mely az Erk kinázt (mitogén aktivált fehérje kináz, MAPK) foszforilálja és aktiválja. Az Erk a citoplazmából a sejtmagba transzlokálódik, ahol transzkripciós folyamatokat indít el. A Ras GEFek által történő aktiválódását ellensúlyozzák a RasGAPok, vagyis a Ras molekuláris kapcsoló szerepe a GEFek és GAPok egyensúlyától függ.

Az emberben megtalálható RasGAP fehérjék négy típusba sorolhatóak (Lockyer és mtsai, 2001), ezek a p120 GAP (Trahey és McCormick, 1987), a neurofibromin (Skuse és mtsai, 1989), a SynGAP (Kim és mtsai, 2003), valamint a GAP1 fehérjecsalád (Cullen, 1998), amelybe a RASA és RASAL fehérjéket is soroljuk. A humán GTPáz aktiváló fehérjék elsősorban sejtdifferenciációban, fejlődésben és tumorigenezisben betöltött szerepük nyomán kaptak figyelmet (Malumbres és Barbacid, 2003), A GAPok a Ras inaktivátoraiként tumorképződésben különösen fontosak (Friedman, 1995; Karnoub és Weinberg, 2008; Pamonsinlapatham és mtsai, 2009; Ligeti és mtsai, 2012), mivel aktivált Ras egyes becslések szerint akár a tumorok 20-30%-ában is megtalálható (Denayer és mtsai, 2008).

A tanulás és memória molekuláris mechanizmusaiban a Ras aktiválása a prototípus receptor tirozin kinázokon túl számos más módon is sor kerülhet, melyeket a 4.3. fejezet ('A tanulás és memória fontosabb jelpályáinak kapcsolatai a Ras/MAPK jelpályával') részletez. A GAPok önálló szerepére *C. elegans* tanulásában és memóriafunkciójában munkámat megelőzően nem volt irodalmi adat.

3.3. A tanulás és memória fontosabb jelpályáinak kapcsolatai a Ras/MAPK jelpályával

A kalcium jelátvitele központi szerepű a szinaptikus plaszticitásban, így a tanulásban és memóriában. A Ca^{2+} intracelluláris szintjének megemelkedése többféle módon is képes aktiválni a Rast (Yuan és mtsai, 2002; Cullen és Lockyer, 2002; Morozov és mtsai, 2003; Birnbaum és mtsai, 2004; Wiegert és Bading, 2011). Ezek között találunk rövid,

másodperc töredékében mérhető időskálán működőeket, míg mások fehérjeszintézisen keresztül hosszú távú választ váltanak ki.

A szinaptikus plaszticitás és hosszú távú potenciáció kulcsszereplőiként is ismert N-metil-D-aszpartát receptorok (NMDAR) közvetlen Ca^{2+} beáramlást képesek előidézni, míg a G_q-fehérjehez kapcsolt receptorok a foszfolipáz C β (PLCb) aktiválásán keresztül érik el ezt. A PLCb a plazmamembrán foszfatidil-inozil molekuláinak hasításával állít elő inozitol-(1,4,5)-triszfoszfátot (IP_3) és diacil-glicerolt (DAG), melyek közül az IP_3 az endoplazmás retikulumból szabadít fel kalcium-ionokat. Mind az IP_3, mind a DAG jelátvitele konvergálhat a fehérje kináz C (PKC) enzimcsalád tagjain, melyek közül a PKC α fehérjét irodalmi adatok az érzelmi memóriával és poszt-traumás stressz szindrómával hoznak kapcsolatba (de Quervain és mtsai, 2012). A fehérje kináz C enzimek pedig mind a Rast, mind a Rafot képesek aktiválni.

Az emelkedett intracelluláris Ca^{2+} szint a GEF-ek családjába tartozó guanin nukleotid felszabadító faktor 1-en (guanine nucleotide-releasing factor 1, GRF1) keresztül serkenti a Rashoz kötött GDP cseréjét GTP-re. E folyamat következtében a Ras jelátvitele, így közvetlenül a Raf is, aktiválódik.

Az alapvetően lokális Ca^{2+} szint emelkedés tranziens módon terjedhet a sejtben, mivel az elért endoplazmás retikulumokból IP_3-receptor mediált módon további kalcium-ionok szabadulnak fel. Végső soron a sejtmagban is megemelkedő Ca^{2+} szint aktiválhatja a CREB-et, mely több jelpálya, köztük a Ras/MAPK egyik géntraszkripciós effektora (Hagenston és Bading, 2011).

A Ca^{2+}/kalmodulin-függő fehérje kináz II (CaMKII), a p135 SynGAP, és a PSD-95 nevű állványfehérje is az úgynevezett posztszinaptikus denzitás (PSD) komplex része, mely az NMDA receptorokat kapcsolja intracelluláris jelátviteli utakhoz (Chen és mtsai, 1998; Komiyama és mtsai, 2002). A CaMKII képes foszforilálni a p135 SynGAPot, ezáltal gátolja azt, így a Ras/MAPK jelpálya gátlásoldás lévén felszabadul (Berridge, 2012b).

A Ras kapcsolja össze az NMDAR és CaMKII jelátvitelt oly módon is, mely hosszú távú potenciáció során az AMPA (2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il)propánsav) receptorok szinapszisokba való szállítását facilitálja (Zhu és mtsai, 2002). A szintén a kis GTPáz fehérjék családjába tartozó Rap e folyamatot ellensúlyozza, a

szinaptikus AMPA receptorok eltávolításában játszik szerepet. Az AMPA receptorok vélhetően Ras/MAPK jelpályán keresztül végzik a cAMP reszponzív elemet kötő fehérje (CREB) aktiválását neuronokban (Perkinton és mtsai, 1999). Rumbaugh és munkatársai (2006) neuronális sejtkultúrában mutatták be, hogy a SynGAP túltermelése a szinaptikus AMPA receptorok számának csökkenéséhez vezet, mely hatás a Ras/MAPK jelpályán keresztül érvényesül.

A Kv4 típusú káliumcsatorna család tagjai a lokális membrándepolarizációt szabályozzák. Az Erk fehérjék képesek foszforilálni e csatornák komponenseit, mely erősebb depolarizációhoz, ezáltal több NMDA receptor aktiválódásához vezet (Moult és mtsai, 2008). E gyors, fehérjeszintézistől független mechanizmus a Ca^{2+}, K^{+} és Ras/MAPK jelátvitelét is érinti.

A RASA3 fehérjének inozitol-tetrafoszfát receptorként az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedésében is szerepet tulajdonítanak (El-Daher és mtsai, 2000), mely funkciót eddig azonban csak vérlemezkék aktiválódása kapcsán írták le.

A RASA4 (CAPRI) fehérje az intracelluláris Ca^{2+} szint megemelkedésének hatására képes inaktiválni a Ras/MAPK jelpályát (Lockyer és mtsai, 2001). A Ca^{2+} hatása e folyamatban a RASA4 C2 doménjén keresztül érvényesül.

Az adenilát-cikláz 1 (ADCY1) aktivitását a G_s-fehérjehez kapcsolt receptorok fokozzák, a G_i-fehérjehez kapcsolt receptorok gátolják. Az adenilát-cikláz 1 az adenozin-trifoszfátból alakít ki ciklikus adenozin-monofoszfátot (cAMP). Neuronokban az adenilát-cikláz 1 kalcium/kalmodulin-függő, ezáltal a cAMP szint a kalcium fentebb részletezett jelátvitelével összefügg.

A cAMP fehérje-kináz A-függő és attól független módon is képes szabályozni a Ras/MAPK jelpályát (Gerits és mtsai, 2008; Xia és Storm, 2012). A fehérje-kináz A-függő folyamatban a fehérje-kináz A (PKA) szabályzó alegységei cAMP-t kötnek, mely a katalitikus alegységek aktív kötőhelyének elérhetővé válásához, valamint ennek következményeként a PKA komplex disszociációjához vezet. A katalitikus alegységek így foszforilálhatják a Ras-specifikus guanin nukleotid felszabadító faktor 1-et (GRF1), amely serkenti a Ras-kötött GDP GTP-re való cseréjét. Az aktív PKA katalitikus

alegységek a sejtmagba is transzlokálódhatnak, hogy ott foszforilálják a CREB2-t, ezáltal génexpressziós kaszkádot indítsanak meg.

A PKA-független jelátvitel során a cAMP közvetlenül kötődik a CNrasGEF-hez, egy guanin nukleotid kicserélő faktorhoz, mely serkenti a Rashoz kötött GDP GTP-re való kicserélődését, ezáltal aktiválja a Ras jelátvitelét. E folyamat pontos részletei egyelőre nem ismertek, mely annak tükrében különösen érdekes, hogy a cAMP/PKA jelpálya a neuronokban legtöbbet tanulmányozott jelpályák egyike.

A PKA a foszfolambánt (PLN) is gátolja, mely a szarkoplazmás/endoplazmás retikulum membránjában található, Ca^{2+}-ot transzportáló ATPáz 2-es izoforma (ATP2A2) negatív szabályozója. Amennyiben az ATP2A2 felszabadul a PLN gátlása alól, Ca^{2+}-ot szállít az endoplazmás retikulumba, melynek következtében a citoplazmai Ca^{2+} jelet csökkenti.

A különböző Ras izoformák konvergenciapontot képviselnek a fentebb említett jelátviteli folyamatokban. A KRas, HRas és NRas egyaránt aktiválhatja a foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát-3-kinázt (PI_3K), mely az aktin citoszkeleton szabályzásában vesz részt. Glutamáttal végzett stimuláció például a dendritikus térfogatot a Rason keresztül szabályozza (Harvey és mtsai, 2008), de az sem kizárt, hogy a GAPok közvetlenül is részt vesznek a citoszkeleton regulációjában (McGlade és mtsai, 1993). Interaktálnak a neuronális sejtváz szabályzásában szerepet játszó amiloid-β-A4 prekurzor fehérjével (Aβ, APP), illetve a Rap1A-val is. Az APP egyben a memóriazavarral is járó Alzheimer kór egyik fontos biomarkere (Lewczuk és mtsai, 2015). A szinaptikus aktinfilamentumok felépülésének és lebomlásának dinamikájáról pedig a közelmúltban derült ki, hogy *C. elegans* fonálféregben és emberben egyaránt központi szerepet játszik a felejtésben (Hadziselimovic és mtsai, 2014).

A Ras/MAPK, IP_3/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI_3K jelpályák és a Ca^{2+} jelátvitel keresztbeszélgetéseinek nagy száma hangsúlyozza a vonatkozó kísérletes adatgyűjtés fontosságát, illetve a meglévő adatok rendszerbe foglalását. Utóbbihoz ideális megközelítést jelent a hálózattudomány, mely két szinten is használható: a nagy léptékű hálózatok segítségével integrálhatóak az adatok, míg a kis léptékű, de nagy felbontású

hálózatokkal a jelátvitel részletei deríthetőek fel, illetve a kísérletes irányok kijelölése segíthető. A szinaptikus interaktómot növekvő érdeklődés övezi (Laßek és mtsai, 2014), az egyetlen célzott adatbázis azonban a szinaptikus fehérje-fehérje interakciókat tömörítő SynSysNet adatbázis (von Eichborn és mtsai, 2013).

3.4. A Ras/MAPK jelpálya patológiai és farmakológiai vonatkozásai

A Ras/MAPK jelpálya génjeinek csíravonali mutációival társított betegségeket Rasopátiáknak nevezzük (Tidyman és Rauen, 2009; Rauen, 2013). Az ismert Rasopátiákat a 2. táblázat listázza.

A rendellenességek mindegyike egyedi tünetkombinációval bír, a mögöttük meghúzódó közös jelpálya miatt azonban a szimptómák átfednek. Jellemzőek az arc karakterisztikus jegyei, a szív fejlődési rendellenességei, a bőrtünetek, a tumoros elváltozásokra való hajlam, valamint a változó mértékű neurokognitív zavar, beleértve a tanulási nehézségeket és a végrehajtó funkciók zavarát.

2. táblázat. Rasopátiák: a Ras/MAPK jelpálya génjeinek csíravonali mutációival társított betegségek.

Betegség neve	Érintett fehérjék	K. é. *	Hivatkozás
Autoimmun limfoproliferatív szindróma	FAS, KRAS, NRAS	Nincs	Tidyman és Rauen, 2010; Rauen, 2013
Cardio-facio-kután (CFC) szindróma	BRAF, MAPKK1, MAPKK2, KRAS	Van	Niihori és mtsai, 2006 Rauen, 2013
Coffin-Lowry szindróma **	RSK2	Van	Trivier és mtsai, 1996
Costello szindróma	HRAS	Van	Costello, 1977 Aoki és mtsai, 2005
Kapilláris malformáció-AV malformáció-AV (CM-AVM) szindróma	RASA1	Van	Eerola és mtsai, 2003 Boon és mtsai, 2005
Legius szindróma	SPRED1	Van	Brems és mtsai, 2007 Brems és Legius, 2013

LEOPARD szindróma	PTPN11, RAF1, BRAF	Van	Digilio és mtsai, 2002 Pandit és mtsai, 2007 Koudova és mtsai, 2009 Sarkozy és mtsai, 2009
Neurofibromatózis, I-es típusú (von Recklinghausen betegség)	NF1	Van	Wallace és mtsai, 1990 Friedman és Birch, 1997 Hirbe és Gutmann, 2014
Noonan szindróma	PTPN11, SOS1, RAF1, KRAS, NRAS, BRAF	Van	Noonan, 1968 Schubbert és mtsai, 2006 Pierpont és mtsai, 2013
Örökletes gingiválís fibromatosis, I-es típusú	SOS1	Nincs	Hart és mtsai, 2002 Jang és mtsai, 2007

* K. é.: Kognitív érintettség. A Rasopátiák tünetei változatosak és átfedőek, ezért a 'Kognitív érintettség' oszlop csupán a kognitív tünetek lehetőségét jelzi, nem azok kötelező meglétét. CM-AVM szindrómában a kognitív érintettség vaszkuláris okok miatt alakul ki, vagyis másodlagos.

** A Coffin-Lowry szindrómát egyesek nem sorolják a Rasopátiák közé, oka azonban az Erk kinázok egyik célpontjának, a 90 kDa riboszomális fehérje S6 kináz 2 (RSK2) génjének defektusa.

3.5. A *C. elegans* fonálféreg, mint modellrendszer

A *C. elegans* egy mérsékelt övi, talajlakó, körülbelül 1 mm hosszú fonálféreg. Modellrendszerként Sydney Brenner vezette be 1974-ben genetikai és idegtudományi vizsgálatokra (Brenner, 1974), melyért Nobel díjat kapott. Azóta e parányi férgek előnyös tulajdonságaiknak köszönhetően az élettudományok számos területén tettek szert nagy népszerűségre.

A *C. elegans* laboratóriumi fenntartása egyszerű, 15-25 °C-os hőmérsékleten agarlemezeken tenyészthető, *Escherichia coli* OP50 baktériumtörzzsel táplálható. A felnőtt állatok több, mint 99%-a hermafrodita, töredéknyi százalékban hímek is kiegészítik a populációt. Gyors, hőmérséklettől függően 2-5 napos generációs ideje és magas utódszáma alkalmassá teszi nagy egyedszámú minták gyakori tesztelésére is,

valamint a későbbiekben leírásra kerülő tesztekben vizsgált több ezres nagyságrendű féregszám statisztikailag megbízható adatokhoz vezet.

Fejlődése során a férgek 4 lárvastádiumon mennek keresztül, melyeket a fiatal felnőtt, majd a gravida állapot követ. A vad típus élettartama 2 hét. Kedvezőtlen környezeti feltételek között a fiatal lárvák képesek egy úgynevezett dauer lárva állapotba lépni, mely rendkívül ellenálló, akár hónapokig is képes túlélni például az éhezést. Megfelelő körülmények esetén ismét visszalép normál fejlődési ciklusába. A fiatal lárvák fagyaszthatóak is, így törzsek könyvtárai alakíthatóak ki.

A *C. elegans* összes sejtjének leszármazási vonala ismert (Sulston és mtsai, 1983), ezért fejlődésbiológiai kutatásokban előszeretettel használt modellállat. Egyedülálló módon 302 idegsejtjének teljes konnektómja, azaz idegrendszeri kapcsolati hálózata is feltérképezett és törzsenként változatlan (White és mtsai, 1986; Varshney és mtsai, 2011). A felnőtt állatok idegrendszerében ennek megfelelően nem képződnek és épülnek le dendritikus kapcsolatok, tehát a tanulási folyamatok megfigyelésekor a szinaptikus plaszticitás e fajtája kizárható.

Áttetsző mivoltának és egyszerű felépítésének köszönhetően a *C. elegans* sejtjei fénymikroszkóppal is tanulmányozhatóak, fluoreszcens mikroszkóppal pedig génexpressziós és fehérjelokalizációs vizsgálatoknak is alávethető (Chalfie és mtsai, 1994).

Génállományának teljes szekvenciája ismert. Evolúciósan magasabb rendű modellállatokhoz viszonyítva mutáns és transzgén vonalak létrehozása egyszerűbb. A rendelkezésre álló széles molekuláris biológiai eszköztár kiemelkedő eleme a *C. elegans*-ban felfedezett és leírt RNS interferencia (RNSi) géncsendesítési eljárás (Fire és mtsai, 1998), melynek segítségével olyan gének szuppresszálása is lehetséges, melyek egyébként letálisak volnának, vagy amelyekre még nem ismert mutáns törzs. A molekuláris biológiai módszerekkel, valamint a felfedezésekkel kapcsolatban a *C. elegans* kutatók közössége interneten nagy tudásbázist oszt meg szabadon elérhetően, melynek központjai a WormAtlas, a WormBook, valamint a WormBase (Altun és mtsai, 2002; Girard és mtsai, 2007; Yook és mtsai, 2012).

3.6. A tanulás és memória *C. elegans*-ban

C. elegans esetében megfigyelhető a nonasszociatív és az asszociatív tanulás, valamint az imprinting is. Lárva stádiumú és felnőtt férgek is képesek viselkedésváltozást kialakítani mechanikai és kémiai stimulusok iránt: megtanulják, hogy rezgéseket, illatokat, ízeket, hőmérséklet és oxigénszint változásait kössék számukra káros hatásokhoz, vagy éppen táplálékhoz.

A nonasszociatív tanulás egyik fajtája a mechanoszenzoros habituáció. Ezt leggyakrabban az úgynevezett *tap withdrawal reflex* segítségével vizsgálják (fordítható rázkódási visszavonulás reflexként), mely során az állat alokalizált mechanikus ingerre (általában lemez ütögetése) válaszul haladási irányát megfordítja és testhossznyit hátrafelé halad. Újabb érintésekre a válasz csökken, rövid elektromos sokk pedig gyorsítja e csökkenést (Rankin és mtsai, 1990). 60 másodpercenként 20-szor ismételt rázkódás 24 órán keresztül megmaradó hosszú távú memóriát is kialakít (Beck and Rankin 1995; Rose és Rankin, 2001).

Colbert és Bargmann (1995) figyelték meg, hogy eredetileg csábító illatanyagoknak tartósan kitett férgek kemotaxis válasza egy idő után megszűnt. E megfigyelés alapja lehetne adaptáció ugyanúgy, mint habituáció, azonban Bernhard és van der Kooy (2000) megmutatták, hogy a férgek mindkettőre képesek. Először a pontszerű diacetilforrás iránti vonzódást csökkentették diacetiles prekondícionálással, majd a csökkent választ diszhabituációs hatással (centrifugálás) visszaállították alapállapotba. A glutamát receptort kódoló *glr-1* génben lévő funkcióvesztő mutáció megakadályozta a férgek diacetilhez való habituációját. Nuttley és munkatársai (2001) az eredményeket benzaldehiddel is megerősítették, ahol azonban a *glr-1* mutáció nem volt hatással a habituációra. A legfrissebb eredmények a glutamát receptor szabályozását a Rashoz is kötik (Hamakawa és mtsai, 2015).

A *C. elegans*-t figyelemre méltó asszociatív tanulás jellemzi, képes kemotaxisra, termotaxisra és aerotaxisra is a kedvezőbb környezeti körülmények gyorsabb eléréséhez és megjegyzéséhez. Nátrium-klorid és táplálék együttes jelenlétét megtapasztaló állatok a későbbiekben nagyobb eséllyel választják a sóval megjelölt helyet a lemezen, mint a kontrollként szolgáló ellenpontot. Az asszociáció negatív hatásokkal is működik, a sót

és fokhagymakivonatot együttesen megtapasztaló állatok a későbbiekben úgy is elkerülik a sót, hogy előtte vonzódtak hozzá (Wen és mtsai, 1997). A nátrium-klorid iránti vonzódás helyét átvevő averzív viselkedést éhezéssel (Saeki és mtsai, 2001) és tömény glicerinnel, illetve benzaldehiddel kapcsolatban is megfigyelték (Hukema és mtsai, 2008). A nátrium-kloridhoz kapcsolódó averzióban részt vevő jelpályák elemei közül Jansen és munkatársai (2002), valamint Hukema és munkatársai (2006) azonosították a Gγ GPC-1 alegységét, a Gα alegységei közül a GPA-1 és ODR-3 molekulákat, valamint a TRPV ioncsatorna OCR-1, OCR-2, és OSM-9 alegységeit. Vellai és munkatársai (2006) azt is megfigyelték, hogy a hím férgek kevésbé jól tanulják meg a só és éhezés asszociációját hermafrodita társaikhoz képest, melynek hátterében az inzulin/IGF-1 jelátvitel nátrium-klorid érzékelésre gyakorolt moduláló hatását találták.

A szagláson alapuló asszociatív tanulási kísérletek hasonlóan elterjedtek, mivel a férgek pozitív kemotaxist mutatnak a táplálékul szolgáló baktériumok által kibocsájtott illékony anyagok iránt. Ilyen például a diacetil, melyről Morrison és munkatársai (1999) mutatták be, hogy averzív ecetsavval való asszociációt követően a férgek diacetil iránti vonzódása csökkent. Steták és munkatársai (2008) azt is leírták, hogy a *gap* mutánsok közel egyforma arányban vesznek részt a LET-60, a *C. elegans* Ras ortológ szabályzásában diacetil iránti kemotaxis során.

Imprintingnek az egyedfejlődés korai szakaszában rögzülő hosszú távú memóriát nevezzük. Például az L1 lárvakorban tapasztalt illatokat a felnőtt, peterakó férgek előnyben részesítik más, amúgy szintén vonzódást kiváltó anyagokkal szemben (Remy és Hobert, 2005). Azt is megfigyelték, hogy vad típusú férgek etanollal szemben elkerülő magatartásúak, azonban a fejlődésük során krónikusan etanolnak kitett egyedek felnőtt korukban erősebb vonzódást mutattak etanol iránt még az alkohollal prekondícionált álllatoknál is (Lee és mtsai, 2009).

A *C. elegans*-ban megfigyelt tanulás és memória tehát összefoglalva az alábbiak szerint osztható fel:

I. Nem asszociatív tanulás
   A. Mechanoszenzoros habituáció
   B. Kemoszenzoros habituáció

II. Asszociatív tanulás (a. t.)

A. Ízérzésen alapuló a. t.

B. Szagláson alapuló a. t.

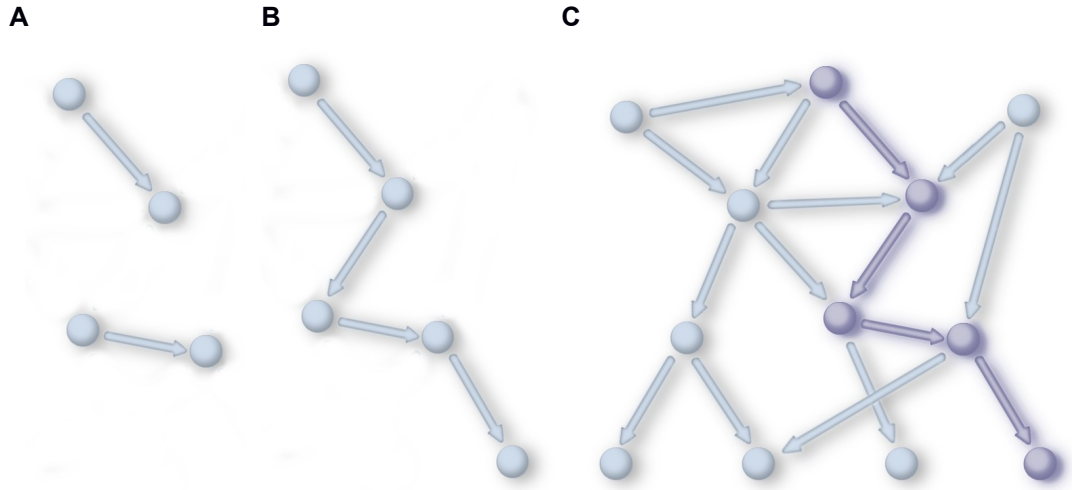
C. Oxigénen alapuló a. t.

D. Hőmérsékleten alapuló a. t.

III. Imprinting

3.7. Rendszerbiológiai megközelítés, molekuláris hálózatok

A komplex biológiai rendszerek kísérletes, számítógépes és matematikai eszközökkel való interdiszciplináris modellezését nevezzük rendszerbiológiai megközelítésnek (Ideker és mtsai, 2001; Kitano, 2002). Korai előfutárként Alan Lloyd Hodgkin és Andrew Fielding Huxley akciós potenciál modelljét említhetjük (Hodgkin és Huxley, 1952), a rendszerszemlélet gyökerei pedig Ludwig von Bertalanffy általános rendszerelméletéből erednek (Lopreto és von Bertalanffy, 1970). Modern értelemben bármely komplex rendszer – szerkezetét, funkcióját és dinamikáját beleértve – megközelíthető elemek és azok kapcsolatainak összességeként, vagyis hálózatként.



4. ábra. A molekuláris hálózatok elvének sematikus ábrázolása.

(**A**) A sejten belüli molekuláris kapcsolatok alapelemét a molekulapárok közötti interakciók adják, mely tetszőleges anorganikus és organikus molekulák között létrejöhetnek. (**B**) E

kapcsolatok jelpályákat alkotnak, a jelátvitel hagyományos egységeit. (**C**) A jelpályák keresztbeszélgetéseik révén hálózatokká állíthatóak össze, melyekben egy-egy molekulának akár több ezer más molekulával is lehet kapcsolata, ezáltal a jelátvitel és szabályzás részletesebben is megismerhető.

A redukcionalista szemléletű kísérletekből összegyűlt masszív mennyiségű információ, illetve a nagy áteresztőképességű kísérletekből származó hatalmas adatkészletek új lendületet adtak a rendszerszemléletű molekuláris kutatásoknak. Ennek lényege, hogy a hagyományosan molekulapárok közötti kapcsolatok jelpályákká szervezhetőek, a jelpályák pedig keresztbeszélgetéseikkel jelátviteli hálózatokat alakítanak ki, melyek gazdagabb képet adnak a biológiai folyamatok molekuláris hátteréről (4. ábra). A molekuláris hálózatok a jelátvitel mellett alkalmazhatóak anyagcserére (metabolikus hálózatok), gének között megfigyelt kölcsönhatásokra (génhálózatok), vagy fehérjék közötti kapcsolatokra (fehérje-fehérje interakciós hálózatok) is. Ezek közös jellemzője, hogy a diszkrét molekuláris eseményeket kontextusukban, kölcsönhatásaikkal együtt veszik figyelembe. Az intracelluláris hálózatok univerzális szabályszerűségek szerint épülnek fel és általános érvényű, skálázható elvek mentén működnek (Barabási és Oltvai, 2004), emiatt napjainkra az élettudományi hálózatokra épülő elemzés a fehérjeszerkezeti kutatásoktól a génexpressziós vagy épp proteomikai tanulmányokon át a gyógyszermellékhatás-kutatásig széles körben elfogadott eszközzé vált (Silberberg és mtsai, 2012; Csermely és mtsai, 2013, Gyurkó és mtsai, 2014).

Gráfelméleti terminológia szerint a hálózatok csúcsokból (például molekulák) és élekből (például interakciók) épülnek fel. Az egy csúcshoz kapcsolódó élek száma a fokszám. Az élek lehetnek irányítatlanok (például két strukturális fehérje kapcsolódása) és irányítottak (például egy kináz és szubsztrátjának kapcsolata). Az egymást követő csúcsok és élek sorozatát útnak nevezzük, egy gráf átmérője pedig a két tetszőleges csúcsot összekötő legrövidebb utak közül a leghosszabb.

A nagy áteresztőképességű kísérletek, így a tárolásukra megszületett adatbázisok ugyanakkor komplexitásuk miatt túlmutatnak az intuitív megértésen. Egyre nagyobb mértékben válik szükségessé bioinformatikai analízis és modellfejlesztés, mely a kísérleti eredmények mögött meghúzódó biológiai folyamatok feltérképezését, valamint a további kísérletes célpontok kiválasztását egyaránt segíti. E rendszerszintű

megközelítés a szerző véleménye szerint nem válthatja fel a fókuszált, nagy részletességű kísérletes munkát, sokkal inkább kiegészíti, kontextusba helyezi azt.

A SynSysNet nevű, rendszerszemléletű adatbázis a szinapszisokkal kapcsolatba hozott gének, fehérjék és gyógyszerek szakértők által kurált gyűjteménye (http://bioinformatics.charite.de/synsysnet/; von Eichborn és mtsai, 2013), rendszerszemléletű idegtudományi adatbázisként az egyetlen. A humán GAP fehérjék közül a GAP-1-et tartalmazza annak interaktorai nélkül. További GAP fehérjéket nem találunk, illetve nem idegrendszeri, de abban mellékhatással bíró gyógyszereket sem. Kifejezetten a tanulás és memória tanulmányozására létrehozott molekuláris adatbázis nem ismert. Mindezek a nagy léptékű adatintegráció, majd az abból építkező, kézzel kurált, tanulásra és memóriára összpontosító hálózatépítés fontosságát hangsúlyozzák.

4. Célkitűzések

Kutatásom céljául a *gap* géncsalád *C. elegans* modellrendszerben történő, tanulásra és memóriára vonatkozó fenotipizálását, valamint a GAP fehérjék lehetséges jelátvitelének *in silico* feltérképezését tűztem ki.

A *gap* géncsalád tanulásban és memóriában betöltött szerepét kísérletesen *C. elegans* funkcióvesztő *gap* mutánsokon vizsgáltam meg. Ez magában foglalja a mutáns állatok mozgásának és érzékelésének felmérését is, mivel ezek defektusa alapvetően befolyásolhatja a megfigyelt viselkedést, így a tanulással és memóriával kapcsolatban levont következtetéseket is. A GAP fehérjéket a Ras szabályozóiként ismerjük, így a Ras-függés kísérletes vizsgálatát is elvégeztem. Mindezek jellemzéséhez szükséges volt egy hazánkban új viselkedésbiológiai tesztrendszer meghonosítása, melyet a Bázeli Egyetem Molekuláris Pszichológia Tanszékével együttműködésben valósítottam meg.

A GAP fehérjék ismert jelátvitelének adatai számos adatbázisban, különböző nevezéktanok szerint és eltérő formátumokban voltak elérhetőek, emiatt a lehetséges jelátviteli útvonalak feltérképezéséhez az adatok egységesítése volt szükséges. Az integrációt a hatalmas adatmennyiségre való tekintettel laborunk tagjaival együttműködve, egy manuálisan létrehozott szabályrendszeren alapuló, ám az adatintegrációt automatizáltan végző programrendszer segítségével valósítottam meg. Az így nyert adatbázist a kísérletes és irodalmi adatok által kijelölt irányban fókuszáltan manuálisan ellenőriztem és kiegészítettem, majd az eredményül kapott jelpályákat hálózattá szerveztem. Az elkészült hálózat egységes rendszerben képviseli a GAP fehérjék tanulásban és memóriában betöltött lehetséges jelátvitelét, valamint további kísérletes célpontokat jelezhet előre.

5. Módszerek

5.1. Kísérletes módszerek

5.1.1. Törzsek és anyagok

A férgek fenntartása inkubátorban, állandó 20° Celsius hőmérsékleten történt 10 cm-es Petri csészébe öntött 20 ml NGM (Nematode Growth Medium, 5 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 6.0, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM $NaCl_2$, 6 mM koleszterin, 2% agar, ioncserélt H_2O) tenyésztőlemezeken (Brenner, 1974). Minden lemezen 1 ml *E. coli* OP50 variáns biztosította a táplálékot. A kísérleteket makro- és mikroszkóposan vizuálisan ellenőrzött, fertőzésmentes, fiatal felnőtt állatokkal végeztem. Referenciaként a *C. elegans* N2 törzsének Bristol variánsát használtam, amennyiben ezt másként nem tüntettem fel.

A használt törzseket a 3. táblázat sorolja fel.

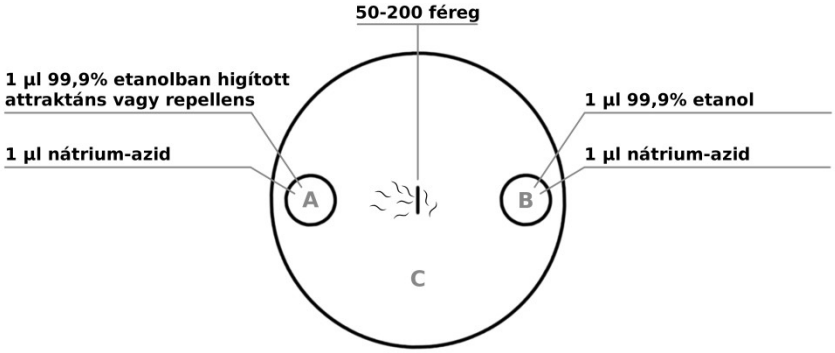
3. táblázat. A kísérletek során használt törzsek listája a leíró publikációkkal.

Név	Hivatkozás	Fő jellemző
eri-1(mg366);lin-15B(n744)	Sieburth és mtsai, 2005	Injektált RNS-re érzékenyített
gap-1(ga133)	Hajnal és mtsai, 1997	Ras/MPK-1 negatív regulátor
gap-2(tm748)	Hayashizaki és mtsai, 1998	Ras/MPK-1 negatív regulátor
gap-3(ga139)	Steták és mtsai, 2008	Ras/MPK-1 negatív regulátor
gap-1(ga133);sur-5::mDsRed	Gyurkó és mtsai, 2015b	Vörös fluoreszcens fehérje génjével fúzionált *gap-1*
let-60(n2021)	Beitel és mtsai, 1990	*C. elegans* Ras ortológ

5.1.2. Kemotaxis teszt

A kemotaxis teszt során a férgek illékony anyagokra adott válaszát vizsgáljuk (Bargmann et al, 1993). Ezen anyagok közül attraktánsoknak nevezzük, amelyek iránt a férgek ösztönös vonzódást mutatnak, ilyen például a diacetil, a benzaldehid, vagy az izoamilkohol.

A kemotaxis teszteket 10 cm-es CTX lemezen végezzük (5 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 6.0, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 2% agar). A lemez alját rajzolt jelöléssel kétfelé választva mindkét oldalra 2 cm átmérőjű kör kerül (5. ábra). Diacetilt, benzaldehidet és izoamilalkoholt oldunk etanolban 1:100 és 1:1000 hígításban, majd ebből 1 µl-t teszünk az egyik körbe, a másik körbe 1 µl 99,9%-os töménységű etanolt helyezünk, és mindkét körbe 1 µl 20 mM nátrium-azidot cseppentünk, mely a körökbe mászó férgeket megbénítja.



5. ábra. A kemotaxison alapuló tesztek kísérleti környezetének illusztrációja.
A 10 cm-es CTX lemezen 2 db 2 cm átmérőjű területet jelölünk ki. Az egyikbe 1:100 vagy 1:1000 hígításban 1 µl attraktánst vagy repellenst, a másikba 1 µl 99,9%-os töménységű etanolt cseppentünk, és mindkét oldalhoz 1 µl 20 mM nátrium-azidot is hozzáadunk. A férgeket középre cseppentjük, innen szabadon mászhatnak, a kísérlet eredményét 1 óra múltán értékeljük az (1) képlet szerint megadott számítással.

Cseppentéssel 50-200 állatot teszünk középre minimális CTX oldattal (5 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 6.0, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, ioncserélt H_2O), amelyek egy órát szabadon mozoghatnak. Az idő lejárta után a két körben, illetve azon kívül maradt, élő férgeket összeszámolva kalkulálható a kemotaxis index az alábbi képlet (1) szerint:

$$\text{Kemotaxis index (CI)} = (A-B) / (A+B+C) \qquad (1)$$

Az index értéke a férgek adott anyag iránti vonzódásával egyenesen arányos.

5.1.3. Motilitási teszt

A férgek mozgásszervrendszerét az egy percre eső mozgási ciklusok számával jellemezzük táplálkozó alapviselkedés, táplálékkereső és éhezés utáni táplálkozó állapotokban.

A táplálkozó alapviselkedés meghatározásához a fiatal felnőtt férgeket NGM tenyésztőlemezekről féregkacs (*wormpick*, üvegcsőbe olvasztott platinadrót vagy serte) segítségével egyesével új 1 ml OP50-nel cseppentett NGM tenyésztőlemezre helyezzük, majd két perc várakozás után egy percig számoljuk a mozgási ciklusok számát (Sawin et al, 2000; Mohri et al, 2005).

A táplálékkereső magatartás jellemzése az alapviselkedés meghatározásához mindenben hasonló, kivéve, hogy a férgeket OP50-nel cseppentett lemezekről táplálékot nem tartalmazó (OP50-mentes) NGM tenyésztőlemekre helyezzük.

Az éhezés utáni táplálkozó magartáshoz a jól táplált, fiatal felnőtt állatokat előbb 1 óra időtartamra üres NGM lemezre helyezzük, majd ezt követően egyesével tesszük vissza őket az OP50-nel cseppentett NGM tenyésztőlemezre. A mozgás leírása minden más tekintetben megegyezik az alapviselkedés jellemzésével.

5.1.4. A tanulás és rövid távú asszociatív memória tesztje

A férgek tanulását és memóriafunkcióját leíró tesztek alapjául az szolgál, hogy egy adott illékony anyag iránti ösztönös vonzódást egy másik, averzív ingerrel összekapcsolva a viselkedés ellenkezőjére fordítható (Nuttley és mtsai, 2002).

A naiv féregpopuláció kísérletes vizsgálatához az NGM tenyésztőlemezekről a fiatal felnőtt férgeket CTX oldattal (5 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 pH 6.0, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$) lemossuk, a folyadék rendszeres eltávolításával és pótlásával további háromszor átmossuk, majd a populáció egy részét a kemotaxis tesztnél leírt módon, diacetil 1:1000 hígítását felhasználva teszteljük.

A kondicionálás során tömény diacetil illatát asszociáljuk éhezéssel. Ehhez a fel nem használt féregpopulációt minimális CTX oldattal 10 cm-es CTX lemezre tesszük, majd a folyadék felszárítását segítendő a lemez mozgatásával egyenletesen elosztjuk. A lemez tetejébe ragasztott papírra 2 µl tömény diacetilt cseppentünk, végül a tömény

diacetilgőz kialakításához a lemezt 1 órára parafilmmel lezárjuk. Az idő leteltével a szükséges mennyiségű férget a kemotaxis tesztnél leírt módon, diacetil 1:1000 hígítását felhasználva teszteljük. Az eredmények kiértékelése során ugyanazon kondicionált állapotban a vad típushoz viszonyítjuk a mutáns törzseket, megfigyelések a férgek tanulási képességét jellemzik.

A memóriafunkció leírásához a megmaradt populációt Falcon csőben, M9 oldatban, billegtetőn fél órán keresztül 30/perc frekvenciával mosva pihentetjük, majd a kemotaxis tesztnél leírt módon, diacetil 1:1000 hígítását felhasználva teszteljük. Az eredmények kiértékeléséhez ugyanazon törzs kondicionált és pihentetett állapotait hasonlítjuk össze, ezáltal a törzs memóriafunkciójáról kapunk információt.

Drasztikusan eltérő kemotaxis indexű törzsek összehasonlításához tanulási index számítható a (2) képlet szerint:

$$\text{Tanulási index (LI)} = (CI_{naiv} - CI_{kond}) / CI_{naiv} \qquad (2)$$

ahol CI_{naiv}: naiv kemotaxis index, CI_{kond}: kondicionált kemotaxis index.

5.1.5. A hosszú távú asszociatív memória tesztje

A hosszú távú asszociatív memória tesztje a tanulás és rövid távú asszociatív memória tesztjéhez nagyon hasonló (Vukojevic és mtsai, 2012). A férgeket egy helyett háromszor kondicionáljuk tömény diacetil gőzében, a memóriafunkciót pedig a kemotaxis teszteknél leírt módon kondicionálás előtt, közvetlenül utána, majd 16 és 24 óra elteltével értékeljük. *C. elegans* esetében a rövid távú memória 2-3 óránál nem tart tovább (Ardiel és Rankin, 2010), így a 16 és 24 órás mérési időpontok biztosítják a hosszú távú memória vizsgálatát.

5.1.6. Transzgén *gap-1(ga133);sur-5::mDsRed* állatok létrehozása

A *gap-1* transzgenikus mentett törzs létrehozásához alacsony kópiaszámú Fosmid könyvtárból izoláltam a *gap-1* gént. A mentett vonalak fluoreszcens mikroszkóp alatt történő azonosításához dsRed fehérjét kódoló, teljestest-expressziót biztosító *sur-5* promoterről hajtott génnel egyesítettem. Az így létrejött *gap-1(ga133);sur-5::mDsRed* DNS-t protokoll szerint 50-100 ng/µl koncentrációban *gap-1(ga133)* funkcióvesztő mutáns férgek mindkét gonádjába injektáltam (Mello et al, 1991). Az injektált férgek első utódgenerációjából fluoreszcens mikroszkópiával választottam ki a hordozó állatokat.

5.1.7. RNS interferencia kísérletek

Az RNS interferencia tesztek során az RNS-érzékeny *eri-1(mg366);lin-15B(n744)* (KP3948) törzset 1M izopropil-d-tiogalaktopiranozidot (IPTG) tartalmazó lemezeken, *gap-1*, *gap-2* és *gap-3* kétszálú RNS-t hordozó baktériumpázsittal tápláltam az irodalomban leírtak szerint (Kamath et al, 2001). Az RNS interferencia kezelést az L4 stádiumot elért állatok 1 napig kapták.

5.2. Bioinformatikai módszerek

5.2.1. A ComPPI adatbázis létrehozásához használt eszközök

A ComPPI infrastruktúrája alapvetően egy webkiszolgálóra, egy adatbázisra és a ráépülő honlapra (összességében webes technológiákra), valamint az elemzéshez használt kódra osztható. Az adatbázist Ubuntu 14.04 linux környezetben (http://ubuntu.hu/), nginx webkiszolgálóra (http://nginx.org/) és MySQL 5 (http://www.mysql.com/) adatbázis-kezelőre építve hoztuk létre. Az adatbázist feltöltő kódot döntően PHP 5 (http://php.net/) programnyelvben írtuk a Symfony 2 keretrendszer (http://symfony.com/) segítségével. Az adatbázisra épülő honlapot a már említett PHP 5 és Symfony 2 segítségével, valamint HTML 4 (hypertext markup language, http://www.w3.org/), CSS 3 (cascading style sheets, http://www.w3.org/) és JavaScript nyelvek felhasználásával készítettük, utóbbihoz a jQuery (http://jquery.com/)

keretrendszert használtuk fel. Az adatbázis direkt kezelését és elemzését Python 3 programnyelven írt kóddal valósítottuk meg.

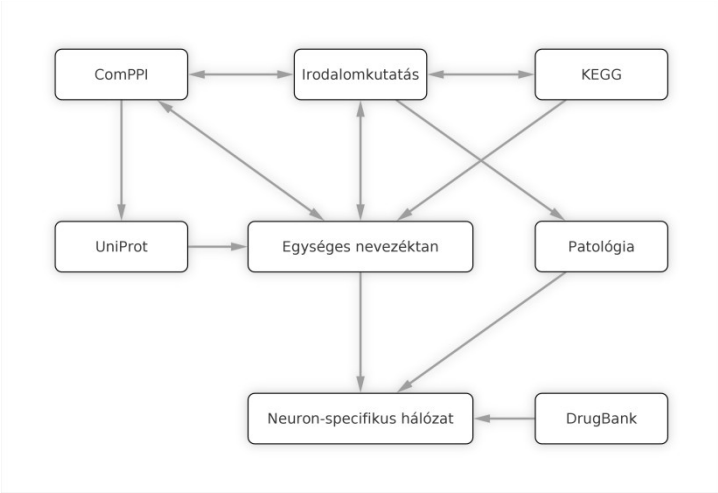
A hálózatos vizualizációhoz a d3.js könyvtárat (http://d3js.org/) és a CytoScape 3 programot (http://cytoscape.org/) használtuk.

A fejlesztés során minden programkódot git elosztott verziókezelő rendszerben (http://git-scm.com/) egységesítettünk és tároltunk, ennek köszönhetően az egész kód az összes változtatás történetével együtt böngészhető, letölthető a http://bificomp2.sote.hu:22422/comppi webcímen. Jelen dolgozatban ComPPI néven a ComPPI 1.1-es, 2014. október 9-én közzétett változatára utalok, mely összhangban van a kapcsolódó publikációnkkal is (Veres és mtsai, 2015).

Az informatikai infrastruktúra kialakítása során széles körben használt és tesztelt, jogi és anyagi szempontból szabadon elérhető eszközöket választottunk. A ComPPI forráskódja is teljes egészében nyílt. Ennek köszönhetően a szoftvercsomagot bárki egy egyszerű asztali számítógépen felépítheti, az eredményeket megismételheti. A rendszer belső működése is megismerhető, illetve az érdeklődők bekapcsolódhatnak a további fejlesztésekbe.

5.2.2. A RasGAPok jelátvitelének, valamint a tanulás és memória főbb jelpályáinak hálózatos integrációja

A Ras/MAPK jelpálya, valamint a tanulás és memória jelpályáinak hálózatát a ComPPI adatbázis alapján kézi gyűjtéssel publikációk és jelátviteli adatbázisok segítségével állítottam össze, a hálózatépítés folyamatát a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra. A RasGAPok lehetséges jelátvitelét, valamint a tanulás és memória főbb jelpályáit hálózatos megközelítésben gyűjtő adatbázis építésének folyamatábrája.
Az irodalomkutatás, a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes jelpálya-adatbázis és a ComPPI fehérje-fehérje interakciós adatbázis iteratív felhasználásával közös nevezéktanra hozott listákat hoztam létre, mely a RasGAPok, a tanulás és a memória jelátvitelében szerepet játszó legfontosabb molekulákat (javarészt fehérjéket) és egymással való interakcióikat tartalmazta. A közös UniProt (UniProt Consortium, 2015) nevezéktan ellenőrzéséhez annak fehérjeadatbázisát is felhasználtam. Az egységes nevezéktanú listákból már lehetséges volt egy összefüggő hálózat építése, melynek fehérjéihez kapcsolódó betegségeket további irodalomkutatással, a gyógyszercélpontokat pedig a DrugBank adatbázis (4.0 kiadás, 2014. január 1.; Law és mtsai, 2014) segítségével azonosítottam.

A kézi gyűjtés során elsősorban a Ras/MAPK, IP_3/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI_3K jelpályákra és a Ca^{2+} jelátvitelre, illetve ezek keresztbeszélgetéseire összpontosítottam. Forrásként a National Center for Biotechnology Information (NCBI) PubMed-Medline (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), a Google Scholar (http://scholar.google.com/), valamint a Mendeley Papers (http://www.mendeley.com/) publikációs adatbázisokat használtam. A felhasznált publikációkat a Bevezető 'A tanulás és memória fontosabb jelpályáinak kapcsolatai a Ras/MAPK jelpályával' fejezete részletesen tárgyalja. Minden felhasznált jelpálya vagy interakció esetén követelmény volt a kísérletes bizonyíték és az, hogy ne legyen a jelpálya neuronális jelenlétét kizáró publikáció (előnyben részesültek a neuronális expressziót leíró források). A jelpályák elsődleges forrása a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes volt (KEGG 71.0 kiadás, 2014. július 1.; Kanehisa és mtsai, 2014). Az irodalmi és interakciós

adatbázisokból származó forrásadatok alapján létrehoztam a molekulák és kapcsolataik listáját. Fehérjék esetében a UniProt nevezéktant használtam. Anorganikus vegyületek esetén képletük szolgált azonosítóul. Gének, illetve fehérjekomplexek esetében pedig egy absztrakt csúcs (melyet jellemzően a gén- vagy fehérjecsalád nevével jelöltem) képviselte az adott gént vagy fehérjekomplexet egy bizonyos szubcelluláris lokalizációban, mely csúcshoz az ismert fehérjéket UniProt azonosítóikkal hozzárendeltem. E megközelítés előnye, hogy izoforma-agnosztikus, képes géneket is fehérjeszinten reprezentálni, ugyanakkor a sejten belüli elhelyezkedést is figyelembe veszi.

A ComPPI adatbázisból a fehérjék kapcsolatairól, szubcelluláris lokalizációjáról és transzlokációjáról merítettem információkat. Szinonimaszótárának köszönhetően a nevezéktanok felderítésére és egyeztetésére, valamint az UniProt nevezéktan szerinti fehérjeazonosítók gyűjtésére is használtam.

A manuálisan ellenőrzött hálózati mag automatizált kiegészítésére Pythonban írtam szkripteket, mely a ComPPI-ból töltötte be a kurált mag első szomszédait. A hálózatelemzést szintén saját Python szkriptek segítségével végeztem, melyek a networkx 1.8 (https://networkx.github.io/) hálózatos kódkönyvtárat is használták.

Végül a fehérjék közül a lehetséges gyógyszercélpontokat a DrugBank adatbázis segítségével azonosítottam (4.0 kiadás, 2014. január 1.; Law és mtsai, 2014), a betegségekhez köthető gének fehérjéit pedig további irodalomkutatással határoztam meg.

5.2.3. Statisztikai elemzés, grafikonok és ábrák készítése

A kísérletes eredmények statisztikai elemzését és grafikonokon való ábrázolását az e célra írt programmal végeztem, melyet Python 3.4 programnyelvben készítettem el a numpy 1.8 numerikus könyvtár, a matplotlib 1.4 grafikus könyvtár, valamint a SciPy 0.13.3-as változatában implementált statisztikai modul felhasználásával. A szignifikanciát Welch-féle t-teszttel (Welch, 1947) és kettős ANOVA teszttel számítottam, a p érték minden esetben két oldalú t-tesztre utal, és amennyiben több adatpopuláció összehasonlítására vonatkozik, úgy mindig Bonferroni szerint korrigált.

A hálózatos ábrázoláshoz Cytoscape 3.0-át (Smoot és mtsai, 2011), a grafikai utómunkákhoz GIMP 2.8-at (http://gimp.org) használtam.

Az alkalmazott szoftverek, kódkönyvtárak és programnyelvek kivétel nélkül nyílt forráskódúak, széles körben használtak és szakértők tesztelték őket, mely elősegíti a magas szakmai minőséget és reprodukálhatóságot.

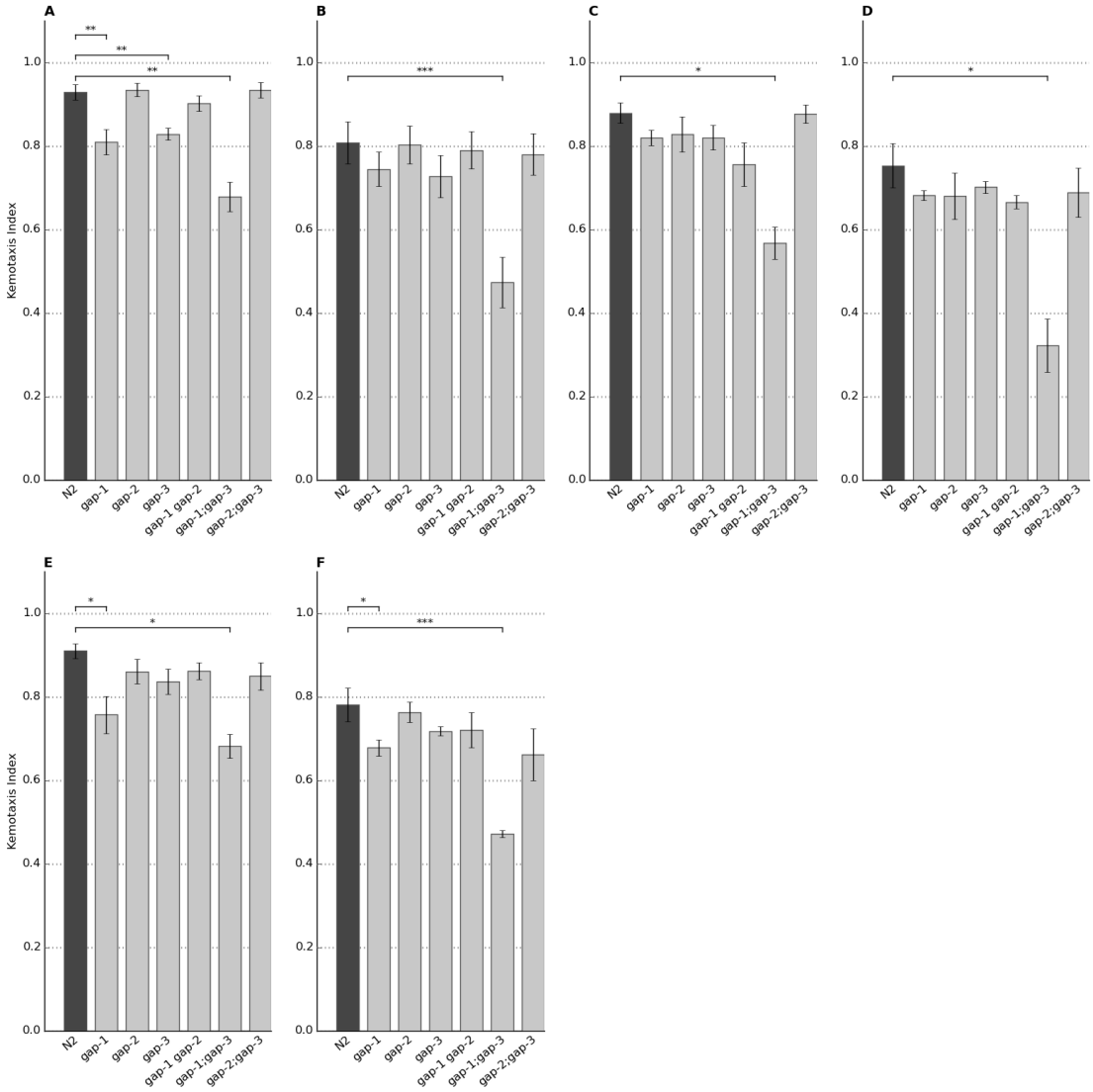
6. Eredmények

6.1. A *gap* mutánsok fenotipizálása

6.1.1. A *gap* funkcióvesztés hatása a *C. elegans* kemotaxisára

A tanulási és memóriatesztek a kemotaxistól függnek, mivel a környezeti információkat a férgek szaglás útján szerzik meg. A kemotaxis tesztek célja így az volt, hogy felmérjem a mutáns törzsek szaglását, valamint meghatározzam a tanulási tesztekben használandó illékony anyagot és annak koncentrációját. Egyes anyagok iránt a férgek ösztönös vonzódást mutatnak (attraktánsok), másokat pedig elkerülnek (repellensek). E viselkedés a kemotaxis indexszel számszerűsíthető, nagyobb számérték erősebb vonzódást jelent (részletes magyarázat található a '5. Módszerek' fejezet '5.1.2. Kemotaxis teszt' alfejezetében). Kísérleteimben a diacetilt, a benzaldehidet, valamint az izoamilalkoholt (attraktánsok) vizsgáltam, irodalmi adatokra, valamint együttműködő partnerünk korábbi eredményeire alapozva mindegyiket százszoros és ezerszeres hígításban (Nuttley és mtsai, 2002; Steták és mtsai, 2008, Hadziselimovic és mtsai, 2014). Az eredmények az 5. ábrán láthatóak.

Általánosan megállapítható, hogy a *gap* mutáns törzsek reagálnak a szaglási ingerekre (Gyurkó és mtsai, 2015b). A *gap-2(tm748)*, *gap-3(ga139)*, *gap-1(ga133) gap-2(tm748)* és *gap-2(tm748);gap-3(ga139)* mutánsok a vad típusnak megfelelő kemotaxis választ adtak diacetil, benzaldehid és izoamilalkohol alacsony és magas koncentrációjú oldata iránt egyaránt. A *gap-1(ga133)* mutáns esetében azonban csökkent vonzódás figyelhető meg magas koncentrációjú diacetil ($p=7{,}88\times10^{-3}$) és az izoamilalkohol mindkét koncentrációja iránt ($p=2{,}14\times10^{-2}$ a magas és $p=1{,}57\times10^{-2}$ az alacsony koncentráció iránt), miközben a benzaldehid iránti vonzódás érintetlen maradt. A *gap-3(ga139)* mutáns törzs esetében szintén csökkent vonzódást találtam magas koncentrációjú diacetil iránt ($p=2.45\times10^{-3}$), mely más kísérleti feltétel mellett nem volt megfigyelhető. A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* mutáns törzs az összes vizsgált attraktáns iránt kemoszenzoros defektust mutatott (7. ábra, A-F panelek, $p_A=1{,}80\times10^{-3}$, $p_B=1{,}17\times10^{-14}$, $p_C=1{,}74\times10^{-2}$, $p_D=2{,}35\times10^{-2}$, $p_E=1{,}83\times10^{-2}$, $p_F=6{,}46\times10^{-13}$).



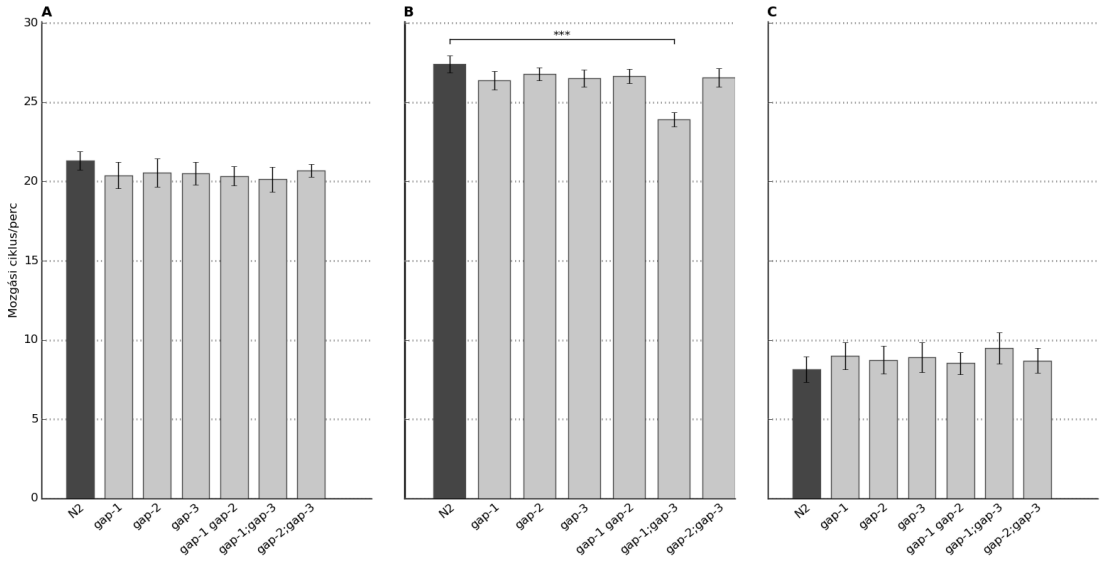
7. ábra. A különböző RasGAP izoformák szerepe a kemotaxisban.

(**A**) Diacetil 1:100 hígítása iránt csökkent vonzódást mutatnak a *gap-1(ga133)* ($p=7{,}88\times10^{-3}$), a *gap-3(ga139)* ($p=2{,}45\times10^{-3}$) és a *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* ($p=1{,}80\times10^{-3}$) mutációt hordozó törzsek. (**B**) Diacetil 1:1000, (**C**) valamint benzaldehid 1:100 és (**D**) 1:1000 hígítása iránt a *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* mutáns állatok kemoszenzoros defektust mutatnak ($p_B=1{,}17\times10^{-14}$, $p_C=1{,}74\times10^{-2}$, $p_D=2{,}35\times10^{-2}$). (**E**) 1:100 hígítású izoamilalkohol iránt a *gap-1(ga133)* ($p=2{,}14\times10^{-2}$) és a *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* ($p=1{,}83\times10^{-2}$) mutációt hordozó törzseket kemotaxis defektus jellemzi. (**F**) A *gap-1(ga133)* mutáns férgek kemotaxisa 1:1000 hígítású izoamilalkohol iránt csökkent ($p=1{,}57\times10^{-2}$). A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* mutáns törzs szintén kemotaxis defektussal bír ($p=6{,}46\times10^{-13}$). A bajuszvonalak standard devianciát, a csillagok szignifikanciaszintet jelölnek (* < 0,05, ** < 0,01, *** < 0,001).

A kemotaxis tesztek összefoglalásaként elmondható, hogy a *gap* mutánsok képesek kemotaxis válaszra. Főként a GAP-1 érintett e folyamatokban, elsősorban az izoamilalkohol és a diacetil magas koncentrációjának érzékelésében vesz részt. A *gap* mutációk egyike sem okozott azonban szignifikáns változást a diacetil alacsony koncentrációjának érzékelésében, ezáltal a szagláson alapuló negatív asszociatív tanulási és memóriakísérletekre nincsenek hatással. A diacetil ezerszeres hígítású oldata iránt megfigyelt válasz biztosította a kemotaxis index legelőnyösebben vizsgálható tartományát is: a válasz robusztus, mely jellemzően 0,8 körüli kemotaxis értéket jelent, ugyanakkor nem túl magas, vagyis az ingerekre adott, esetlegesen még erősebb pozitív válasz is jól megfigyelhető, statisztikailag elemezhető marad. E hígítás megegyezik a viselkedésbiológiai tesztekben széles körben használt, az irodalomban részletesen leírt tesztek kísérleti felállásával (Nuttley et al, 2002), valamint a törzsenként és összesítetten is magasabb kemotaxis index átlagnak köszönhetően a benzaldehiddel és izoamilalkohollal összehasonlítva is előnyösebbnek bizonyult. A fentiek alól egyedüli kivételt a *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* törzs jelent, melynél minden kísérleti feltétel esetén szignifikáns kemoszenzoros defektust igazoltam.

6.1.2. A *gap* mutációk nem befolyásolják a férgek mozgását

A viselkedési tesztek során megfigyelt eredményeket a szagláshoz hasonlóan bármely motoros defektus befolyásolhatja, ezért szükséges a mutáns férgek mozgásának vizsgálata is. Ez az egy percre eső mozgásciklusok számával jellemezhető (Sawin et al, 2000; Mohri et al, 2005).



8. ábra. A *gap* mutációk nem befolyásolják a motilitást.

(**A**) A *gap* mutáns férgek nyugalmi táplálkozási aktivitása az N2 vad típushoz viszonyítva. (**B**) A *gap* mutánsok és az N2 vad típus táplálékkereső aktivitása. A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* törzs csökkent mozgást mutat ($p=3{,}62\times10^{-13}$). (**C**) A *gap* mutációk nem befolyásolják az egy órát éheztetett férgek táplálkozási aktivitását. n=20 minden kísérleti felállásban, a bajuszvonalak standard deviációt, a csillagok Bonferroni-korrigált szignifikanciát jelentenek (*** < 0,001).

A *gap* mutánsok mozgását felmérő kísérletek eredményei a 8. ábrán láthatóak. Először a jól táplált állatokat a táplálékul szolgáló baktériumpázsiton vizsgáltam azért, hogy a nyugalmi táplálkozási aktivitást meghatározzam. Ezt követően a táplálékkereső magatartást számszerűsítettem úgy, hogy jól táplált állatokat helyeztem üres lemezekre. Végül az éhezés utáni táplálkozást figyeltem meg azáltal, hogy egy órát éheztetett férgeket helyeztem ismét baktériumpázsitra. A nyugalmi táplálkozó és az éheztetett állatok percenkénti mozgási ciklusai az N2 vad típusnak megfelelőek. A táplálékkereső állatoknál ugyanez elmondható, kivéve a *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* törzset, mely az átlagban mért 1,75 mozgási ciklus/perc különbséggel szignifikánsan csökkent motilitású ($p=3{,}62\times10^{-13}$). E különbségre magyarázatul szolgálhat a törzs kemoszenzoros defektusából származó csökkent táplálékkereső motiváció, ugyanis táplálkozó és éheztetett állapotban nem figyelhető meg ilyen mértékű eltérés.

Következtetésként levonható, hogy a törzsek mozgásszervrendszerét és annak neuronális vezérlését a *gap-1(ga133)*, *gap-2(tm748)*, *gap-3(ga139)*, *gap-1(ga133) gap-*

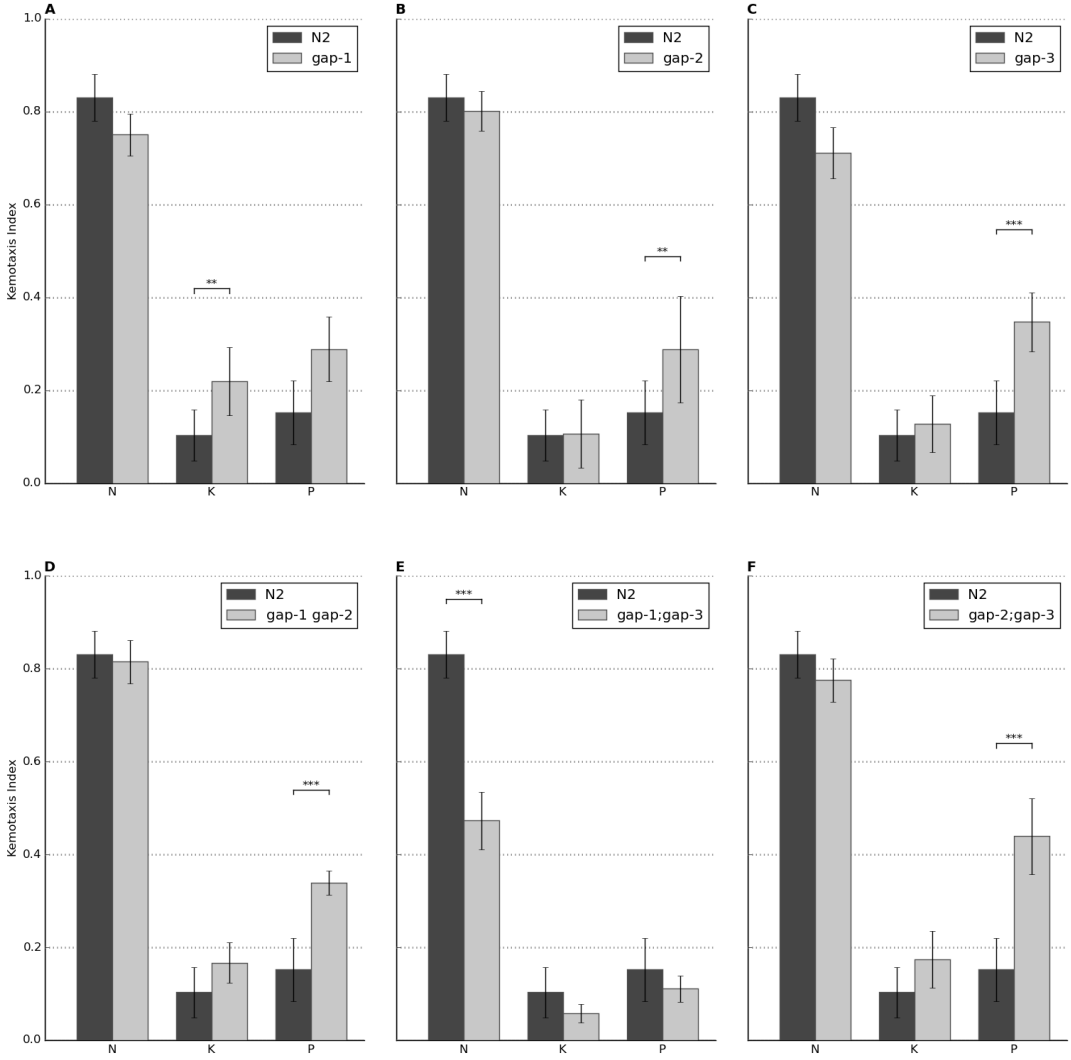
2(tm748), *gap-2(tm748);gap-3(ga139)* mutációk egyik kísérleti felállásban sem befolyásolják (Gyurkó és mtsai, 2015b). A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* törzset a már részletezett kemoszenzoros és lehetséges lokomotoros defektus miatt a további módszeres vizsgálatokból kizártam.

6.1.3. A RasGAPok komplex együttműködése szükséges a tanuláshoz és a rövid távú asszociatív memória kialakulásához

A szagló- és mozgatórendszer fentebb leírt kísérleteivel megállapítottam, hogy az egyszeres és kettős *gap* mutációk (a *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* kivételével) nincsenek hatással a negatív asszociáción alapuló, tanulást és rövid távú memóriát vizsgáló tesztekre. Ezek során a naiv férgek diacetil iránti ösztönös vonzódását a kondicionálási lépésben az éhezés negatív ingerével társítjuk, ezáltal elkerülő magatartás alakul ki, amely a naiv állapothoz képest csökkent kemotaxis indexben nyilvánul meg. A vad típus és a mutáns törzs ugyanazon kondicionált állapotban való összehasonlításával tehát a férgek tanulása jellemezhető.

A kondicionált állatok rövid távú asszociatív memóriáját fél órás pihentetés után teszteljük. Az így kapott eredményeket a vad típushoz hasonlítva a kevésbé emlékező állatoknál a megnövekedett vonzódás, vagyis magasabb kemotaxis index memóriazavarnak felel meg (bővebben: '5. Módszerek' fejezet '5.1.2. Kemotaxis teszt' és '5.1.4. A tanulás és rövid távú asszociatív memória tesztje').

A mutáns *gap* törzsek tanulását és rövid távú asszociatív memóriáját jellemző kísérleti eredményeket a 9. ábra és a 4. táblázat foglalja össze.



9. ábra. A RasGAPok komplex együttműködése szükséges az asszociatív tanuláshoz és rövid távú memóriához.

(**A**) A *gap-1(ga133)* mutáció tanulási defektushoz vezet (n=23, p=6,18×10^{-3}) a rövid távú memória érintettsége nélkül. (**B**,**C**,**D**,**F**) A rövid távú memória erős defektusa figyelhető meg a (**B**) *gap-2(tm748)* (n=33, p=1,34×10^{-2}), (**C**) *gap-3(ga139)* (n=23, p=2,75×10^{-7}), (**D**) *gap-1(ga133) gap-2(tm748)* (n=15, p=3,14×10^{-12}), és (**F**) *gap-2(tm748);gap-3(ga139)* (n=21, p=3,45×10^{-7}) mutáns állatoknál a tanulás szignifikáns defektusa nélkül. (**E**) A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* kettős mutáns tanulása és memóriája a kemoszenzoros defektusa miatt (n=24, p=8,02×10^{-13}) nem ítélhető meg. N: naiv, K: kondicionált, P: pihentetett állatok (5.1.4. fejezet). A bajuszvonalak a standard deviációt, a csillagok a szignifikanciaszintet jelzik (** < 0,01, *** < 0,001).

A kondicionálás, vagyis a diacetil jelenlétében történő 1 órás éhezés, nagy mértékben csökkentette mind a vad típusú, mind a mutáns férgek diacetil iránti vonzódását.

A *gap-1(ga133)* törzs ugyanakkor szignifikáns tanulási defektust mutat a vad típushoz képest ($p=6,18\times10^{-3}$, 9. ábra, A panel, 'K' jelölésű oszlopok). Ugyanezen törzsnél szignifikáns memóriadefektus is megfigyelhető ($p=9,7\times10^{-6}$), mely azonban a tanulási defektus következménye is lehet. Ennek tisztázására elemeztem a memória romlásának mértékét úgy, hogy kettős ANOVA teszttel összehasonlítottam a vad típusú és a *gap-1(ga133)* mutáns állatok kondicionált és pihentetett állapotát. A vizsgálat eredménye szerint a különbség statisztikailag nem szignifikáns, vagyis a vad típus és a mutáns memóriafunkciójának különbsége a tanulási defektus következménye. Összességében tehát a GAP-1 a tanulási folyamatban játszik szerepet.

A *gap-2(tm748)* törzsnél tanulási defektus nincs, azonban memóriadefektus mérhető ($p=1,34\times10^{-2}$, 9. ábra, B panel).

A *gap-3(ga139)* törzsnél szintén szignifikáns memóriadefektust találunk ($p=2,75\times10^{-7}$, 9. ábra, C panel) tanulási zavar nélkül.

Az egyszeres mutánsok mellett azt is megvizsgáltam, hogy a gének kombinált kiütése milyen hatást okoz. A *gap-1(ga133) gap-2(tm748)* ($p=3,14\times10^{-12}$) és a *gap-2(tm748);gap-3(ga139)* kettős mutáns törzsnél ($p=3,45\times10^{-7}$) egyaránt a rövid távú memória defektusa figyelhető meg (9. ábra, D és F panel).

A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* kettős mutáns törzs esetében feltételezhető volt, hogy a kemoszenzoros defektus miatt a tanulási és memóriafunkció nem lesz értékelhető, ezt a kísérletek igazolták is. A vad típushoz viszonyított alacsony kemotaxis indexek kondicionált és pihentetett állapotban tehát nem egy „szupertanuló” vagy „szuperemlékező” törzset jelentenek, hanem a kemotaxis zavarának következményei (9. ábra, E panel).

Az eredmények összességében azt jelzik, hogy a GAP-1 elsősorban a tanulásban, míg a GAP-2 és GAP-3 főképp a rövid távú memória molekuláris folyamataiban játszik szerepet (Gyurkó és mtsai, 2015b).

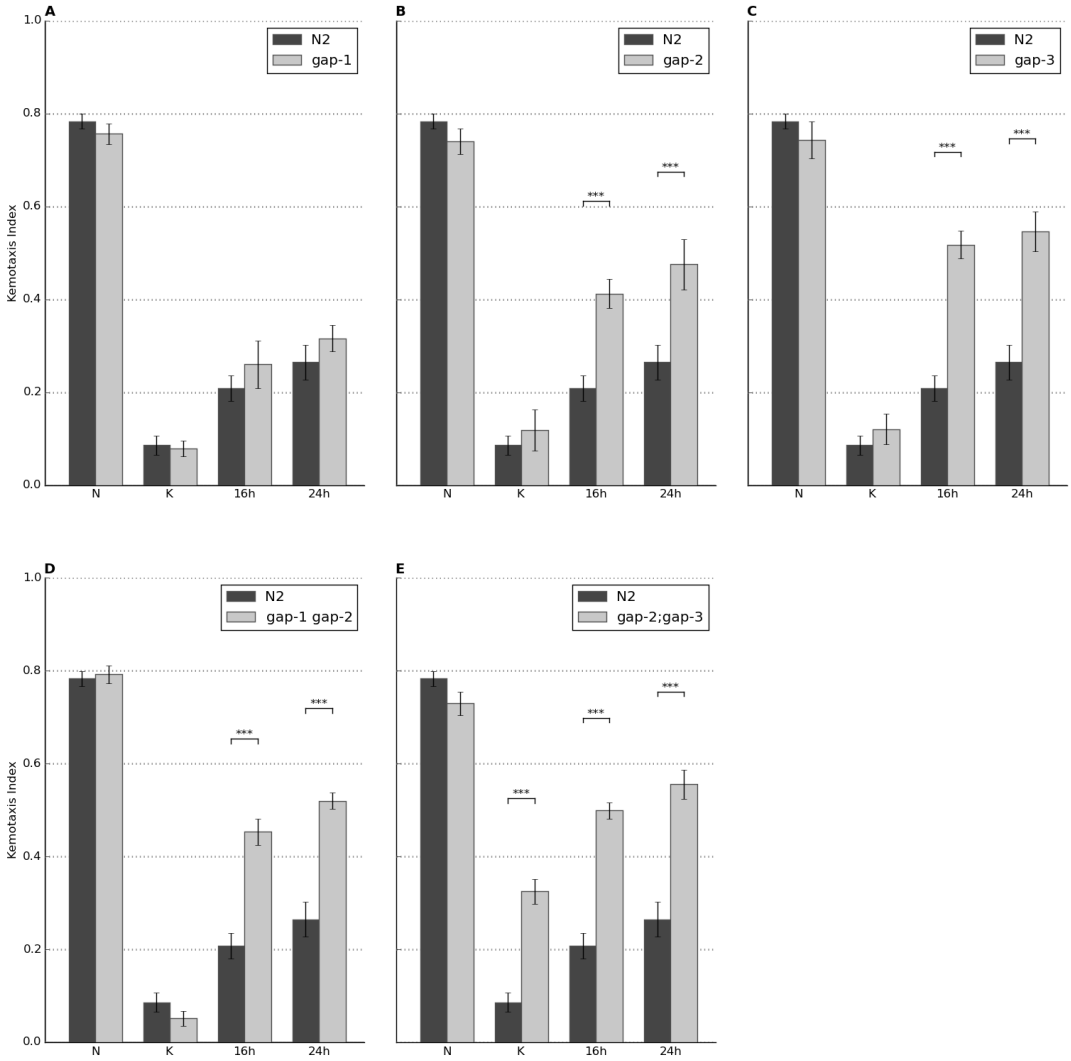
6.1.4. A RasGAPok szerepet játszanak a hosszú távú memória kialakulásában

A RasGAPok szerepét a rövid távú memória mellett a hosszú távú asszociatív memóriában is megvizsgáltam. E kísérletek során háromszor ismételtem meg a kondicionálást, mindegyik alkalommal 30 percnyi, táplálkozással egybekötött regenerálódást lehetővé téve a férgeknek, majd közvetlenül a három kondicionálás után, illetve 16 és 24 órával később végzett tesztekkel vizsgáltam a vonzódásukat alacsony koncentrációjú diacetil iránt. Az eredményeket a 10. ábra és a 4. táblázat foglalja össze.

A *gap-1(ga133)* törzs esetében a rövid távú asszociatív memória vizsgálatánál megfigyelt tanulási zavar e kísérletek során nem volt mérhető (10. ábra, A panel). A jelenség lehetséges magyarázata a háromszori kondicionálás szemben a rövid távú memória tesztelésénél használt egyetlen kondicionálással.

A hosszú távú asszociatív memória robosztus zavara volt azonban megfigyelhető a *gap-2(tm748)* ($p_{16ó}=5{,}61\times10^{-7}$, $p_{24ó}=6{,}89\times10^{-5}$), *gap-3(ga139)* ($p_{16ó}=9{,}33\times10^{-15}$, $p_{24ó}=1{,}67\times10^{-10}$), *gap-1(ga133) gap-2(tm748)* ($p_{16ó}=2{,}53\times10^{-4}$, $p_{24ó}=5{,}18\times10^{-8}$) és *gap-2(tm748);gap-3(ga139)* ($p_{16h}=3{,}57\times10^{-13}$, $p_{24h}=7{,}93\times10^{-7}$) törzsek mindegyikénél. Utóbbi törzs tanulási defektussal is rendelkezik ($p=8{,}70\times10^{-7}$) (Gyurkó és mtsai, 2015b).

A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* kettős mutáns törzsnél a kemoszenzoros defektus kizárta a hosszú távú asszociatív memória értékelését.



10. ábra. A RasGAPok szerepet játszanak a hosszú távú memória kialakulásában.

(**A**) A *gap-1(ga133)* mutánsok nem mutatnak szignifikáns tanulási vagy hosszú távú memória defektust (n=5). (**B**) A *gap-2(tm748)* (n=12, $p_{16ó}=5{,}61\times10^{-7}$, $p_{24ó}=6{,}89\times10^{-5}$), (**C**) *gap-3(ga139)* (n=15, $p_{16ó}=9{,}33\times10^{-15}$, $p_{24ó}=1{,}67\times10^{-10}$), (**D**) *gap-1(ga133) gap-2(tm748)* (n=6, $p_{16ó}=2{,}53\times10^{-4}$, $p_{24ó}=5{,}18\times10^{-8}$) mutánsok mindegyike kifejezett hosszú távú memóriazavarban szenved, mint ahogy a (**E**) *gap-2(tm748);gap-3(ga139)* (n=9, $p_{16h}=3{,}57\times10^{-13}$, $p_{24h}=7{,}93\times10^{-7}$) is, melynek ráadásul tanulási defektusa is van ($p=8{,}70\times10^{-7}$). N: naiv, K: kondicionált, P: pihentetett állatok (5.1.5. fejezet). A bajuszvonalak a standard deviációt, a csillagok a szignifikanciaszintet jelölik (*** < 0,001).

4. táblázat. A *gap* gének mutációival kapcsolatban megfigyelt fenotípusok.

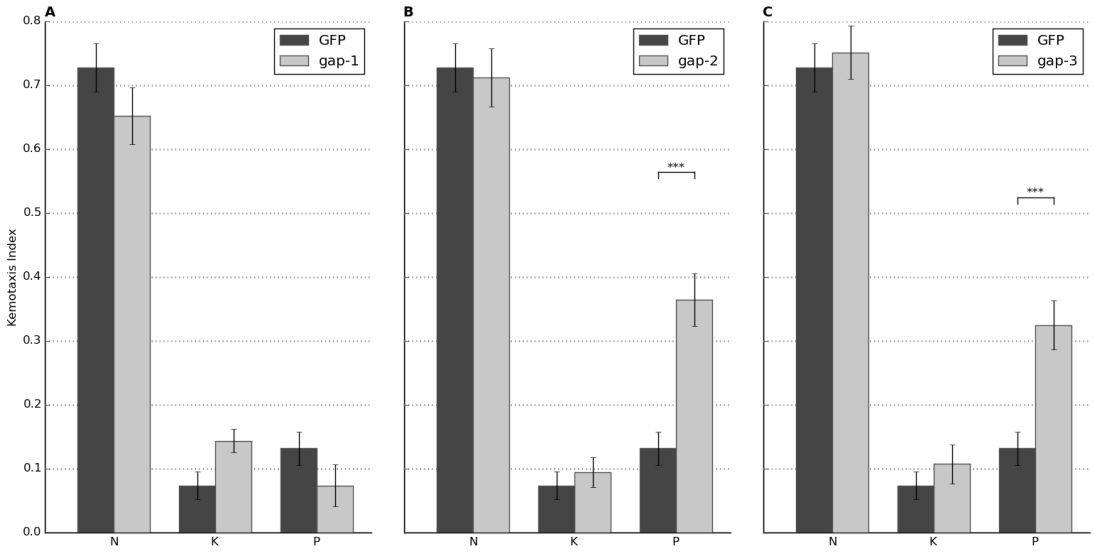
A vad típussal megegyező fenotípust 'OK', a mutáns fenotípust 'Defektus' jelöli az érzőrendszer (Érzőrsz.), mozgatórendszer (Mozgatórsz.), tanulás, rövid távú asszociatív memória (RTAM) és hosszú távú asszociatív memória (HTAM) vonatkozásában.

	Érzőrsz.	Mozgatórsz.	Tanulás	RTAM	HTAM
gap-1	OK	OK	Defektus	OK	OK
gap-2	OK	OK	OK	Defektus	Defektus
gap-3	OK	OK	OK	Defektus	Defektus
gap-1 gap-2	OK	OK	OK	Defektus	Defektus
gap-1;gap-3	Defektus	OK*	N/V	N/V	N/V
gap-2;gap-3	OK	OK	Defektus	Defektus	Defektus

* A *gap-1(ga133lf);gap-3(ga139lf)* mutációt hordozó törzsnél táplálékkereső magatartás során megfigyelt motoros defektusra a kemoszenzoros zavar magyarázatul szolgál.

6.1.5. A *gap* gének szerepeinek validálása géncsendesítéssel és mentett vonalakkal

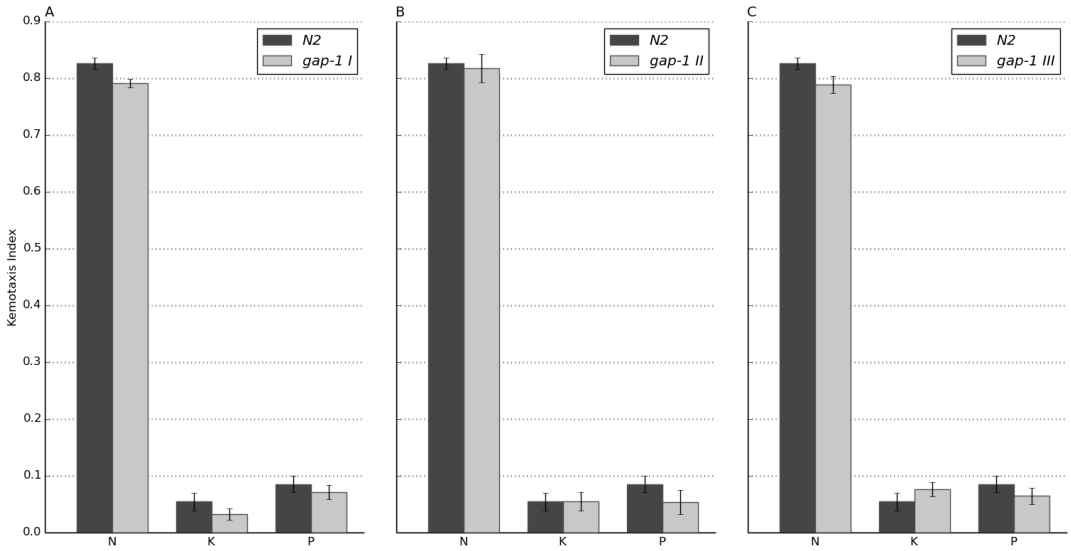
A *gap* gének tanulással és memóriával kapcsolatos fenotípusainak független megerősítésére géncsendesítést végeztem RNS interferencia segítségével. A vad típussal megegyező fenotípusú, KP3948 nevű, *eri-1(mg366);lin-15B(n744)* genotípusú teljestest RNS-szenzitív törzset (Sieburth és mtsai, 2005) *gap-2*, illetve *gap-3* kettős szálú RNS-t hordozó baktériummal tápláltam. A *gap-2* és *gap-3* dsRNS-t táplálkozó KP3948 férgek rendre a *gap-2(tm748)*, illetve *gap-3(ga139)* mutációt hordozó törzsekkel megegyező fenotípust mutattak, vagyis a feltárt tanulási és memóriadefektusokat valóban a *gap* gének mutációja okozta (11. ábra). Ez a vizsgálat egyben annak esélyét is minimalizálta, hogy a fehérjék N terminális felőli, a deléció által nem érintett szakaszából maradjon valamilyen funkcióval rendelkező fehérjetöredék.



11. ábra. A GAP-2 és GAP-3 RNS interferencia általi csendesítése a *gap* mutáns fenotípusok fenokópiáját eredményezi.

A grafikonok az *eri-1(mg366);lin-15B(n744)* genotípusú KP3948 teljestest RNS-szenzitív törzsek (Sieburth és mtsai, 2005) tanulási és memóriatesztjeinek eredményeit mutatják, miután a férgek (**A**) *gap-1* (n=3), (**B**) *gap-2 (n=13, p=2,72×10^{-7})* és (**C**) *gap-3 (n=9, p=3,75×10^{-5})* elleni kettős szálú RNS-t tartalmazó baktériummal táplálkoztak. Kontrollként inzert nélküli, „üres vektort" tartalmazó baktériummal táplált KP3948 törzs szolgált. N: naiv, K: kondicionált, P: pihentetett férgek. A bajuszvonalak standard deviációt, a csillagok szignifikanciaszintet jelölnek (*** < 0,001).

A *gap-1* gén csendesítése nem szignifikáns tanulási defektusra, valamint javult memóriára jellemző fenotípust eredményezett. A nem egyértelmű fenotípus miatt a validálást mentett vonalak létrehozásával folytattam, *gap-1(ga133)* mutációt hordozó férgekbe mikroinjektáltam a *gap-1* génjét (bővebben: '5. Módszerek' fejezet, '5.1.6. Transzgén *gap-1(ga133);sur-5::mDsRed* állatok létrehozása' alfejezet). A *gap-1(ga133);sur-5::mDsRed* genotípusú törzsek három független vonalával végzett tanulási és memóriatesztek a vad típussal megegyező fenotípust tártak fel, vagyis a *gap-1(ga133)* mutáns törzsbe visszajuttatott *gap-1* gén a tanulási defektust megszüntette, a normál tanulási funkciót helyreállította (12. ábra).



12. ábra. A *gap-1* gén mikroinjektálása menti a funkcióvesztő *gap-1* fenotípust.

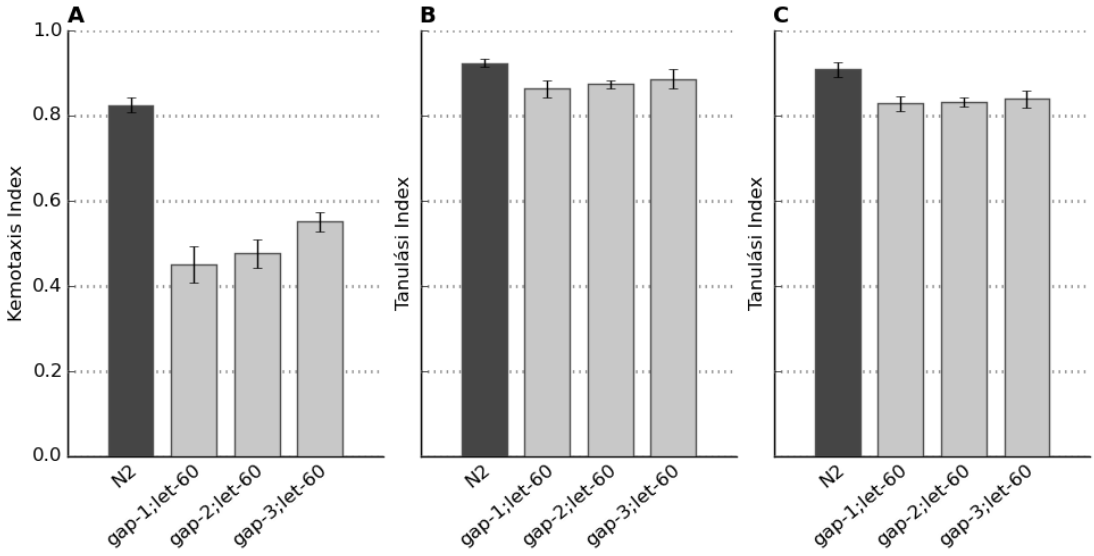
A *gap-1(ga133);sur-5::mDsRed* genotípusú, visszajuttatott *gap-1* gént hordozó törzsek három izolált vonalával (**A**, **B**, **C**) végzett tanulási és memóriatesztekben a vonalak egyike sem mutatott szignifikáns eltérést a kontrollként szolgáló vad típushoz képest. N: naiv, K: kondicionált, P: pihentetett állatok (5.1.4. fejezet), a bajuszvonalak standard deviációt jelölnek.

Összefoglalva tehát elmondható, hogy RNS interferencián alapuló géncsendesítés és mentett vonalak segítségével a megfigyelt mutáns fenotípusok és a *gap* gének közötti kapcsolat megerősítést nyert.

6.1.6. A *let-60* gén szükséges a megfigyelt funkcióvesztő *gap* fenotípusokhoz

A RasGAPok növelik a Ras fehérje intrinsic GTPáz aktivitását, ezáltal negatívan szabályozzák annak jelátvitelét (Trahey és McCormick, 1987; Bernards, 2003). A funkcióvesztő *gap* mutáció ezzel szemben megnövekedett Ras aktivitáshoz vezet (Malumbres és Barbacid, 2003). Ezen irodalmi adatok alapján felmerül, hogy a *gap* mutációkat és a LET-60 *C. elegans* Ras fehérjét kódoló génnek, a *let-60*-nak funkciócsökkentő mutációjával kombináljam, mivel a *gap* mutáció okozta túlműködést a *let-60* alulműködése kompenzálhatja. A hipotézis igazolására elvégzett kísérletek valóban azt mutatják, hogy a *gap-1(ga133);let-60(n2021)*, *gap-2(tm748);let-60(n2021)* és *gap-3(ga139);let-60(n2021)* kettős mutáns törzseknek nincs sem tanulási, sem memóriadefektusa (13. ábra). A *let-60* mutáció önmagában is kemoszenzoros

defektushoz vezet (Hirotsu et al, 2000), amely megfigyelhető a kettős mutáns törzseknél is (13. ábra, A panel).



13. ábra. A *let-60* gén szükséges a *gap* mutáns törzseknél megfigyelt tanulási és memória-fenotípusokhoz.

A grafikonok a tanulás és rövid távú memória tesztjének eredményeit mutatják a (**A**) naiv állatok kemotaxis indexeiként, illetve a (**B**) kondicionált és (**C**) pihentetett állatok tanulási indexeiként N2 vad típus és *gap(lf);let-60(hf)* kettős mutánsok esetén. N: naiv, C: kondicionált, P: pihentetett állatok (5.1.4. fejezet). A függőleges bajuszvonalak a standard deviációt jelzik. Az összehasonlíthatóság érdekében a tanulási index számítása mindkét esetben a ($TI = [KI_{kondicionált} – KI_{naiv}] / Ki_{naiv}$) formulával történt.

6.2. ComPPI, a kompartmentalizált fehérje-fehérje interakciós adatbázis

6.2.1. Adatintegráció

A ComPPI (Compartmentalized Protein-Protein Interaction Database) egy fehérjéket, kapcsolataikat és szubcelluláris lokalizációjukat hálózatos megközelítésben gyűjtő, integrált adatbázis, valamint elemző és kiszolgáló szoftvercsomag (Veres és mtsai, 2015).

A nagy kapacitású kísérletek hatalmas adatmennyiséget generálnak. Az eredményeknek azonban csak töredéke érhető el nyilvános adatbázisokban, és ezek is

eltérő nevezéktanok szerint, szétszórva, nem ritkán jogilag is bizonytalan háttérrel férhetőek hozzá. Az adatbázisok átfedése csekély (Cusick és mtsai, 2009), emiatt nagy mennyiségű létező ismeret maradhat figyelmen kívül különálló források használata esetén. Az adatok sokfélesége és több forrásra való tagozódása miatt a köztük lévő átfedésekből nyerhető adatminőség-javulás kihasználatlan. Több forrás feldolgozásakor pedig a kézi gyűjtés a fentebb tárgyalt okok miatt rendkívül időigényes, miközben a folyamat számos része teljesen automatizálható.

E kihívásokra válaszul készítettük a ComPPI adatbázist. Fő feladataim az adatbázis kereshetőségét, letöltését és az adatok megjelenítését biztosító honlap, a letölthető adatkészletek, valamint az adatelemzéshez szükséges kódháttér elkészítése volt. Létrehoztam egy Python szoftverkönyvtárat is, mellyel a ComPPI számítógépes memóriában nagy teljesítményű hálózatként felépíthető, kereshető és tetszőlegesen szűrhető. Emellett bioinformatikai és biológiai hátterű döntésekben, az architekturális tervezésben, valamint a kapcsolatok és lokalizációk megbízhatóságát leíró pontértékek optimalizációjának tervezésében vettem részt. Jelen munkában a munkamegosztásnak köszönhetően az adatbázis felépítését és a lokalizációs adatokból fakadó előnyöket csak érintőlegesen tárgyalom, és egy használati példát, illetve az adatbázis segítségével nyert további eredményeket mutatom be. Az adatbázisról gazdag leírás érhető el annak honlapján (http://comppi.linkgroup.hu).

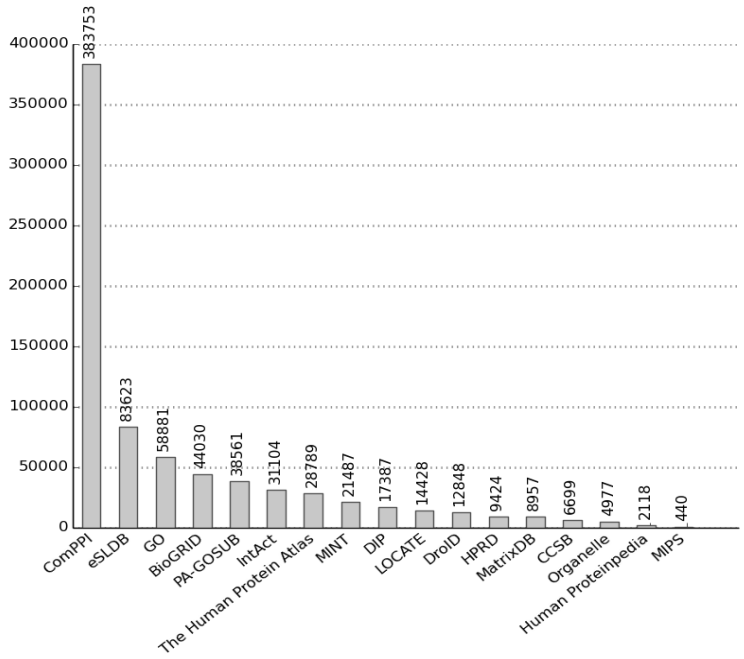
A ComPPI *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans* és *S. cerevisiae* fajokra vonatkozóan tartalmaz fehérje-fehérje interakciós és szubcelluláris lokalizációs adatokat.

Minden forrás-adatbázishoz létezik egy interfész, melynek segítségével a forrásadatokat feldolgozzuk és betöltjük egy központi adattárolóba. A forrásadatbázisok letöltése és feldolgozása után a fehérjéket, interakcióikat és lokalizációikat egyaránt egyeztetjük egymással. Például több különböző nevű forrásfehérje is jelentheti biológiailag ugyanazt a fehérjét, ekkor előre meghatározott nevezéktan szerint az összes nevet egyetlen névre fordítjuk (a legtöbb esetben UniProt nevezéktanra, http://uniprot.org). E megközelítés főbb előnyei, hogy (a) a biológiailag átfedő, de különböző nevű fehérjék, interakciók vagy lokalizációk a ComPPI-ban egyetlen elemet

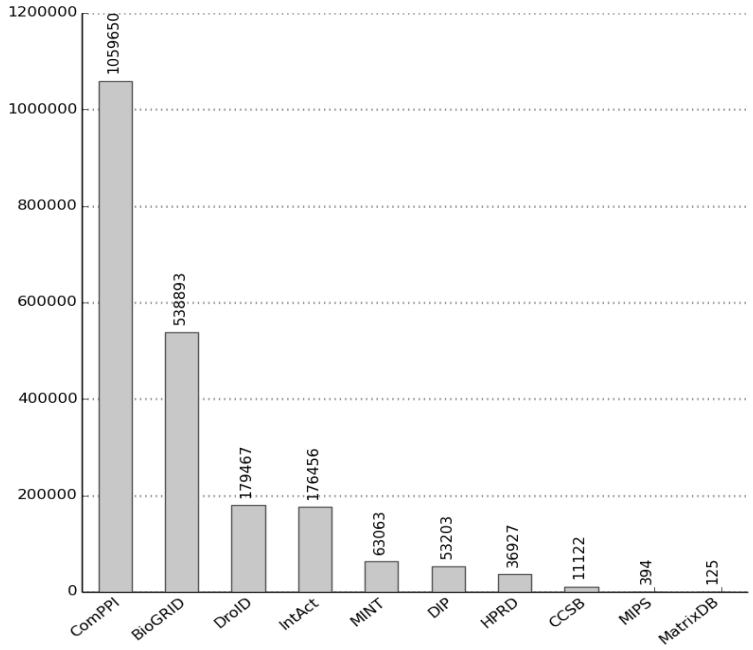
fognak képviselni, vagyis javul az adatminőség, (b) a nevezéktanok közti megfeleltetéseket elég egyszer kézzel elvégezni, (c) a jövőbeni adatfrissítések minimális emberi beavatkozás mellett is elvégezhetőek, (d) további forrásadatbázisok hozzáadásához elég csupán egy új interfészt bevezetni, és ezek következtében (e) a fenntartás és karbantartás erőforrás-igénye a lehető legalacsonyabb.

A ComPPI-ban 9 fehérje-fehérje interakciós adatbázisból és 8 szubcelluláris lokalizációs adatbázisból egységesítettünk és szinkronizáltunk adatokat (14. és 15. ábra). Ennek eredménye a 383.753 fehérjét, 1.059.650 interakciót, valamint 195.815 lokalizációt tartalmazó adatkészlet, mellyel a legnagyobb nyílt fehérje-fehérje interakciós adatbázis.

A források csekély átfedését jól mutatja, hogy egyetlen fehérje sem volt, amely a fehérjéket szolgáltató adatbázisok mindegyikében előfordult volna úgy, hogy fajra vonatkozóan semmiféle megkötést nem tettünk. Mindössze 301 fehérje található meg mindegyik adatbázisban akkor, ha csak azon forrásokat nézzük, melyek között bármely kettő átfedése legalább 5.000 fehérjényi. E 301 fehérje mindössze 0.9%-a a teljes 383 753 fehérjényi adatkészletnek, a legtöbb fehérjét szolgáltató eSLDB is csupán 22%-át biztosítja az integrált adatkészletnek. A névterek megfeleltetéseinek és technikai korlátoknak köszönhetően ugyanakkor a forrásadatbázisok jóval több fehérjét is tartalmazhatnak annál, amennyit a ComPPI keretében integráltunk belőlük.



14. ábra. A ComPPI-ban megtalálható összes fehérje száma, illetve az ezeket biztosító források a szolgáltatott adatmennyiség szerint csökkenő sorrendben.



15. ábra. A ComPPI-ban megtalálható összes interakció, illetve az adatokat biztosító források a szolgáltatott adatmennyiség szerint csökkenő sorrendben.

Az adatminőség tovább javítható a lokalizációs adatok figyelembe vételével is, ugyanis a kísérletesen meghatározott kapcsolatok sok esetben figyelmen kívül hagyják a fehérjék lokalizációját, vagyis *in vitro* fizikailag lehetséges, de *in vivo* biológiailag valószínűtlen interakciók is bekerülnek az adatbázisokba.

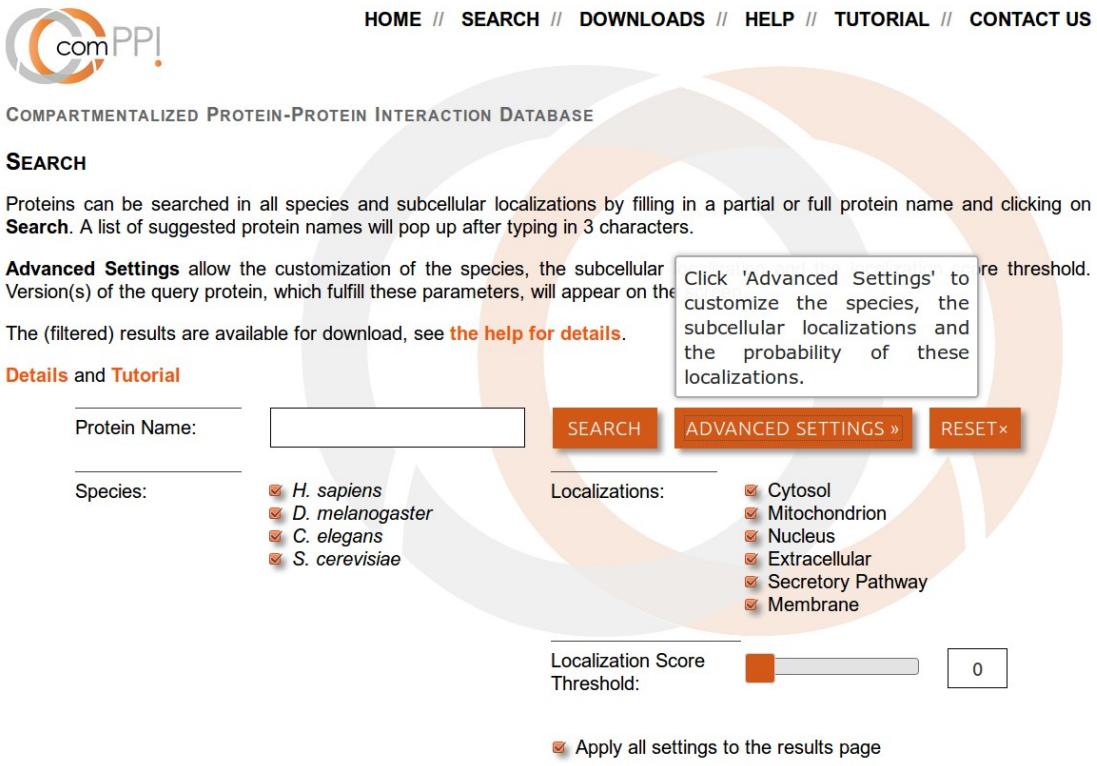
A több, mint 1.600 lehetséges szubcelluláris lokalizáció hierarchikus fába történő egyszeri, kézi rendezésével lehetővé vált, hogy az összes lokalizációs adatot (közel 200.000 rekord) automatizáltan e fa egyes elemeinek feleltessük meg. A fa hat nagy kompartmentbe csoportosítja a lokalizációkat, ezek a citoszol, mitokondrium, sejtmag, szekretoros rendszer, membránok, és az extracelluláris tér. Az egységes nevezéktanú központi tárolóval és az egyértelmű lokalizációs megfeleltetésekkel már létre tudtunk hozni két mérőszámot, a lokalizációs és az interakciós pontot (http://comppi.linkgroup.hu/help/scores). A lokalizációs pont értéke azt írja le, hogy egy fehérje milyen valószínűséggel található a hat fő kompartment egyikében, az interakciós pont pedig két fehérje kapcsolatának valószínűségét jellemzi. Utóbbi értékébe beleszámítanak a kompartmentenkénti lokalizációs pontok is, vagyis két fehérje kapcsolata akkor lesz nagy valószínűséggel valós, ha például mindkettő a citoszolban van, vagy például mindkettő citoszolikus és nukleáris jelenlétére egyaránt van megbízható adat (így tehát a transzlokálódó fehérjék sem kapnak alacsonyabb interakciós pontot). A pontok bevezetése egyben a kísérletes, számítógépesen előrejelzett és ismeretlen adatforrások súlyozását is lehetővé teszi, hisz például a kísérletesen többszörösen megerősített adatok vélhetően megbízhatóbbak, mint az ismeretlen módszerrel előállított adatok. E súlyoknak olyan kombinációját állítottuk be, amely egyszerre maximalizálja a csak megbízható kísérletes adatokat tartalmazó referencia adatkészlet (pozitív kontroll) interakciós pontértékeit, miközben ugyanakkor minimalizálja is a referencia adatkészletet nem tartalmazó ComPPI adatkészlet interakciós pontértékeit (http://comppi.linkgroup.hu/help/scores#scoreopt). Ezen eloszlások biztosítják, hogy a számításaink során magas interakciós pontértéket kapó fehérje-fehérje kapcsolatok jellemzői a lehető legközelebb álljanak a kísérletesen valóban megbízhatónak ítélt interakciókhoz.

Végső soron tehát a ComPPI adatbázisként fehérjéket, ezek irányítatlan kapcsolatait és szubcelluláris lokalizációit tartalmazza egységesített nevezéktan szerint

egy központi tárolóban, valamint az adatok biológiai valószínűségét jellemzi az interakciós és a lokalizációs pont segítségével. Lehetővé teszi az adatok felhasználóbarát keresését, letöltését, valamint előre megírt parancssori programokkal direkt hozzáférésüket is.

6.2.2. Felhasználóbarát keresés a keresőrendszerrel

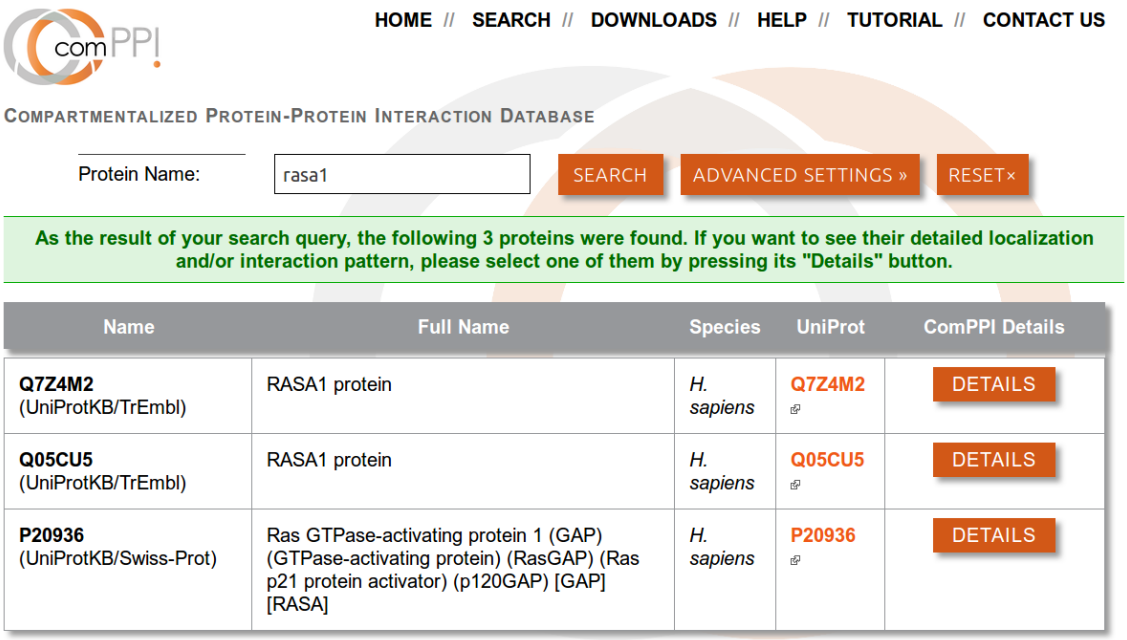
A ComPPI kialakítása során külön figyelmet szenteltünk annak, hogy bioinformatikai szaktudás nélkül is elérhetőek legyenek az adatok. Ezt egy intelligens keresőrendszer, on-line oktatóanyagok és részletes súgók támogatják.



16. ábra. A ComPPI weboldalának keresőfelülete.

A keresőrendszerben (http://comppi.linkgroup.hu/fehérje_search, 16. ábra) kezdjük el begépelni a keresett fehérje nevét. A ComPPI képes számos nevezéktan és alternatív név automatikus felismerésére, így három karakter begépelése után úgynevezett *autocomplete* funkcióként keresési javaslatok listája jelenik meg.

A keresést testre is szabhatjuk az 'Advanced Settings' gomb megnyomására megjelenő űrlapon. Beállítható tetszőleges kombinációban a négy faj, illetve a hat fő kompartment is (citoszol, mitokondrium, sejtmag, szekretoros rendszer, membránok, extracelluláris tér). A lokalizációs pont küszöbértéke is meghatározható egy csúszkán, a találatokban csak a küszöb feletti pontértékkel rendelkező fehérjék fognak megjelenni. Végül mindezen beállítások átörökíthetőek a találati oldalra is, vagyis nem csak a keresett fehérjere, de annak interaktoraira is érvényessé tehetőek.



17. ábra. A köztes találatválasztó oldal fehérjekeresés esetén.

Több találat esetén egy köztes találatválasztó oldalra jutunk, ahol a keresési feltételeket teljesítő fehérjék felsorolását kapjuk elterjedt neveikkel, UniProt azonosítójukkal, valamint közvetlen weblinkkel a UniProt adatbázis honlapjára (17. ábra). A szinonimák és az UniProt link nagyban leegyszerűsíti ismeretlen fehérjék beazonosítását.

E felsorolásból választva, illetve egyetlen találat esetén közvetlenül is a kért fehérje adatlapjára jutunk, melynek főbb részei a fehérje névjegye, interaktorainak hálózata és azok részletes listája (18. ábra, A és B panelek). A névjegy megjeleníti a keresett fehérje összes tárolt nevét, UniProt azonosítóját, illetve a lokalizációkat.

Minden lokalizáció hat jellemzővel bír, ezek (1) a fő kompartment (például 'citoszol'), (2) nagy felbontású lokalizáció (amelyet a fő kompartmentbe besoroltunk, például 'citoszol perinukleáris régiója'), (3) a lokalizáció pontértéke 0-1 skálán, (4) a fehérjét az adott lokalizációba soroló kísérlet típusa (például 'Kísérletes: annotált fehérjeexpresszió'), (5) forrásadatbázis, (6) forrást vagy kísérletet leíró cikk hivatkozása.

18. ábra. A találati oldal egyes részei (A) a keresett fehérje adataival és (B) interaktorainak részletes listájával.

Az interaktorok hálózata grafikus formában ábrázolja a keresett fehérjéhez kapcsolódó további fehérjéket. Az interaktorok részletes listája ugyanakkor minden adatot megjelenít, így a kapcsolódó fehérjék összes nevét, a fentebb részletezett formában lokalizációikat, valamint az interakció pontértékét is, vagyis azt a mérőszámot, mely leírja, hogy a szubcelluláris lokalizációkat is figyelembe véve mennyire valószínű a két fehérje kapcsolata.

A találati oldal adatai a már tárgyalt keresési feltételeken túl tovább szűrhetőek. Beállítható a hat fő kompartment tetszőleges kombinációban, valamint az interakciós és lokalizációs pont küszöbértéke is, így a keresett fehérjéről és interaktorairól megjelenített adatok a kutató igényei szerint szűkíthetőek. A fehérjekeresés eredménye

táblázatkezelő programok által ismert CSV (comma separated value, vesszővel elválasztott szöveges állomány) formátumban le is tölthető, így az adatgyűjtés bioinformatikai szaktudás nélkül is lehetséges. A használatban mindenütt helyzetérzékeny súgók segítenek, melyek akkor jelennek meg, ha az egeret a fentebb leírt honlapelemek fölé visszük.

6.2.3. Letölthető adatkészletek

A keresés a fókuszált, gyors, kis léptékű adatfeldolgozásra a legalkalmasabb. A ComPPI-ban tárolt adatok ugyanakkor előre összerakott adatkészletekként, valamint egészében is letölthetőek, mely lehetővé teszi a bioinformatikai szaktudással rendelkezők számára, hogy nagy léptékben is dolgozhassanak az adatokkal, saját számítógépükön létrehozzák a ComPPI fehérjehálózatát, vagy akár reprodukálhassák az egész adatbázist.

Az előre összeállított adatkészletek három csoportba sorolhatóak, ezek a kompartmentalizált interaktómok, az integrált fehérje-fehérje interakciós adatkészletek, valamint az integrált szubcelluláris lokalizációs adatkészletek. A kompartmentalizált interaktómok azon fehérjék hálózatai, melyek mindegyikének szigorúan a hat fő kompartment közül egyben vagy többen megtalálhatónak kell lennie (például a sejtmagi fehérjék hálózata). Ezen adatkészletek különösen alkalmasak egy adott sejtkompartmentum fehérjéinek és azok egymáshoz való viszonyának vizsgálatára, valamint több sejtkompartmentum fehérjéinek, így például transzlokálódó fehérjék hálózatos elemzésére. Az integrált fehérje-fehérje interakciós adatkészletek ezzel szemben nem tesznek különbséget a lokalizációk között, vagyis a lokalizációs adattal nem rendelkező fehérjéket és kapcsolataikat is magukban foglalják, emiatt a fehérjék kapcsolatait, a lehetséges jelátviteli útvonalakat célzó vizsgálatokhoz a legalkalmasabbak. Végül az integrált szubcelluláris lokalizációs adatkészletek a fehérjéket nagy részletességű lokalizációs adatokkal együtt tartalmazzák, az interakciókat azonban nem, így ezek legfőképp a fehérjék szubcelluláris elhelyezkedésével kapcsolatos kutatásokhoz készültek.

Az adatbázis egésze is letölthető Structured Query Language (SQL) formátumban, valamint a tudományos reprodukálhatóság érdekében a korábban kiadott

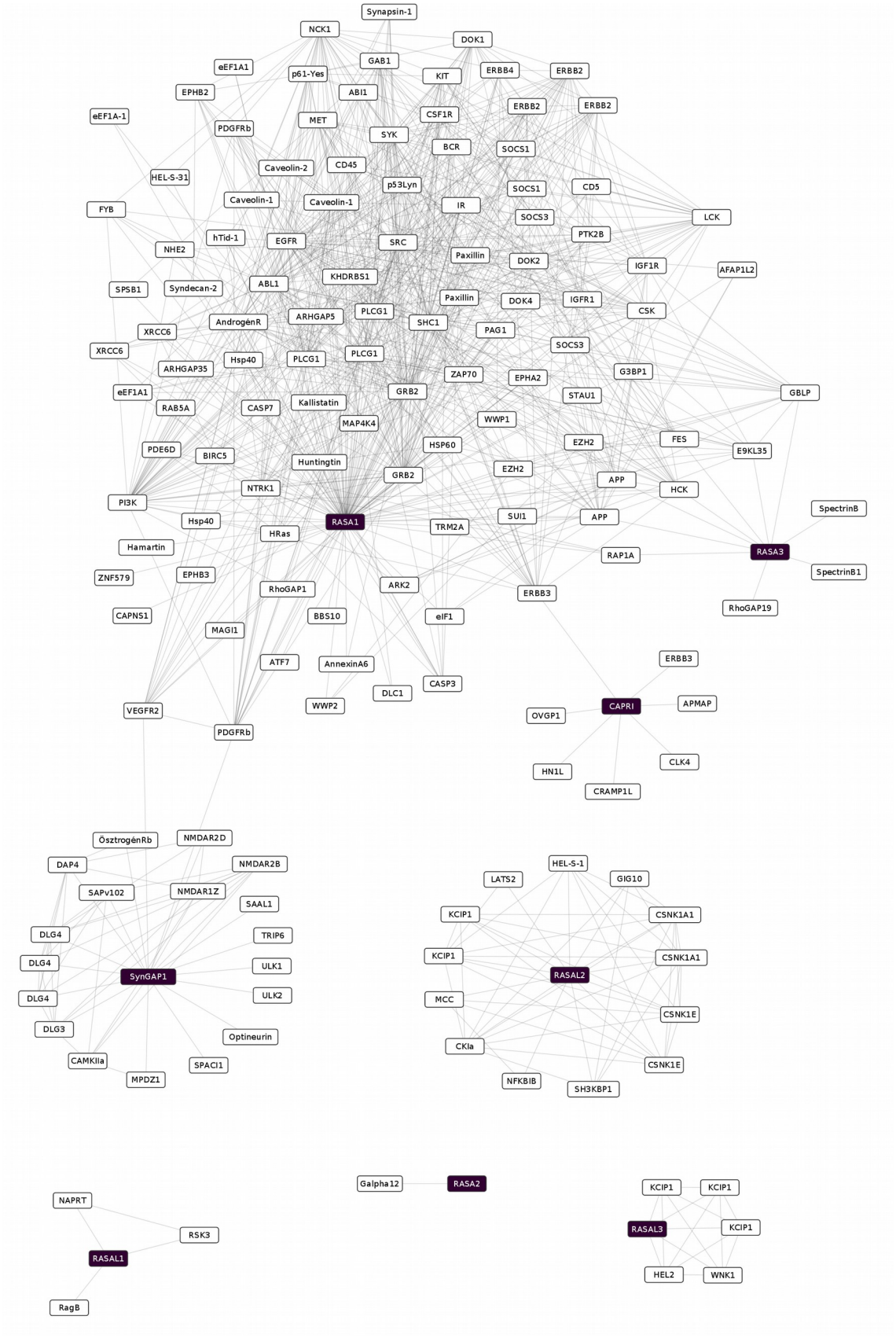
változatokat is nyilvánosan elérhetően kiszolgáljuk. A ComPPI nyílt forráskódú, tehát a kódbázis és az adatbázis letöltésével a teljes szoftvercsomag újra felépíthető. Ez egy parancssori Python programot is magában foglal, amellyel a fehérjék és kapcsolataik számítógépes memóriában tárolt, kereshető, szűrhető, átalakítható hálózattá építhetőek.

6.2.4. A RasGAPok szomszédsági hálózata a ComPPI-ban

A RasGAP fehérjecsalád fehérje-fehérje interakciós szomszédságát a 19. ábra mutatja be. E hálózat a RASA1, RASA2, RASA3, SynGAP1, CAPRI, RASAL1, RASAL2 és RASAL3 fehérjékből, első szomszédaikból, illetve az ezek közötti kapcsolatokból áll. A teljes hálózat egyetlen komponensű (193 csúcs, 1365 él), mely a poliubikvitin C prekurzor eltávolításával 5 komponensre bomlik szét. Ezek méretük szerinti sorrendben

1. a RASA1, RASA3, SynGAP1 és CAPRI hálózata (140 csúcs, 865 él),
2. a RASAL2 hálózata (14 csúcs, 51 él),
3. a RASAL3 hálózata (6 csúcs, 15 él),
4. a RASAL1 hálózata (4 csúcs, 4 él) és
5. a RASA2 hálózata (2 csúcs, 1 él).

A legnagyobb komponensben a RASA1 gazdagon feltérképezett szomszédsági hálózatától jól elkülönülően a SynGAP1, a CAPRI és a RASA3 szomszédsági hálózatai önálló modulokat alkotnak. A RASA3 és RASA1 modulok között több hidat is találunk, például a guanin nukleotid kötő fehérjét (GBLP), a Rap1 fehérjét (RAP1A), vagy az amiloid prekurzor fehérjét (APP). A RASA1 és SynGAP1 modulok között hidat alkot a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor 2-es típusa (VEGFR2), valamint a vérlemezke eredetű növekedési faktor β lánca (PDGFRb). A CAPRI modult a RASA1 modullal pedig a receptor tirozin kinázok családjába tartozó humán epidermális növekedési faktor receptor 3 (ERBB3, ismert HER3 néven is) kapcsolja össze. A szomszédsági hálózat a teljes molekuláris hálózatnak csupán egy kiragadott részlete, ezért modulszerkezete elsősorban a RasGAPok feltérképezettségének mértékéről ad tájékoztatást, nem pedig a hálózatban betöltött helyzetükről.


Synapsin-1
NCK1
DOK1
GAB1
eEF1A1
p61-Yes
KIT
ERBB4
ERBB2
EPHB2
ABI1
ERBB2
ERBB2
eEF1A-1
MET
CSF1R
PDGFRb
SYK
BCR
SOCS1
Caveolin-2
CD45
HEL-S-31
p53Lyn
SOCS1
CD5
Caveolin-1
Caveolin-1
IR
FYB
SOCS3
LCK
PTK2B
hTid-1
EGFR
SRC
NHE2
Paxillin
DOK2
IGF1R
AFAP1L2
KHDRBS1
SPSB1
Syndecan-2
ABL1
Paxillin
DOK4
IGFR1
CSK
AndrogénR
ARHGAP5
PLCG1
SHC1
XRCC6
PAG1
XRCC6
SOCS3
Hsp40
PLCG1
PLCG1
ARHGAP35
ZAP70
EPHA2
G3BP1
eEF1A1
GRB2
STAU1
GBLP
RAB5A
CASP7
Kallistatin
MAP4K4
WWP1
PDE6D
BIRC5
HSP60
EZH2
FES
E9KL35
Huntingtin
EZH2
GRB2
APP
HCK
NTRK1
PI3K
SUI1
APP
SpectrinB
Hsp40
RASA1
TRM2A
HRas
Hamartin
RAP1A
RASA3
SpectrinB1
ZNF579
EPHB3
RhoGAP1
ARK2
ERBB3
RhoGAP19
CAPNS1
BBS10
eIF1
MAGI1
ERBB3
ATF7
AnnexinA6
CASP3
DLC1
VEGFR2
WWP2
CAPRI
APMAP
OVGP1
PDGFRb
CLK4
HN1L
CRAMP1L
ÖsztrogénRb
NMDAR2D
DAP4
NMDAR2B
SAPv102
NMDAR1Z
SAAL1
DLG4
TRIP6
DLG4
ULK1
SynGAP1
DLG4
ULK2
DLG3
Optineurin
CAMKIIa
SPACI1
MPDZ1
HEL-S-1
LAT52
GIG10
KCIP1
CSNK1A1
KCIP1
CSNK1A1
RASAL2
MCC
CSNK1E
CKIa
CSNK1E
NFKBIB
SH3KBP1
Galpha12
RASA2
NAPRT
RSK3
RASAL1
RagB
KCIP1
KCIP1
RASAL3
KCIP1
HEL2
WNK1

19. ábra. A RasGAP fehérjecsalád tagjainak fehérje-fehérje interakciós hálózata a ComPPI alapján.

A fehérjecsalád tagjait sötétlila téglalapok, szomszédaikat fehér téglalapok jelölik, a közöttük ismert vagy valószínűsített kapcsolatokat szürke vonalak reprezentálják. A fehérjéket általánosan elterjedt nevük azonosítja, az azonos névvel jelölt csúcsok adott fehérjék izoformáira utalnak. A teljes hálózat az egyedi UniProtKB azonosítókkal, illetve a nevek feloldásaival elérhető a http://linkgroup.hu/rasgaps/rasgap_szomszedsagi_halozat.zip webcímen. Az ábra az átláthatóság kedvéért nem tartalmazza a poliubikvitin C fehérjét, az ismeretlen fehérjéket vagy fragmentjeiket azonosító cDNS-eket, illetve ezek kapcsolatait. A hálózat megjelenítése Cytoscape 3.0 (Smoot és mtsai, 2011) és GIMP 2.8 (http://gimp.org) programokkal készült.

A rendkívül sokszínű szomszédsági hálózat molekuláris és biológiai funkcióinak felderítéséhez *gene enrichment* analízist végeztem. Az UniProtKB nevezéktan szerinti fehérjéket a BioMart (Haider és mtsai, 2009) segítségével Entrez Gene nevezéktan szerinti génazonosítókra fordítottam, majd a Gene Ontology Consortium (The Gene Ontology Consortium, 2000) GO Enrichment Analysis eszközével elemeztem. A molekuláris funkciók között elsősorban kináz aktivitást, foszfotranszferáz aktivitást, purin nukleotid kötést és receptorokkal, illetve ioncsatornákkal kapcsolatos feladatokat találunk. A biológiai funkciók között az általános jelátviteli feladatok mellett a neurogenezis, axonogenezis, valamint a Ras jelátvitelével kapcsolatos funkciók is szerepelnek. Összességében azonban elmondható, hogy bár a *gene enrichment* analízis eredménye az irodalomból feltárt feladatokkal összhangban áll, a tanulás és memória szempontjából új ismeretekkel nem szolgál.

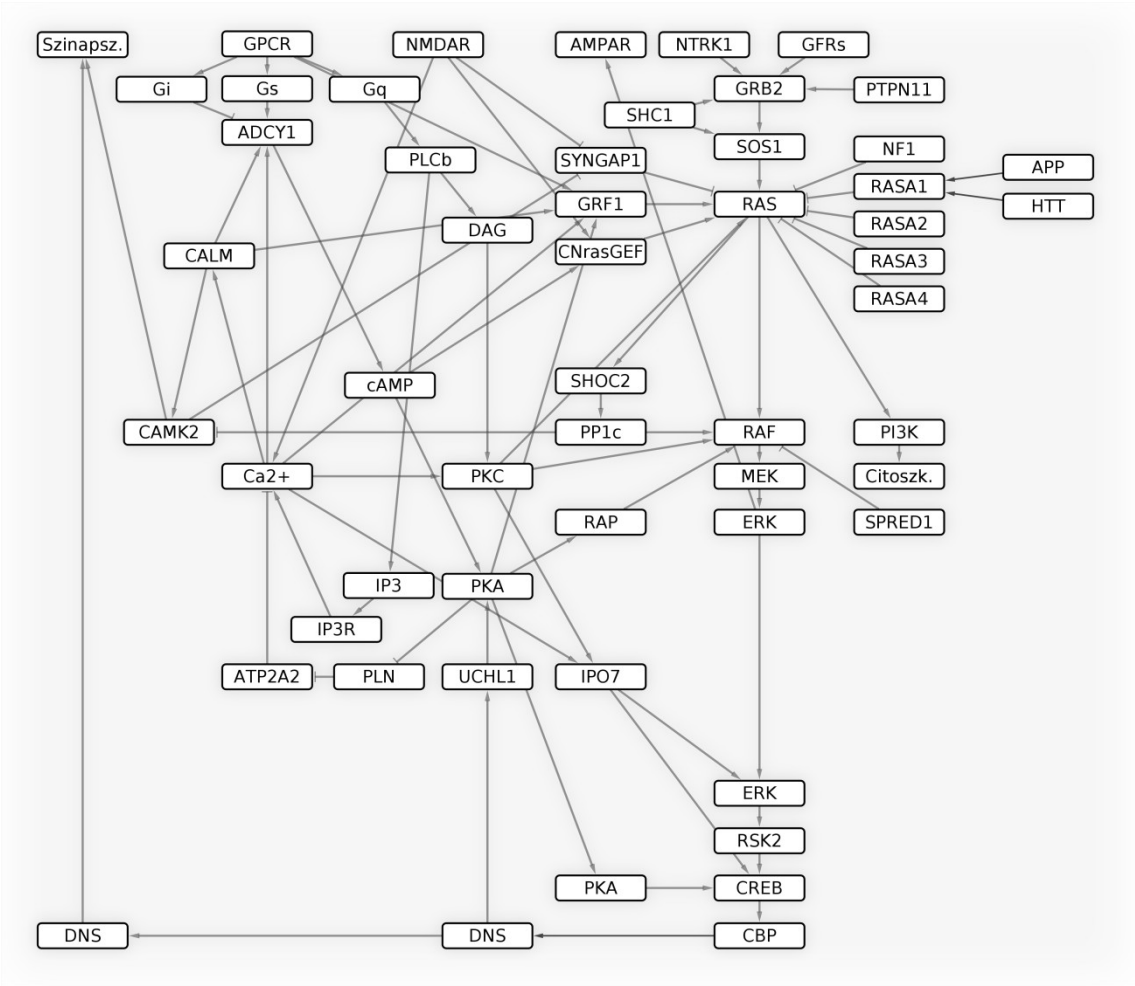
Szubcelluláris lokalizációk tekintetében a szomszédsági hálózat fehérjéi a ComPPI hat fő sejtkompartmentumának mindegyikében megtalálhatóak, legtöbbjük a membránhoz kapcsoltan, a citoszolban, illetve a sejtmagban helyezkedik el. A ComPPI szöveti eloszlásra, így neuronális expresszióra vonatkozó adatokat nem tartalmaz.

6.3. A RasGAPok lehetséges jelátvitelének hálózata

6.3.1. A Ras/MAPK, IP_3/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI_3K jelpályák és a Ca^{2+} jelátvitelének hálózata

A RasGAPok ComPPI segítségével feltárt sokszínű szomszédsági hálózatának neuronokra specifikus bővítéséhez a tanulás és memória jelátviteléhez fordultam. A Ras/MAPK jelpálya, illetve a tanulással és memóriával kapcsolatba hozott főbb jelpályák a bevezetőben tárgyalt interakcióik és keresztbeszélgetéseik révén egységes hálózattá szervezhetőek. E megközelítés előnye, hogy a nagy számú interakciót könnyen átlátható, ábrázolható és elemezhető formában dolgozza fel. *C. elegans*-ban e hálózat lényegesen kevesebb információt tartalmaz a *H. sapiens*-ben feltárt jelátvitelhez képest, ugyanakkor a jelpályák evolúciósan konzervált mivoltának köszönhetően a két hálózat között jelentős hasonlóság várható. Az ilyen, fajok között átívelő hálózatokat hívjuk ortologómnak (Wenger és Galliot, 2013).

A *C. elegans* RasGAPok tanulással és memóriával kapcsolatos jelátvitelének megfelelő humán ortologóm felépítéséhez először publikációkhoz, valamint a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes adatbázishoz fordultam (KEGG; Kanehisa és mtsai, 2014). A gyűjtés elsősorban a Ras/MAPK, IP_3/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI_3K jelpályákra és a Ca^{2+} jelátvitelére, valamint ezek kapcsolataira összpontosult. Az eltérő nevezéktanok már részletezett problémája itt is felmerült, ezért a jelpályák fehérjéit a ComPPI adatbázis segítségével, UniProt nevezéktan szerint egységesítettem. Minden egyes hálózati csúcs esetén ellenőriztem, hogy a molekula neuronális jelenlétét szomszédai és publikációk nem zárják-e ki. Fehérjék esetén ez az ismerten neuronális izoformákat jelentette. Az iteratív folyamat eredménye egy ellenőrzött, kézzel összeállított neuronális jelátviteli hálózat, mely a ComPPI adatbázis és jelpályák alapján készült. Megjelenítése a 20. ábrán látható.



20. ábra. A Ras/MAPK, IP_3/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI_3K jelpályák és a Ca^{2+} jelátvitel sematikus hálózata neuronokban.

A csúcsok neveinek feloldása a Bevezető fejezetben, valamint a rövidítések jegyzékében található, a 'Citoszk.' a citoszkeletális változásokra, a 'Szinapsz.' a szinaptikus fehérjék szintézisére, a 'DNS' a génekkel való interakcióra utal. A hálózat az átláthatóság érdekében egyszerűsítéseket tartalmaz. A nyilak serkentő, a T-végű nyilak gátló kapcsolatokat jelölnek. A hálózat vizualizációja Cytoscape 3.0 (Smoot és mtsai, 2011) és GIMP 2.8 (http://gimp.org) programokkal készült.

A hálózat csúcsai lehetnek szervetlen molekulák, gének, fehérjék, másodlagos hírvivők, valamint absztrakt elemek. Utóbbiak gén- és fehérjecsaládokat, illetve izoformákat képviselhetnek, melyek adatbázis szinten egyedi génekké és fehérjékké is feloldhatóak.

E megközelítés előnye, hogy az absztrakció során információt nem veszít, képes bármely jelátviteli folyamatot reprezentálni, valamint jelentősen leegyszerűsíti a hálózat képét anélkül, hogy a biológiai jelátvitel gráfelméleti paramétereit megváltoztatná.

A hálózat manuálisan kurált magja 55 csúcsot és 77 élet tartalmaz, átlagos fokszáma 2,836, átlagos úthossza 3,611, átmérője 7, és nem tartalmaz egyedülálló csúcsot. A tanulmányozott jelpályák mindegyike között volt keresztbeszélgetés. A Ras/MAPK jelpálya és a tanulással, illetve memóriával kapcsolatba hozott főbb jelpályák között összesen 18 keresztbeszélgetést azonosítottam, ezek közül 7 GAPokon és GEFeken keresztül modulálja a Ras/MAPK jelpálya aktivitását. A SynGAP1 fehérje különösen érdekes, mivel a poszt-szinaptikus denzitás részeként, a PSD-95 állványfehérjén keresztül kapcsolódhat az NMDA receptorok (NMDAR) szabályozó alegységeihez, valamint a kalcium/kalmodulin kináz II-höz (CAMK2) is. Utóbbi foszforilációval inaktiválhatja, ekkor a Ras felszabadul a SynGAP1 gátlásoldása alól, vagyis az intracellulárisan megemelkedett Ca^{2+} szint gátlásoldás révén a Ras/MAPK jelpálya aktiválódásához vezet. A 20. ábrán bemutatott keresztbeszélgetések révén a Ras/MAPK jelpálya kapcsolatban áll az NMDA és AMPA receptorok szabályzásával, a citoszkeleton átalakulásaival, valamint közvetlen szerepe lehet a szinaptikus fehérjék expressziójának szabályzásában is.

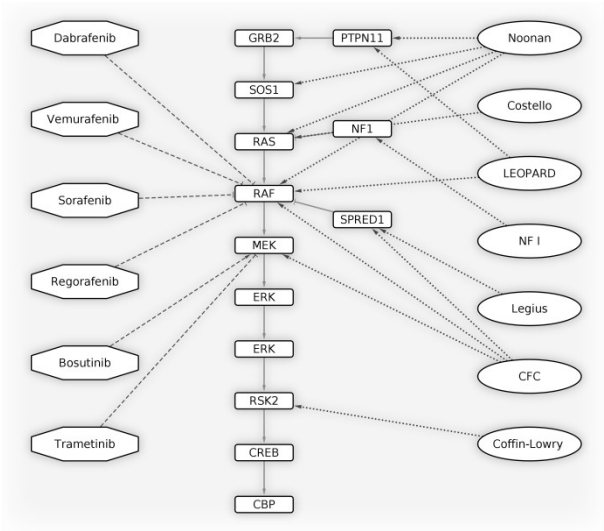
6.3.2. A Ras/MAPK jelpályát célzó gyógyszerek

A DrugBankből (Law és mtsai, 2014) kiszűrtem az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Ellenőrző Hatóság (U.S. Food and Drug Administration) által jóváhagyott, a Ras/MAPK jelpályát célzó gyógyszereket, melyeket az 5. táblázat sorol fel. A gyógyszerek mindegyike tumorellenes szer, többségében a Raf fehérjecsalád egy tagját célozzák meg (21. ábra). Hatásmechanizmusukat tekintve jellemzően kinázgátlók, és egyetlen sincs közöttük, melynek indikációja kognitív tünetekkel hozható kapcsolatba.

5. táblázat. A Ras/MAPK jelpályát célzó, jóváhagyott gyógyszerek a DrugBank adatbázis alapján.

A gyógyszercélpont fehérjéket UniProt nevezéktan szerinti neveik alapján azonosítottam a DrugBank adatbázisban (2014. január 1-ei kiadás; Law és mtsai, 2014), majd az eredménylistát az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Ellenőrző Hatóság által jóváhagyott készítményekre szűrtem. Az így kapott gyógyszerek relevanciáját közlemények alapján ellenőriztem.

Gyógyszer neve	Célpont fehérje	Hatásmechanizmus	DrugBank ID
Bosutinib	MEK1, MEK2	Ismeretlen	DB06616
Dabrafenib	BRAF, CRAF	Kinázgátló	DB05190
Regorafenib	BRAF, CRAF	Kinázgátló	DB08881
Sorafenib	BRAF, CRAF	Kinázgátló	DB08553
Trametinib	MEK1, MEK2	Kinázgátló	DB08911
Vemurafenib	BRAF, CRAF	Kinázgátló	DB00398



21. ábra. A Ras/MAPK jelpályához kapcsolódó gyógyszerek és betegségek sematikus hálózata.

A Ras/MAPK jelpálya elemeit a 20. ábrával összhangban négyszögek képviselik. A nevek feloldásai a rövidítések jegyzékében, illetve a '4. Bevezetés' fejezet '4.3. A tanulás és memória fontosabb jelpályáinak kapcsolatai a Ras/MAPK jelpályával' alfejezetben találhatóak. A nyolcszögek a gyógyszereket mutatják (5. táblázat), a t-végű szaggatott vonalak gátló, a nyílban végződőek serkentő gyógyszerhatást jelölnek. Az ovális elemek a betegségeket képviselik (2. táblázat). A pontozott vonalak a betegség és a jelpálya fehérjéi, vagy azok génjei közötti kapcsolatot szimbolizálják. A hálózat megjelenítése Cytoscape 3.0 (Smoot és mtsai, 2011) és GIMP 2.8 (http://gimp.org) programokkal készült.

7. Megbeszélés

A tanulás és memória fenotípusának felméréséhez először a mutáns törzsek érzékelő- és mozgatórendszerét szükséges jellemezni, mivel ezek alapvetően befolyásolhatják a tanulási és memóriatesztek során kapott eredményeket. A funkcióvesztő gap mutánsok ugyan változatos szerepeket játszanak a kemotaxisban, a *gap-1(ga133)*, *gap-2(tm748)*, *gap-3(ga139)* egyszeres és a *gap-1(ga133) gap-2(tm748)*, valamint *gap-2(tm748);gap-3* kettős mutánsok azonban diacetil iránti vonzódásukban nem mutattak szignifikáns eltérést a vad típustól (7. ábra), vagyis érzőrendszerük működését a további tesztek szempontjából a *gap* mutáció nem befolyásolta. Ez annak tükrében különösen meglepő, hogy a RasGAP fehérjék által szabályzott LET-60 Ras szerepet játszik a *C. elegans* szaglásában (Hirotsu és mtsai, 2000). A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* mutáns törzs ugyanakkor szenzoros defektussal rendelkezik. Korábbi eredmények alapján mindhárom *gap* gén szerepet játszik a kemotaxisban (Steták és mtsai, 2008), közülük eredményeim alapján a *gap-1* és *gap-3* játssza a főszerepet, mivel ezek egyenként is a szaglás zavaraihoz vezettek, kettős mutánsuk pedig minden vizsgált anyag iránt kifejezett kemotaxis defektust mutatott. A receptorokat érintő defektus kizárható, mivel a tesztelt négy illékony anyag vonatkozásában nincs teljes átfedés az érzékelő AWA és AWC neuronok receptorai között (Bargmann, 2006). A LET-60 Ras/mitogén aktivált fehérje kináz jelpályáról ugyanakkor Hirotsu és munkatársai bemutatták, hogy izoamilalkohol, benzaldehid és butanon, valamint gyengén diacetil esetében is részt vesz a kemoszenzoros érzékelésben (Hirotsu és mtsai, 2000). Mind a funkcióvesztő *let-60(n2021lf)*, mind a funkciónyerő *let-60(n1046gf)* törzsekben megfigyelhető volt a kemoszenzoros zavar, mely a LET-60 RAS/MAPK jelpálya aktivitásának egyensúlyát, mint követelményt feltételezi érzékelésben.

A *gap* mutáns törzsek mozgási ciklusainak száma a vad típusnak megfelelő volt táplálkozó alapállapotban is, valamint táplálékkereső és éhezés után táplálkozó magatartás során is (8. ábra). Kivételt a *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* kettős mutáns törzs jelent, melynél táplálékkereső magatartás során csökkent lokomotoros aktivitás figyelhető meg. Irodalmi adat nincs arra vonatkozóan, hogy a *gap* gének bármilyen

szerepet játszanának a fonálféreg mozgatórendszerében. A leírt neuronális expresszió (Hajnal és mtsai, 1998; Hirotsu és mtsai, 2000, Steták és mtsai, 2008) miatt nem zárható ki a *gap* mutációk motoros neuronok jelátvitelét érintő hatása, ugyanakkor a megfigyelt jelenség legvalószínűbb magyarázata a fentebb leírt kemoszenzoros defektus: a csökkent motoros aktivitás csak a szagláson alapuló táblálékkeresésnél figyelhető meg, a táplálkozó alapállapotban és az éhezés utáni táplálkozás során nem mérhető, valamint a *gap-1(ga133)* és *gap-3(ga139)* törzseket nem, csak ezek kettős mutánsait érinti. A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* mutánsok kemoszenzoros defektusa mindenképp elfedi a tanulás és memória fenotípusait, így a motorium szempontjából vizsgált jelenség további kutatás tárgyát képezheti.

A *gap* gének szerepére *C. elegans* tanulását és memóriafunkcióját illetően eddig nem volt adat. Eredményeim tanúsága szerint a *gap* géncsalád szerepet játszik az asszociatív tanulásban, valamint a rövid és hosszú távú asszociatív memória kialakulásában is.

A *gap-1(ga133)* funkcióvesztő mutáns törzs tanulási zavart mutat memóriadefektus nélkül. A *gap-2(tm748)* funkcióvesztő mutációt hordozó törzs ezzel szemben rövid és hosszú távú memóriazavarral bír tanulási zavar nélkül. A *gap-3(ga139)* funkcióvesztő mutáns törzset hasonlóképp rövid és hosszú távú memória zavara jellemzi, tanulási defektusa nincs. A *gap-1(ga133) gap-2(tm748)* és *gap-2(tm748);gap-3(ga139)* kettős mutációt hordozó törzseket robusztus rövid és hosszú távú memóriazavar jellemzi, mely még erősebb a *gap-2(tm748)* és *gap-3(ga139)* mutációk külön-külön megfigyelt hatásánál. Tanulási defektusuk nincs. Az eredmények együttesen felvázolják a *gap* gének szerepeit: a *gap-1* elsődlegesen az asszociatív tanulásért felelős, míg a *gap-2* és *gap-3* rendundánsan, egymástól függetlenül elengedhetetlenek mind a rövid, mind a hosszú távú memória kialakulásához. Izgalmas módon a *gap-1(ga139);gap-2(tm748)* törzs tanulási defektusa a hosszú távú memória tesztjében már nem volt megfigyelhető, melyre az ismételt kondicionálás magyarázatul szolgál. A *gap-1(ga133);gap-3(ga139)* mutációkat hordozó törzs esetén a kemoszenzoros defektus elfedi a lehetséges tanulási és memóriazavarokat: a törzs a vad típusnál is alacsonyabb kemotaxis indexeket mutat tanulásra és memóriára egyaránt,

amely azonban nem „szupertanuló” vagy „szuperemlékező” férgeket, csupán a csökkent érzékelés következtében fellépő minimális szenzoros motivációt jelez.

A tanulással és memóriadefektussal rendelkező *gap* mutáns törzseknél nem a tanulásra való képesség, vagy a memória teljes elvesztéséről van szó, hanem azok részleges hibájáról. A GAP fehérjék tehát nem esszenciális elemei a tanulás és memória molekuláris folyamatainak, hanem mintegy modulálják – feltehetően a Rason keresztül – az érintett fő jelpályákat, valamint integrálják azok jelátvitelét. A Megbeszélés fejezetben tárgyaltak szerint központi jelpályák teljes farmakológiai gátlása gyakran súlyos mellékhatásokhoz vagy toxicitáshoz vezet, a GAP fehérjék azonban szabályozó szerepük lévén ajtót nyithatnak a Ras/MAPK jelpálya egyensúlyának *in vivo* kísérletes és farmakológiai befolyásolására.

A *gap* géncsalád evolúciósan ugyan konzervált, a filogenetikai vizsgálatok alapján azonban két szempontból is különleges a többi fajhoz képest. Az emberi *neurofibromin 1* (*NF1*) génnek nincs nyilvánvaló ortológja sem *C. elegans*, sem *C. briggsae* fonálféregben, noha élesztőben, más fonálférgekben, illetve *D. melanogaster*-ben is megtalálható (Steták és mtsai, 2008). Ez lehetséges a *neurofibromin 1* gén elvesztése következtében is, de akár azt is jelezheti, hogy a *neurofibromin 1* csak evolúciósan magasabb rendű szervezetekben jelent meg, specializálódott. Az eddig leírt *gap* gének közül a legközelebb a *gap-2* áll hozzá. Másfelől, *C. elegans*-ban eddig nincs bizonyíték a RasGAPok funkcionális specializációjára szemben például a *D. melanogaster*, vagy *H. sapiens gap* génekkel, melyek fehérjéi körülhatárolható feladatokért felelnek. A funkciók e nagyobb redundanciája *C. elegans*-ban a specializáció kialakulásának hiányát, vagy annak elvesztét sugallja (Steták és mtsai, 2008), noha egyelőre a transzkripciós faktorok feltáratlanságából fakadóan a szövetspecifikus szabályozás sem zárható ki.

A RasGAPok jelátvitele *C. elegans*-ban javarészt felderítetlen. A Ras/MAPK jelpályában való érintettségük ismert, a memória és tanulás más molekuláris folyamataival azonban egyáltalán nem hozták még őket kapcsolatba. A rendelkezésre álló adatok ráadásul adatforrások közt szétszórtan, eltérő nevezéktanokban szerepelnek.

E kihívásokra is válaszul készítettük el a ComPPI-t, azaz kompartmentalizált fehérje-fehérje interakciós adatbázist. Ebben 9 fehérje-fehérje interakciós adatbázisból és 8 szubcelluláris lokalizációs adatbázisból integráltunk adatokat. Adatbázisunkba a forrásokra egyedileg jellemző interfészeken keresztül töltöttük be az adatokat, melyeket a különböző nevezéktanok összefésülése érdekében egymás között szinkronizáltunk. Ennek eredménye a 383.753 fehérjét, 1.059.650 irányítatlan interakciót, valamint 195.815 lokalizációt tartalmazó, letölthető adatkészlet. Ez a publikáció időpontjában a legnagyobb nyílt fehérje-fehérje interakciós adatbázis, mely ráadásul részletes lokalizációs adatokat is biztosít.

Az integrált adatkészlet egyik legfőbb előnye maga az egybevonás. Cusick és munkatársai (2009) *S. cerevisiae* és *H. sapiens* fehérje-fehérje interakciós hálózatokon mutatták be, hogy az általuk használt források közt bármiféle megkötés nélkül legfeljebb 50% átfedés volt, nagy megbízhatóságú, kurált adatok esetén pedig ez forrástól függően mindössze körülbelül 5% volt. Ez egybecseng saját eredményeinkkel, a páronként legalább 5000 fehérjényi átfedést mutató adatbázisok mindegyike között mindössze 301 közös fehérjét találtunk, mely jól illusztrálja az adatintegráció fontosságát.

A közös nevezéktanra hozás révén történő forrásintegráció két szempontból is javítja az adatminőséget: a külön néven szereplő, de azonos fehérjét takaró elemek összevonásával a hamis fehérjék száma csökken, valamint az ellentmondó adatokkal rendelkező fehérjék megjelölhetőek kevésbé megbízható adatként, melyek további experimentális megerősítést igényelnek.

A lokalizációk figyelembe vétele és egységesítése szintén javítja az adatminőséget. Kísérletes módszerekkel felfedhető például olyan kapcsolat két fehérje között, mely fizikailag lehetséges, biológiailag azonban valószínűtlen. E biológiai valószínűtlenség egyik potenciális oka a fehérjék eltérő szubcelluláris lokalizációja, vagyis a lokalizációs adatok egyeztetésével és a megbízhatósági pontértékben való figyelembe vételével a kevésbé megbízható interakciók megjelölhetőek, illetve fehérjék transzlokációja is prediktálható (Veres et al, 2015). További előny, hogy a felhasználónak nem szükséges minden egyes interakció esetén egyedileg figyelembe vennie és egyeztetnie a lokalizációkat, majd ezek függvényében megítélnie a kapcsolat

megbízhatóságát, mivel ezen erősen automatizálható feladatot a ComPPI szoftvereivel előre elvégeztük. Az interakciók és lokalizációk megbízhatósági pontjai ráadásul szűrőfeltételként is működnek, vagyis a felhasználó nem csupán támpontot kap egy lokalizáció vagy interakció „bizonyítottságáról”, de automatikusan ki is szűrheti azon fehérjéket, melyek nem érik el az adatminőség felhasználó által beállítható küszöbét. Az interakciók jelenleg irányítatlanok, de vizsgáljuk az irányítottság bevezetésének lehetőségét.

A ComPPI webes alkalmazás intelligens keresője és szinonimaszótára révén kiválóan alkalmas fehérjék beazonosítására is. Tegyük fel például, hogy humán RasGAP fehérjéket keresünk, de nem ismerjük pontos nevüket. A ComPPI fehérjekeresőjébe a 'gap' szót beírva automatikus javaslatokat kapunk már a gépelés során. A példa kedvéért maradjon a 'gap' szó a keresőkifejezés (6.2.2 fejezet, 16. és 17. ábra) és szűkítsük a fajt *H. sapiens*-re. A kapott köztes találati oldalon 275 fehérje szerepel, ezek között fellelhetőek például a GTPáz aktiváló fehérjék szupercsaládjába tartozó Arf-, Rho- és RanGAPok is, valamint számunkra releváns RasGAPok is, így például a p120GAP, vagy a neuronális RasGAP néven is ismert SynGAPok is. Az adott fehérjéket egyértelműen meghatározó UniProtKB/Swiss-Prot azonosító mellett további szinonimákat is látunk, a nem fragment jellegű elemek esetén jellemzően 5-6 nevet is, valamint egy kattintással megtekinthetőek az érdekesnek ítélt fehérjék adatlapjai is. Konkrét példánk fentiekben vázolt köztes találati oldalán többször is előfordul a RASA név is, pedig mi a kis betűs 'gap' kifejezésre kerestünk, mely tény jól illusztrálja, hogy a ComPPI keresőrendszere képes volt szemantikai kapcsolatot teremteni releváns, de szintaktikailag (nevükben) semmiben sem hasonlító találatok között is. A keresőrendszer korlátai között fontos megemlítenünk a potenciálisan nagy számú találatot, mely pontosabb keresési kifejezésekkel szűkíthető, valamint a biológiailag esetleg kevésbé releváns fehérjetöredékek felsorolását is, mely a forrásadatok minőségének javulásával csökkenni fog, valamint a keresőalgoritmus további fejlesztésével szintén szűrhető.

A keresések eredményét szubcelluláris lokalizáció szerint is szűkíthetjük hat nagy sejtalkotó tetszőleges kombinációjára, ezek a citoszol, mitokondrium, sejtmag, szekretoros rendszer, membránok, és az extracelluláris tér. Ennek segítségével könnyen

ellenőrizhető egyes fehérjék jelenléte adott sejtkompartmentumban, ugyanakkor a lokalizációk nagy felbontású szűrése, illetve az adott lokalizációban fellelhető összes fehérje listázása további fejlesztések tárgya.

A ComPPI adatainak nagy léptékű elemzését a letölthető adatkészletek teszik lehetővé, melyek közt megtalálható interakciókra összpontosító, lokalizációkat tartalmazó, illetve kompartment-centrikus is, ráadásul a fajok és lokalizációk tetszőleges kombinációi is beállíthatók letöltéskor. Az adatbázis egésze letölthető SQL formátumban, mely fontos feltétele az időtálló reprodukálhatóságnak.

A RasGAPok jelátvitelének ortologómja 18 lehetséges keresztbeszélgetést tárt fel, melyek közül 7 GEFeken és GAPokon keresztül modulálja a Ras/MAPK jelpálya aktivitását.

A kísérletes eredmények, valamint a bemutatott keresztbeszélgetések lehetséges implikációi jó összhangban állnak a klinikai megfigyelésekkel. A 10 ismert Rasopátiából 8 esetében előfordulhat neurokognitív tünet (2. táblázat). A GTPáz aktiváló fehérjéket és a guanin nukleotid kicserélő faktorokat érintő mutációk egyaránt vezethetnek kognitív zavarokhoz (Fasano és Brambilla, 2011), mely azt sugallja, hogy a Ras/MAPK jelpálya aktivitásának egyensúlya és szoros szabályozása az egészséges kogníció feltétele.

Miként lehetséges az mégis, hogy míg egyes Rasopátiákban neurokognitív zavarok figyelhetők meg, addig az akár ugyanazon gének mutációja által okozott más kórképek nem járnak hasonló tünetekkel? Például a *son of sevenless 1* (*sos1*) gén mutációját Noonan szindrómában és I-es típusú örökletes gingivális fibromatózisban is megfigyelték, azonban csak Noonan szindrómában jár tanulási zavarral. A fehérjék izoformáinak szöveti expressziós mintázata egy lehetséges magyarázat: például a KRAS mutáció cardio-facio-cután szindrómában vélhetően kevésbé lesz szövetspecifikus a szigorúan T- és B-limfocitákat érintő autoimmun limfoproliferatív szindrómával szemben. Az érintett fehérjék interakciós partnerei a különböző szövetek és sejtkompartmentumok között szintén eltérhetnek, mely megváltoztathatja a fehérjék szabályzását. Ez újabb érv a hálózatközpontú megközelítés mellett, a mechanizmusok felderítése azonban további kutatást igényel.

A Ras/MAPK jelpálya és a neurodegeneratív betegségek között számos kapcsolatot találunk. Az Alzheimer-kórban tapasztalható kognitív és memóriatünetek hátterében például jelen ismereteink szerint az amiloid-β plakkok és aggregálódott tau fehérjék okozta patológiás folyamatok kulcsszerepűek. Az Erk negatív szabályozója a β-szekretáz enzim expressziójának, mely enzim az amiloid-β plakkok kialakulásában vesz részt (Vassar és Kandalepas, 2011). Az α-szinuklein, az ubikvitin karboxi-terminális hidroláz (UCHL1) és a leucin-gazdag repeat kináz 2 (LRRK2) mind a Parkinson-kórral kapcsolatba hozott fehérjék. Felmerült, hogy a megnövekedett α-szinuklein szint a Ras/MAPK jelpálya zavarának következménye (Klegeris és mtsai, 2008). Az UCHL1-nek közvetlen kapcsolata van a Ras/MAPK jelpályával (Kim és Choi, 2010; Thao és mtsai, 2012). Az LRRK2 pedig a Ras GTPáz szupercsaládra jellemző szerkezeti motívumokkal rendelkezik (Shen, 2004), noha tényleges kapcsolat eddig nem ismert. A 3,4-dihidroxifenil-L-alanin (L-DOPA) a Parkinson-kór jelenleg leghatékonyabb kezelési módja, ugyanakkor az L-DOPA a fehérje-kináz A célpontjain keresztül L-DOPA indukált diszkinéziát tud okozni (Murer és Moratalla, 2011). E célpontok között a Ras/MAPK jelpálya tagjait is megtaláljuk (20. ábra).

A nagy affinitású idegnövekedési faktor receptor (NTRK) 1 és 2 az agyi eredetű neurotróp faktor (BDNF) receptorai, melyek közvetlenül szabályozzák a Ras-GEF-GRB2 komplex növekedési faktor receptor-kötött fehérje 2 (GRB2) nevű tagját. A BDNF-et kutatások tanulással és memóriafunkcióval (Cunha és mtsai, 2012), autizmus spektrum betegségekkel (Nishimura és mtsai, 2007) és a depresszió modelljeivel (Duman és mtsai, 2007; Brunoni és mtsai, 2008) is társítják. Autizmusra jellemző tünetek felfedezhetőek Rasopátiák esetén is (Adviento és mtsai, 2014), mi több, a *syngap1* gén mutációja az agyi fejlődés zavarán keresztül autizmus spektrum betegséghez és szellemi fogyatékhoz vezet (Berridge, 2012a). A RasGAPok SH3 doménje lehetővé teszi kapcsolódásukat a huntingtin fehérjéhez is (HTT), mely a Huntington-kór mellett a tanulásban és memóriában is érintett (Dumas és mtsai, 2013). A RasGAP-HTT kapcsolatot *in vitro* jellemezték (Liu és mtsai, 1997), *in vivo* jelentősége még feltárásra vár.

Fontos azonban hangsúlyoznunk, hogy a Ras/MAPK jelpálya szerepére e betegségekben csupán közvetett bizonyítékok utalnak, akár a neuronális jelátvitel

általánosan felborult egyensúlyáról is szó lehet. A neurodegeneratív kórképek és a Ras/MAPK jelpálya összefüggései azonban ígéretes célpontjai klinikai idegtudományi kutatásoknak.

A Ras/MAPK jelpályát célzó összes gyógyszer tumorellenes hatóanyag, mely tény a Rasopátiák szempontjából két okból fontos. Egyrészt a tumorellenes kezelés Rasopátia-szerű tünetekhez vezethet. Egy közlemény valóban alátámasztja, hogy vemurafenib használatakor a mellékhatások átfedtek a Rasopátiákra jellemző bőrtünetekkel (Rinderknecht és mtsai, 2013). Másrészt a kemoterápiás kezelések gyakori velejárója a kognitív diszfunkció (Janelsins és mtsai, 2011). Összefoglalva tehát a Ras/MAPK jelpálya szerepet játszik a tanulásban és memóriában, tumorellenes szerek e jelpályát célozzák meg, és a kemoterápia mellékhatásai átfednek a Rasopátiák tüneteivel. Ezek alapján felmerül, hogy a Ras/MAPK jelpályát célzó kemoterápiás kezelések okozta kognitív diszfunkció hátterében akár a Rasopátiák kognitív tüneteit is okozó, közös molekuláris háttér állhat (Gyurkó és mtsai, 2015).

A Rasopátiák oki kezelésére jelenleg nincs gyógyszer. Egy megfelelő hatóanyag iránt követelmény volna a hatás reverzibilitása, a vér-agy gáton való átlépés, és vélhetően az érintett jelpályák tagjai vagy szabályzói közül többnek is megcélzása. A Ras önmagában bonyolult gyógyszercélpont (Mattingly, 2013) többek közt azért is, mert központi, sok interaktorral rendelkező molekulaként (hálózatos csomópontként) a rajta keresztül érvényesülő gyógyszerhatás erős lehet ugyan, de a molekuláris hálózat perturbációi a számos szomszédnak köszönhetően sokfelé terjednek, amely mellékhatásokhoz vagy toxicitáshoz vezethet (Csermely és mtsai, 2013). A molekuláris hálózatok elemzésén nyugvó multitarget farmakológiai megközelítés lehetővé teszi a szükséges jelátviteli útvonalak modulálását azok teljes blokkolása helyett, valamint a redundáns jelpályák leszabályzásával a gyógyszerrezisztenciát is csökkentheti (Zimmermann és mtsai, 2007; Lu és mtsai, 2012). E stratégiát KRAS esetében már sikerrel alkalmazták is (Zimmermann és mtsai, 2013), illetve egér szinaptikus plaszticitása esetén is megfigyelték, hogy a szerotonin és dopamin receptorokat aktiváló különböző gyógyszerkombinációk képesek voltak felerősíteni a Ras-PI_3K/PKB jelátvitelt (Lim és mtsai, 2014). Mindez azt sugallja, hogy a Ras/MAPK jelpályát érintő,

több célpontra is ható gyógyszeres kezelés létező hatóanyagok kombinációjával vagy új hatóanyagokkal életképes stratégia. A RasGAPok pedig moduláló hatásuk révén épp e stratégia célpontjai lehetnek.

A RasGAPok manuálisan kurált jelátviteli hálózatát elemezve kiderült az is, hogy a Raf a legnagyobb közti centralitású csúcs, amely érték a jelátvitelben betöltött fontossággal korrelál (Wang és mtsai, 2013). Ezzel összhangban a jóváhagyott gyógyszerek célpontjai között túlnyomó többségben épp a Raf család tagjait találjuk. A kis méretű, fókuszált molekuláris hálózatok szerkezeti elemzése ugyanakkor korlátozott jelentőségű, a prediktív erejű elemzésekhez nagy léptékű kísérletes (például génexpressziós) és hálózatos vizsgálatok összehangoltan szükségesek. A fonálférgek illékony anyagokat érzékelő receptorai és a RasGAPok és/vagy a Ras/MAPK jelpálya közötti összefüggések szintén további kutatást igényelnek.

A *C. elegans* fonálféreg egyszerű, ám reprezentatív modellrendszert kínál akár olyan komplex állapotok molekuláris hátterének vizsgálatához is, mint például az alkoholfüggőség (Yu és mtsai, 2011). A humán betegségek génjeinek és fehérjéinek, így a gyógyszercélpontok fonálféregben ismert ortológjainak vizsgálata a mögöttes molekuláris mechanizmusok jobb megértéséhez vezethet (Burne és mtsai, 2011). Ez fordítva is igaz, a *C. elegans*-ban feltárt folyamatok humán ortológoknak való megfeleltetése új kísérletes és gyógyszerészeti célpontokat kínálhat (Kaletta és mtsai, 2006).

8. Következtetések

Munkám során a *gap* géncsaládot *C. elegans* modellrendszerben tanulásra és memóriára fenotipizáltam, majd az eredményeket, valamint a GAP fehérjék lehetséges jelátvitelét bioinformatikai, hálózatos módszerekkel helyeztem patológiai és klinikai kontextusba. Doktori munkám legfontosabb új eredményei a következők:

1. Kimutattam, hogy a *gap* gének *C. elegans* fonálféregben szükségesek a kemotaxishoz, a tanuláshoz, a rövid, valamint a hosszú távú asszociatív memória kialakulásához. A kemotaxissal elsősorban a *gap-1* és *gap-3* gének hozhatóak kapcsolatba. A *gap-1* gén emellett nagy szerepet tölt be a tanulásban. A *gap-2* és *gap-3* redundánsan a rövid és hosszú távú asszociatív memória kialakulásához járul hozzá. Megmutattam továbbá, hogy e hatásokhoz a *C. elegans* Rast kódoló *let-60* gén is szükséges.
2. Létrehoztuk a ComPPI-t, azaz kompartmentalizált fehérje-fehérje interakciós adatbázist, mely integrált, egységesített, megbízhatóság szempontjából is jellemzett formában kínál információkat fehérjék kapcsolatairól és szubcelluláris lokalizációikról. A célzott, kis léptékű fehérjeelemzést és a nagy léptékű, interaktóm alapú adatelemzést egyaránt támogatja.
3. Felépítettem a RasGAPok humán, neuronális jelátvitelét reprezentáló, egyedülálló hálózatot a Ras/MAPK, IP_3/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI_3K jelpályák és a Ca^{2+} jelátvitelének figyelembe vételével. 18 keresztbeszélgetést tártam fel a Ras/MAPK jelpálya, a tanulás és a memória főbb jelpályái között. Felvetettem az említett folyamatok és az egyes tumorellenes kezelések során tapasztalt kognitív mellékhatások közös molekuláris mechanizmusainak lehetőségét is, illetve a Ras/MAPK jelpálya és neurodegeneratív betegségek közötti molekuláris hidak lehetséges jelöltjeit.

9. Összefoglalás

A Ras/MAPK jelpálya kiemelt fontosságú a sejtdifferenciációban és tumorképződésben, mely mellett tanulásban és memóriában betöltött szerepére is egyre több eredmény mutat. E központi jelleg miatt szoros szabályzás alatt áll, jelátvitelének változásai sejt és organizmus szintjén is szerteágazó hatásúak. Regulátorainak, így többek közt a RasGAP fehérjecsalád tagjainak kísérleti vagy gyógyszerészeti célú, rendszerszintű vizsgálata ugyanakkor ígéretes irány, melyhez a *C. elegans* fonálféreg *in vivo* modellrendszert, a hálózattudomány pedig *in silico* eszközöket biztosít.

Doktori munkám céljául így a RasGAP fehérjéket kódoló géncsalád, a *gap* gének asszociatív tanulásban és memóriában betöltött szerepének átfogó fenotipizálását, illetve fehérjéik jelátvitelének hálózatos feltérképezését tűztem ki.

Funkcióvesztő *gap* mutánsok és RNS interferenciával történő géncsendesítés segítségével igazoltam, hogy a *gap* géncsalád *C. elegans* fonálféregben változatos módon vesz részt a kemotaxisban, tanulásban és memóriában. A *gap-1* és *gap-3* a szaglásban játszik szerepet, a *gap-1* főként a tanulásban, a *gap-2* és *gap-3* pedig a rövid és hosszú távú asszociatív memóriában érintett. E folyamatok a *let-60* génről expresszálódó Ras fehérjén keresztül érvényesülnek. A férgek motilitására a gének kiütése nincs hatással.

A RasGAPok molekuláris jelátvitelének megértéséhez a nyilvános interakciós adatokat a ComPPI fehérje-fehérje kapcsolati adatbázisban egységesítettük és javítottuk, mely jelenleg kategóriájában a legnagyobb szabadon elérhető adatbázis. A ComPPI-ra és publikációkra épülve létrehoztam a RasGAPok és a tanulás, valamint memória főbb jelpályáinak hálózatát, melyben a kognitív folyamatok lehetséges molekuláris összefüggéseire 18 keresztbeszélgetés mutat rá, és amely összekapcsolja a tumoros és a kognitív folyamatok molekuláris hátterét.

Összefoglalva, doktori munkám interdiszciplináris megközelítésben elsőként jellemzi a *gap* gének *C. elegans* tanulásában és memóriájában betöltött szerepét, valamint humán ortologóm képében felderíti lehetséges jelátvitelüket, klinikai és farmakológiai vonatkozásaikat, ezzel rendszerbiológiai kapcsolatot teremtve a tanulás és memória, valamint a rákkutatás e kiemelt területei között.

10. Summary

The Ras/MAP kinase pathway is a critical component in cell growth and tumorigenesis, and recent progress suggests its involvement in learning and memory as well. The pathway is tightly regulated due to its central role, and its activity changes lead to widespreading perturbations at both cellular and organismal level. On the other hand, the experimental and pharmaceutical, systems-level study of its regulators, including the members of the RasGAP protein family, is a promising direction. *C. elegans* serves as a good *in vivo* model system for it, and network science provides *in silico* tools.

The goal of my doctoral work was therefore to comprehensively phenotype the genes of the RasGAP proteins, the *gap* genes, in learning and memory, and to map their signalling in a network-oriented manner.

By using *gap* loss-of-function mutants as well as gene silencing by RNA interference, I showed that the *gap* genes play diverse roles in the chemotaxis, learning and memory of *C. elegans*. The *gap-1* and *gap-3* are involved in olfaction, *gap-1* is mainly involved in learning, while *gap-2* and *gap-3* participate in the molecular processes of short-term and long-term associative memory. The discovered effects show up through the Ras protein expressed from the *let-60* gene. The knock-out of the *gap* genes does not affect the motility of the worms.

To gain a deeper, topological understanding of the cellular signaling of RasGAPs, we unified and enhanced publicly available protein-protein interaction data and created ComPPI, to our knowledge the most comprehensive freely available protein-protein interaction database. Based on the database and other publications, I developed the network of the RasGAPs and the major pathways of learning and memory, in which 18 cross-talks point to the possible molecular interactions of these signalling events. This network links the molecular background of tumors and cognitive processes.

In summary, my doctoral thesis describes the role of *gap* genes in learning and memory in an interdisciplinary manner, and explores the possible signaling network, the clinical and pharmacological implications of GAPs as a human orthologom to provide a connection at the systems level between cell growth, learning and memory.

11. Irodalomjegyzék

Adviento B, Corbin IL, Widjaja F, Desachy G, Enrique N, Rosser T, Risi S, Marco EJ, Hendren RL, Bearden CE, Rauen K, Weiss L. (2014) Autism traits in the RASopathies. J Med Genet 51:10–20.

Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, Filocamo M, Kato K, Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y. (2005) Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. Nat Genet 37:1038–1040.

Araki Y, Zeng M, Zhang M, Huganir RL. (2015) Rapid Dispersion of SynGAP from Synaptic Spines Triggers AMPA Receptor Insertion and Spine Enlargement during LTP. Neuron 85:173–189.

Ardiel EL, Rankin CH (2010) An elegant mind: learning and memory in *Caenorhabditis elegans*. Learn Mem 17:191–201.

Barabási A-L, Oltvai ZN. (2004) Network biology: understanding the cell's functional organization. Nat Rev Genet 5:101–113.

Bargmann CI, Hartwieg E, Horvitz HR. (1993) Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. Cell 74:515–527.

Bargmann CI. Chemosensation in *C. elegans*. In: WormBook: the online review of *C. elegans* biology. The *C. elegans* Research Community (szerk.) 2006: WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.7.1, http://www.wormbook.org

Beck CD, Rankin CH. (1995) Heat shock disrupts long-term memory consolidation in *Caenorhabditis elegans*. Learn Mem 2:161–177.

Bernhard N, van der Kooy D. (2000) A Behavioral and Genetic Dissection of Two Forms of Olfactory Plasticity in *Caenorhabditis elegans*: Adaptation and Habituation. Learn Mem 7:199–212.

Bernards A. (2003) GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. Biochim Biophys Acta - Rev Cancer 1603:47–82.

Berridge MJ (2012a) Cell Signalling Biology: Module 2 - Cell signalling pathways. Biochem J:1–138.

Berridge MJ (2012b) Cell Signalling Biology: Module 10 - Neuronal Signalling. Biochem J:1–122.

Berryer MH, Hamdan FF, Klitten LL, Møller RS, Carmant L, Schwartzentruber J, Patry L, Dobrzeniecka S, Rochefort D, Neugnot-Cerioli M, Lacaille JC, Niu Z, Eng CM, Yang Y, Palardy S, Belhumeur C, Rouleau G, Tommerup N, Immken L, Beauchamp MH, Patel GS, Majewski J, Tarnopolsky M, Scheffzek K, Hjalgrim H, Michaud JL, Di Cristo G. (2013) Mutations in SYNGAP1 Cause Intellectual Disability, Autism, and a Specific Form of Epilepsy by Inducing Haploinsufficiency. Hum Mutat 34:385–394.

Birnbaum SG, Varga AW, Yuan L-L, Anderson AE, Sweatt JD, Schrader L. (2004) Structure and function of Kv4-family transient potassium channels. Physiol Rev 84:803–833.

Boon LM, Mulliken JB, Vikkula M. (2005) RASA1: Variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. Curr Opin Genet Dev 15:265–269.

Bourne HR, Sanders D, McCormick F. (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. Nature 348:125–132.

Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, Somers R, Messiaen L, De Schepper S, Fryns J-P, Cools J, Marynen P, Thomas G, Yoshimura A, Legius E. (2007) Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. Nat Genet 39:1120–1126.

Brems H, Legius E. (2013) Legius syndrome, an update. molecular pathology of mutations in SPRED1. Keio J Med 62:107–112.

Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77:71–94.

Brunoni AR, Lopes M, Fregni F. (2008) A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. Int J Neuropsychopharmacol 11:1169–1180.

Bülow HE, Boulin T, Hobert O. (2004) Differential functions of the *C. elegans* FGF receptor in axon outgrowth and maintenance of axon position. Neuron 42:367–374.

Burne T, Scott E, van Swinderen B, Hilliard M, Reinhard J, Claudianos C, Eyles D, McGrath J. (2011) Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish? Mol Psychiatry 16:7–16.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263:802–805.

Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy MB. (1998) A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. Neuron 20:895–904.

Colbert HA, Bargmann CI. (1995) Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. Neuron 14:803–812.

Costa RM, Federov NB, Kogan JH, Murphy GG, Stern J, Ohno M, Kucherlapati R, Jacks T, Silva AJ. (2002) Mechanism for the learning deficits in a mouse model of neurofibromatosis type 1. Nature 415:526–530.

Costello JM. (1977) A new syndrome: mental subnormality and nasal papillomata. Aust Paediatr J 13:114–118.

Csermely P, Korcsmaros T, Kiss HJM, London G, Nussinov R. (2013) Structure and dynamics of molecular networks: A novel paradigm of drug discovery. Pharmacol Ther 138:333–408.

Cullen PJ. (1998) Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids 1436:35–47.

Cullen PJ, Lockyer PJ. (2002) Integration of calcium and Ras signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3:339–348.

Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. (2010) A simple role for BDNF in learning and memory? Front Mol Neurosci 3:1.

Cusick ME, Yu H, Smolyar A, Venkatesan K, Carvunis A-R, Simonis N, Rual J-F, Borick H, Braun P, Dreze M, Vandenhaute J, Galli M, Yazaki J, Hill DE, Ecker JR, Roth FP, Vidal M. (2009) Literature-curated protein interaction datasets. Nat Methods 6:39–46.

de Quervain D J-F, Kolassa IT, Ackermann S, Aerni A, Boesiger P, Demougin P, Elbert T, Ertl V, Gschwind L, Hadziselimovic N, Hanser E, Heck A, Hieber P, Huynh KD, Klarhofer M, Luechinger R, Rasch B, Scheffler K, Spalek K, Stippich C, Vogler C, Vukojevic V, Stetak A, Papassotiropoulos A. (2012) PKC is genetically linked to memory capacity in healthy subjects and to risk for posttraumatic stress disorder in genocide survivors. Proc Natl Acad Sci 109:8746–8751.

Denayer E, de Ravel T, Legius E. (2008) Clinical and molecular aspects of RAS related disorders. J Med Genet 45:695–703.

Digilio MC, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, Marino B, Pizzuti A, Dallapiccola B. (2002) Grouping of multiple-lentigines/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. Am J Hum Genet 71:389–394.

Duman CH, Schlesinger L, Kodama M, Russell DS, Duman RS. (2007) A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. Biol Psychiatry 61:661–670.

Dumas EM, van den Bogaard SJ, Middelkoop HM, Roos RC. (2013) A review of cognition in Huntington's disease. Front Biosci (Schol Ed) 5:1–18.

Eerola I, Boon LM, Mulliken JB, Burrows PE, Dompmartin A, Watanabe S, Vanwijck R, Vikkula M. (2003) Capillary malformation-arteriovenous malformation, a new clinical and genetic disorder caused by RASA1 mutations. Am J Hum Genet 73:1240–1249.

El-Daher SS, Patel Y, Siddiqua a, Hassock S, Edmunds S, Maddison B, Patel G, Goulding D, Lupu F, Wojcikiewicz RJ, Authi KS. (2000) Distinct localization and function of (1,4,5)IP(3) receptor subtypes and the (1,3,4,5)IP(4) receptor GAP1(IP4BP) in highly purified human platelet membranes. Blood 95:3412–3422.

Fasano S, Brambilla R. (2011) Ras-ERK signaling in behavior: old questions and new perspectives. Front Behav Neurosci 5:79.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-811.

Friedman E. (1995) The role of ras GTPase activating protein in human tumorigenesis. Pathobiology 63:348–350.

Friedman JM, Birch PH. (1997) Type 1 Neurofibromatosis: A descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients. Am J Med Genet 143:138–143.

Gerits N, Kostenko S, Shiryaev A, Johannessen M, Moens U. (2008) Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. Cell Signal 20:1592–1607.

Girard LR, Fiedler TJ, Harris TW, Carvalho F, Antoshechkin I, Han M, Sternberg PW, Stein LD, Chalfie M. (2007) WormBook: The online review of *Caenorhabditis elegans* biology. Nucleic Acids Res 35:D472–D475.

Guo HF, Tong J, Hannan F, Luo L, Zhong Y. (2000) A neurofibromatosis-1-regulated pathway is required for learning in Drosophila. Nature 403:895–898.

Gyurkó MD, Veres DV, Módos D, Lenti K, Korcsmáros T, Csermely P. (2013) Adaptation and learning of molecular networks as a description of cancer development at the systems-level: Potential use in anti-cancer therapies. Semin Cancer Biol 23:262-269.

Gyurkó MD, Sőti C, Steták A, Csermely P. (2014) System level mechanisms of adaptation, learning, memory formation and evolvability: the role of chaperone and other networks. Curr Protein Pept Sci 15:171–188.

Gyurkó MD, Steták A, Sőti C, Csermely P. (2015) Multitarget network strategies to influence memory and forgetting: The Ras/Mapk pathway as a novel option. Mini-Rev Med Chem 15:1–9.

Gyurkó MD, Csermely P, Sőti C, Steták A. (2015b) Distinct roles of the RasGAP family proteins in *C. elegans* associative learning and memory. Sci Rep 5:15084.

Hadziselimovic N, Vukojevic V, Peter F, M A, Fastenrach M, Fenyves B, Hieber P, Demougin P, Vogler C, de Quervain D J-F, Papassotiropoulos A, Stetak A. (2014) Forgetting in *C. elegans* is regulated via Musashi (msi-1) mediated translational control of the Arp2/3 complex. Cell 156:1153–1166.

Haider S, Ballester B, Smedley, D, Zhang J, Rice P, Kasprzyk A. (2009) BioMart Central Portal — unified access to biological data. Nucl Acids Res 37:W23-27.

Hagenston AM, Bading H. (2011) Calcium signaling in synapse-to-nucleus communication. Cold Spring Harb Perspect Biol 3:a004564.

Hajnal A, Whitfield C, Kim S. (1997) Inhibition of *Caenorhabditis elegans* vulval induction bygap-1 and by let-23 receptor tyrosine kinase. Genes Dev 2:2715–2728.

Hamakawa M, Uozumi T, Ueda N, Hirotsu T. (2015) A role for Ras in inhibiting circular foraging behavior as revealed by a new method for time and cell-specific RNAi. BMC Biol 13:6.

Hart TC, Zhang Y, Gorry MC, Hart PS, Cooper M, Marazita ML, Marks JM, Cortelli JR, Pallos D. (2002) A mutation in the SOS1 gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1. Am J Hum Genet 70:943–954.

Harvey JJ. (1964) An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. Nature 204:1104–1105.

Harvey CD, Yasuda R, Zhong H, Svoboda K. (2008) The spread of Ras activity triggered by activation of a single dendritic spine. Science 321:136–140.

Hayashizaki S, Iino Y, Yamamoto M. (1998) Characterization of the *C. elegans gap-2* gene encoding a novel Ras-GTPase activating protein and its possible role in larval development. Genes Cells 3:189–202.

Hirbe AC, Gutmann DH. (2014) Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. Lancet Neurol 13:834–843.

Hirotsu T, Saeki S, Yamamoto M, Iino Y. (2000) Corrigenda: The Ras-MAPK pathway is important for olfaction in *Caenorhabditis elegans*. Nature 404:289–293.

Hodgkin L, Huxley F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerves. J Physiol 117:500–544.

Hukema RK, Rademakers S, Dekkers MPJ, Burghoorn J, Jansen G. (2006) Antagonistic sensory cues generate gustatory plasticity in *Caenorhabditis elegans*. EMBO J 25:312–322.

Hukema RK, Rademakers S, Jansen G. (2008) Gustatory plasticity in *C. elegans* involves integration of negative cues and NaCl taste mediated by serotonin, dopamine, and glutamate. Learn Mem 15:829–836.

Ideker T, Galitski T, Hood L (2001) A new approach to decoding life: systems biology. Annu Rev Genomics Hum Genet 2:343–372.

Janelsins MC, Kohli S, Mohile SG, Usuki K, Ahles TA, Morrow GR. (2011) An update on cancer- and chemotherapy-related cognitive dysfunction: current status. Semin Oncol 38:431–438.

Jang SI, Lee EJ, Hart PS, Ramaswami M, Pallos D, Hart TC. (2007) Germ line gain of function with SOS1 mutation in hereditary gingival fibromatosis. J Biol Chem 282:20245–20255.

Jansen G, Weinkove D, Plasterk RHA. (2002) The G-protein γ subunit gpc-1 of the nematode *C. elegans* is involved in taste adaptation. EMBO J 21:986–994.

Kaletta T, Hengartner MO. (2006) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. Nat Rev Drug Discov 5:387–398.

Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser a G, Ahringer J. (2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Genome Biol 2:RESEARCH0002.

Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. (2014) Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. Nucleic Acids Res 42:D199–D205.

Karnoub AE, Weinberg R. (2008) Ras oncogenes: split personalities. Nat Rev Mol Cell Biol 9:517–531.

Kim JH, Lee H-K, Takamiya K, Huganir RL. (2003) The role of synaptic GTPase-activating protein in neuronal development and synaptic plasticity. J Neurosci 23:1119–1124.

Kim EK, Choi E-J. (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. Biochim Biophys Acta 1802:396–405.

Kitano H. (2002) Computational systems biology. Nature 420:206–210.

Klegeris A, Pelech S, Giasson BI, Maguire J, Zhang H, McGeer EG, McGeer PL. (2008) Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. Neurobiol Aging 29:739–752.

Komiyama NH, Watabe AM, Carlisle HJ, Porter K, Charlesworth P, Monti J, Strathdee DJC, O'Carroll CM, Martin SJ, Morris RGM, O'Dell TJ, Grant SGN. (2002) SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. J Neurosci 22:9721–9732.

Koudova M, Seemanova E, Zenker M. (2009) Novel BRAF mutation in a patient with LEOPARD syndrome and normal intelligence. Eur J Med Genet 52:337–340.

Laßek M, Weingarten J, Volknandt W. (2014) The synaptic proteome. Cell Tissue Res:255–265.

Law V, Knox C, Djoumbou Y, Jewison T, Guo AC, Liu Y, Maciejewski A, Arndt D, Wilson M, Neveu V, Tang A, Gabriel G, Ly C, Adamjee S, Dame ZT, Han B, Zhou Y, Wishart DS. (2014) DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. Nucleic Acids Res 42:D1091–D1097.

Lee J, Jee C, McIntire SL. (2009) Ethanol preference in *C. elegans*. Genes, Brain Behav 8:578–585.

Lewczuk P, Mroczko B, Fagan A, Kornhuber J. (2015) Advances in Medical Sciences Biomarkers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: A current perspective. Adv Med Sci 60:76–82.

Ligeti E, Welti S, Scheffzek K. (2012) Inhibition and Termination of Physiological Responses by GTPase Activating Proteins. Physiol Rev 92:237–272.

Lim CS, Hoang ET, Viar KE, Stornetta RL, Scott MM, Zhu JJ. (2014) Pharmacological rescue of Ras signaling, GluA1-dependent synaptic plasticity, and learning deficits in a fragile X model. Genes Dev 28:273–289.

Liu YF, Deth RC, Devys D. (1997) SH3 domain-dependent association of huntingtin with epidermal growth factor receptor signaling complexes. J Biol Chem 272:8121–8124.

Lockyer PJ, Kupzig S, Cullen PJ. (2001) CAPRI regulates Ca^{2+}-dependent inactivation of the Ras-MAPK pathway. Curr Biol 11:981–986.

Lopreato J, von Bertalanffy L. (1970) General System Theory: Foundations, Development, Applications. Am Sociol Rev 35:543.

Lu JJ, Pan W, Hu YJ, Wang YT. (2012) Multi-target drugs: The trend of drug research and development. PLoS One 7:e40262.

Malumbres M, Barbacid M. (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. Nat Rev Cancer 3:459–465.

Mattingly RR. (2013) Activated Ras as a therapeutic target: constraints on directly targeting Ras isoforms and wild-type versus mutated proteins. ISRN Oncol 2013:536529.

McGlade J, Brunkhorst B, Anderson D, Mbamalu G, Settleman J, Dedhar S, Rozakis-Adcock M, Chen LB, Pawson T. (1993) The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. EMBO J 12:3073–3081.

Mohri A, Kodama E, Kimura KD, Koike M, Mizuno T, Mori I. (2005) Genetic control of temperature preference in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Genetics 169:1437–1450.

Morozov A, Muzzio I, Bourtchouladze R, Van-Strien N, Lapidus K, Yin D, Winder DG, Adams JP, Sweatt JD, Kandel ER. (2003) Rap1 couples cAMP signaling to a distinct

pool of p42/44MAPK regulating excitability, synaptic plasticity, learning, and memory. Neuron 39:309–325.

Morrison GE, Wen JY, Runciman S, van der Kooy D. (1999) Olfactory associative learning in *Caenorhabditis elegans* is impaired in *lrn-1* and *lrn-2* mutants. Behav Neurosci 113:358–367.

Moult PR, Corrêa SL, Collingridge GL, Fitzjohn SM, Bashir ZI. (2008) Co-activation of p38 mitogen-activated protein kinase and protein tyrosine phosphatase underlies metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. J Physiol 586:2499–2510.

Murer MG, Moratalla R. (2011) Striatal signaling in L-DOPA-induced dyskinesia: common mechanisms with drug abuse and long term memory involving D1 dopamine receptor stimulation. Front Neuroanat 5:51.

Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cavé H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RCM, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. (2006) Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. Nat Genet 38:294–296.

Nishimura K, Nakamura K, Anitha A, Yamada K, Tsujii M, Iwayama Y, Hattori E, Toyota T, Takei N, Miyachi T, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Kawai M, Sekine Y, Tsuchiya K, Sugihara G, Suda S, Ouchi Y, Sugiyama T, Yoshikawa T, Mori N. (2007) Genetic analyses of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene in autism. Biochem Biophys Res Commun 356:200–206.

Noonan J. (1968) Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease. Am J Dis Child 116:373–380.

Nuttley WM, Harbinder S, van der Kooy D. (2001) Regulation of Distinct Attractive and Aversive Mechanisms Mediating Benzaldehyde Chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. Learn Mem 8:170–181.

Nuttley WM, Atkinson-Leadbeater KP, Van Der Kooy D. (2002) Serotonin mediates food-odor associative learning in the nematode Caenorhabditiselegans. Proc Natl Acad Sci USA 99:12449–12454.

Oliveira AF, Yasuda R. (2014) Neurofibromin is the major ras inactivator in dendritic spines. J Neurosci 34:776–783.

Pamonsinlapatham P, Hadj-Slimane R, Lepelletier Y, Allain B, Toccafondi M, Garbay C, Raynaud F (2009) P120-Ras GTPase activating protein (RasGAP): A multi-interacting protein in downstream signaling. Biochimie 91:320–328.

Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio L, Carta C, Oishi K, Martinelli S, Pogna E, Schackwitz W, Ustaszewska A, Landstrom A, Bos JM, Ommen SR, Esposito G, Lepri F, Faul C, Mundel P, López SJP, Tenconi R, Selicorni A, Rossi C, Mazzanti L, Torrente I, Marino B, Digilio MC, Zampino G, Ackerman MJ, Dallapiccola B, Tartaglia M, Gelb BD. (2007) Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. Nat Genet 39:1007–1012.

Peng S, Zhang Y, Zhang J, Wang H, Ren B. (2010) ERK in learning and memory: A review of recent research. Int J Mol Sci 11:222–232.

Perkinton MS, Sihra TS, Williams RJ. (1999) Ca^{2+}-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. J Neurosci 19:5861–5874.

Pierpont EI, Tworog-Dube E, Roberts AE. (2013) Learning and memory in children with Noonan syndrome. Am J Med Genet Part A 161:2250–2257.

Rankin CH, Beck CD, Chiba CM. (1990) *Caenorhabditis elegans*: a new model system for the study of learning and memory. Behav Brain Res 37:89–92.

Rauen K. (2013) The RASopathies. Annu Rev Genomics Hum Genet 14:355–369.

Remy J-J, Hobert O. (2005) An interneuronal chemoreceptor required for olfactory imprinting in *C. elegans*. Science 309:787–790.

Rinderknecht JD, Goldinger SM, Rozati S, Kamarashev J, Kerl K, French LE, Dummer R, Belloni B. (2013) RASopathic skin eruptions during vemurafenib therapy. PLoS One 8:e58721.

Rose JK, Rankin CH. (2001) Analyses of habituation in *Caenorhabditis elegans*. Learn Mem 8:63–69.

Rumbaugh G, Adams JP, Kim JH, Huganir RL. (2006) SynGAP regulates synaptic strength and mitogen-activated protein kinases in cultured neurons. Proc Natl Acad Sci USA 103:4344–4351.

Saeki S, Yamamoto M, Iino Y. (2001) Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. J Exp Biol 204:1757–1764.

Sarkozy A, Carta C, Moretti S, Zampino G, Digilio MC, Pantaleoni F, Scioletti AP, Esposito G, Cordeddu V, Lepri F, Petrangeli V, Dentici ML, Mancini GMS, Selicorni A, Rossi C, Mazzanti L, Marino B, Ferrero GB, Silengo MC, Memo L, Stanzial F, Faravelli F, Stuppia L, Puxeddu E, Gelb BD, Dallapiccola B, Tartaglia M. (2009) Germline BRAF mutations in noonan, LEOPARD, and cardiofaciocutaneous

Syndromes: Molecular diversity and associated phenotypic spectrum. Hum Mutat 30:695–702.

Sawin ER, Ranganathan R, Horvitz HR. (2000) *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. Neuron 26:619–631.

Scheffzek K, Ahmadian MR. (2005) GTPase activating proteins: Structural and functional insights 18 years after discovery. Cell Mol Life Sci 62:3014–3038.

Schubbert S, Zenker M, Rowe SL, Böll S, Klein C, Bollag G, van der Burgt I, Musante L, Kalscheuer V, Wehner L-E, Nguyen H, West B, Zhang KYJ, Sistermans E, Rauch A, Niemeyer CM, Shannon K, Kratz CP. (2006) Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. Nat Genet 38:331–336.

Shen J. (2004) Protein kinases linked to the pathogenesis of Parkinson's disease. Neuron 44:575–577.

Shin J, Padmanabhan A, de Groh ED, Lee J-S, Haidar S, Dahlberg S, Guo F, He S, Wolman M, Granato M, Lawson ND, Wolfe S, Kim S-H, Solnica-Krezel L, Kanki JP, Ligon KL, Epstein J, Look T. (2012) Zebrafish neurofibromatosis type 1 genes have redundant functions in tumorigenesis and embryonic development. Dis Model Mech 5:881–894.

Sieburth D, Ch'ng Q, Dybbs M, Tavazoie M, Kennedy S, Wang D, Dupuy D, Rual J-F, Hill DE, Vidal M, Ruvkun G, Kaplan JM. (2005) Systematic analysis of genes required for synapse structure and function. Nature 436:510–517.

Silberberg Y, Gottlieb A, Kupiec M, Ruppin E, Sharan R. (2012) Large-scale elucidation of drug response pathways in humans. J Comput Biol 19:163–174.

Skuse GR, Kosciolek BA, Rowley PT. (1989) Molecular genetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis: loss of heterozygosity for chromosome 17. Genes Chromosomes Cancer 1:36–41.

Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T. (2011) Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization. Bioinformatics 27:431–432.

Steták A, Gutierrez P, Hajnal A. (2008) Tissue-specific functions of the *Caenorhabditis elegans* p120 Ras GTPase activating protein GAP-3. Dev Biol 323:166–176.

Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 100:64–119.

Thao DTP, An PNT, Yamaguchi M, LinhThuoc T. (2012) Overexpression of ubiquitin carboxyl terminal hydrolase impairs multiple pathways during eye development in *Drosophila melanogaster*. Cell Tissue Res 348:453–463.

The Gene Ontology Consortium. Gene ontology: tool for the unification of biology. Nat Genet. May 2000;25(1):25-9.

Tidyman WE, Rauen KA. (2010) The RASopathies: Developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. Nat Genet 19:230–236.

Tocque B, Delumeau I, Parker F, Maurier F, Multon MC, Schweighoffer F. (1997) Ras-GTPase activating protein (GAP): A putative effector for Ras. Cell Signal 9:153–158.

Trahey M, McCormick F. (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. Science 238:542–545.

Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A. (1996) Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. Nature 384:567–570.

UniProt Consortium. (2014) UniProt: a hub for protein information. Nucleic Acids Res 43:D204–D212.

Varshney LR, Chen BL, Paniagua E, Hall DH, Chklovskii DB. (2011) Structural properties of the *Caenorhabditis elegans* neuronal network. PLoS Comput Biol 7:e1001066.

Vassar R, Kandalepas PC. (2011) The β-secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. Alzheimers Res Ther 3:20.

Vellai T, McCulloch D, Gems D, Kovács AL. (2006) Effects of sex and insulin/insulin-like growth factor-1 signaling on performance in an associative learning paradigm in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 174:309–316.

Veres DV, Gyurkó MD, Thaler B, Szalay KZ, Fazekas D, Korcsmáros T, Csermely P. (2015) ComPPI: a cellular compartment-specific database for protein- protein interaction network analysis. Nucleic Acids Res 43:D485–D493.

Von Eichborn J, Dunkel M, Gohlke BO, Preissner SC, Hoffmann MF, Bauer JMJ, Armstrong JD, Schaefer MH, Andrade-Navarro M, Le Novere N, Croning MDR, Grant SGN, Van Nierop P, Smit AB, Preissner R. (2013) SynSysNet: Integration of experimental data on synaptic protein-protein interactions with drug-target relations. Nucleic Acids Res 41:D834–D840.

Wallace MR, Marchuk D, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino M, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL. (1990) Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. Science 249:181–186.

Wang X, Thijssen B, Yu H. (2013) Target Essentiality and Centrality Characterize Drug Side Effects. PLoS Comput Biol 9:e1003119.

Welch BL. (1947) The Generalization of “Student”s’ Problem When Several Different Population Variances Are Involved. Biometrika 34:28–35.

Wen JY, Kumar N, Morrison G, Rambaldini G, Runciman S, Rousseau J, van der Kooy D. (1997) Mutations that prevent associative learning in *C. elegans*. Behav Neurosci 111:354–368.

Wenger Y, Galliot B. (2013) Punctuated emergences of genetic and phenotypic innovations in eumetazoan, bilaterian, euteleostome, and hominidae ancestors. Genome Biol Evol 5:1949–1968.

White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. (1986) The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Philos Trans R Soc B Biol Sci 314:1–340.

Wiegert JS, Bading H. (2011) Activity-dependent calcium signaling and ERK-MAP kinases in neurons: A link to structural plasticity of the nucleus and gene transcription regulation. Cell Calcium 49:296–305.

WormAtlas, Altun ZF, Herndon LA, Crocker C, Lints R, Hall DH. (szerk.) WormAtlas: A database featuring behavioral and structural anatomy of *Caenorhabditis elegans*. 2015: http://www.wormatlas.org.

Xia Z, Storm DR. (2012) Role of signal transduction crosstalk between adenylyl cyclase and MAP kinase in hippocampus-dependent memory. Learn Mem 19:369–374.

Yu X, Zhao W, Ma J, Fu X, Zhao ZJ. (2011) Beneficial and harmful effects of alcohol exposure on *Caenorhabditis elegans* worms. Biochem Biophys Res Commun 412:757–762.

Yuan L-L, Adams JP, Swank M, Sweatt JD, Johnston D. (2002) Protein kinase modulation of dendritic K^+ channels in hippocampus involves a mitogen-activated protein kinase pathway. J Neurosci 22:4860–4868.

Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R. (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. Cell 110:443–455.

Zimmermann GR, Lehár J, Keith CT. (2007) Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. Drug Discov Today 12:34–42.

Zimmermann GR, Papke B, Ismail S, Vartak N, Chandra A, Hoffmann M, Hahn S, Triola G, Wittinghofer A, Bastiaens PIH, Waldmann H. (2013) Small molecule inhibition of the KRAS-PDEδ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. Nature 497:638–642.

12. Saját publikációk jegyzéke

12.1. A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

Gyurkó MD, Csermely P, Soti C, Stetak A. (2015) Distinct roles of the RasGAP family proteins in *C. elegans* associative learning and memory. Sci Rep 5:15084.

Veres DV, **Gyurkó MD**, Thaler B, Szalay KZ, Fazekas D, Korcsmáros T, Csermely P. (2015) ComPPI: a cellular compartment-specific database for protein-protein interaction network analysis. Nucleic Acids Res 43:D485–D493.

Gyurkó MD, Steták A, Sőti C, Csermely P. (2015) Multitarget network strategies to influence memory and forgetting: The Ras/Mapk pathway as a novel option. Mini-Rev Med Chem 15:1–9.

12.2. A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények

Gyurkó MD, Sőti C, Steták A, Csermely P. (2014) System level mechanisms of adaptation, learning, memory formation and evolvability: the role of chaperone and other networks. Curr Protein Pept Sci 15:171–188.

Gyurkó MD, Veres DV, Módos D, Lenti K, Korcsmáros T, Csermely P. (2013) Adaptation and learning of molecular networks as a description of cancer development at the systems-level: Potential use in anti-cancer therapies. Semin Cancer Biol 23:262-269.

Simkó GI, **Gyurkó MD**, Veres D V, Nánási T, Csermely P. (2009) Network strategies to understand the aging process and help age-related drug design. Genome Med 1:90.

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőimnek, Csermely Péter professzor úrnak és Sőti Csaba egyetemi docens úrnak, hogy szakmai tanácsaikkal, a munkakörülmények megteremtésével és kutatási szemléletükkel doktori munkámat, szakmai fejlődésemet támogatták. Köszönettel tartozom Mandl József professzor úrnak, a Semmelweis Egyetem Molekuláris Orvostudományok Tudományági Doktori Iskola vezetőjének, illetve az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet volt igazgatójának, valamint Bánhegyi Gábor professzor úrnak, az intézet jelenlegi igazgatójának, akiknek jóvoltából a doktori iskolában, illetve az intézet falai közt végezhettem munkámat.

Köszönöm Prof. Andreas Papassotiropoulos-nak, a Bázeli Egyetem Molekuláris Pszichológia Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette kinttartózkodásomat. Külön köszönettel adózom Dr. Steták Attilának, az említett tanszéken található *C. elegans* labor vezetőjének, aki szakmai tanácsokkal, kísérleti háttérrel és szakmán kívüli segítséggel egyaránt ellátott.

Köszönöm a LINK-Group és Stressz-Group kutatócsoportok tagjainak előadásaimra adott hasznos visszajelzéseiket, melyekkel hálózatos és kísérletes aspektusban is előremozdították kutatásomat. Köszönöm Gilányi Beatrixnak, hogy számtalanszor levette vállunkról a terheket, valamint Szalay Kristófnak és Somogyvári Milánnak, akikkel PhD képzésünk során beszélgetéseink szellemi táplálékot jelentettek. Köszönöm a Richter Gedeon Zrt. Centenáriumi Alapítványának a munkához nyújtott pályázati támogatást.

Köszönöm Veres Dánielnek gyümölcsöző beszélgetéseinket, hasznos gondolatait és a ComPPI kapcsán zajlott közös munkát: „ez jó mulatság, férfimunka volt”! Fenyves Bánknak szintúgy köszönöm közös munkánkat és beszélgetéseinket.

Végül, de semmiképp sem utolsó sorban szeretném köszönetem kifejezni családomnak és barátaimnak, akik a munkával szemben a mérleg másik serpenyőjét képviselték. Hálásan köszönöm édesanyámnak, Gasztonyi Juditnak és Merckle Andreának, akik meleg szívükkel és emberfeletti türelmükkel lehetővé tették, hogy éjjeleimet is nappallá változtassam. Köszönöm Gyurkó Juditnak életet adó beszélgetéseinket és azt, hogy karöltve, jó szívvel lépdelhetünk előre. Köszönöm

Briglevics Tamásnak inspiráló és nem ritkán szakmai diskurzusainkat, valamint Kereső Zoltánnal, Probocskai Gáborral és Tiba Dorottyával együtt mindannyiuknak baráti támogatásukat.

14. Ábrák és táblázatok jegyzéke

14.1. Ábrák

1. ábra. A RasGAPok és GEFek szerepe sematikusan a Ras szabályzásában. 6
2. ábra. A GAP fehérjék szerkezete. 10
3. ábra. A RasGAPok a Ras GTPáz ciklusában, valamint a prototípus Ras/MAPK jelpályában. 11
4. ábra. A molekuláris hálózatok elvének sematikus ábrázolása. 21
5. ábra. A kemotaxison alapuló tesztek kísérleti környezetének illusztrációja. 26
6. ábra. A RasGAPok lehetséges jelátvitelét, valamint a tanulás és memória főbb jelpályáit hálózatos megközelítésben gyűjtő adatbázis építésének folyamatábrája. 31
7. ábra. A különböző RasGAP izoformák szerepe a kemotaxisban. 35
8. ábra. A *gap* mutációk nem befolyásolják a motilitást. 37
9. ábra. A RasGAPok komplex együttműködése szükséges az asszociatív tanuláshoz és rövid távú memóriához. 39
10. ábra. A RasGAPok szerepet játszanak a hosszú távú memória kialakulásában. 42
11. ábra. A GAP-2 és GAP-3 RNS interferencia általi csendesítése a *gap* mutáns fenotípusok fenokópiáját eredményezi. 44
12. ábra. A *gap-1* gén mikroinjektálása menti a funkcióvesztő *gap-1* fenotípust. 45
13. ábra. A *let-60* gén szükséges a gap mutáns törzseknél megfigyelt tanulási és memória-fenotípusokhoz. 46
14. ábra. A ComPPI-ban megtalálható összes fehérje száma, illetve az ezeket biztosító források a szolgáltatott adatmennyiség szerint csökkenő sorrendben. 49
15. ábra. A ComPPI-ban megtalálható összes interakció, illetve az adatokat biztosító források a szolgáltatott adatmennyiség szerint csökkenő sorrendben. 49
16. ábra. A ComPPI weboldalának keresőfelülete. 51
17. ábra. A köztes találatválasztó oldal fehérjekeresés esetén. 52
18. ábra. A találati oldal egyes részei a keresett fehérje adataival és interaktorainak részletes listájával. 53
19. ábra. A RasGAP fehérjecsalád tagjainak fehérje-fehérje interakciós hálózata a ComPPI alapján. 56

20. ábra. A Ras/MAPK, IP_3/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI_3K jelpályák és a Ca^{2+} jelátvitel sematikus hálózata neuronokban. 59
21. ábra. A Ras/MAPK jelpályához kapcsolódó gyógyszerek és betegségek sematikus hálózata. 61

14.2. Táblázatok

1. táblázat. A C. elegans gap gének humán ortológjai, valamint a közöttük fennálló szekvenciahasonlóság az NCBI nucleotide blast eszközének BLASTn algoritmusa alapján 9
2. táblázat. Rasopátiák: a Ras/MAPK jelpálya génjeinek csíravonali mutációival társított betegségek. 16
3. táblázat. A kísérletek során használt törzsek listája a leíró publikációkkal. 25
4. táblázat. A gap gének mutációival kapcsolatban megfigyelt fenotípusok. 43
5. táblázat. A Ras/MAPK jelpályát célzó, jóváhagyott gyógyszerek a DrugBank adatbázis alapján. 61