

Szakmai beszámoló

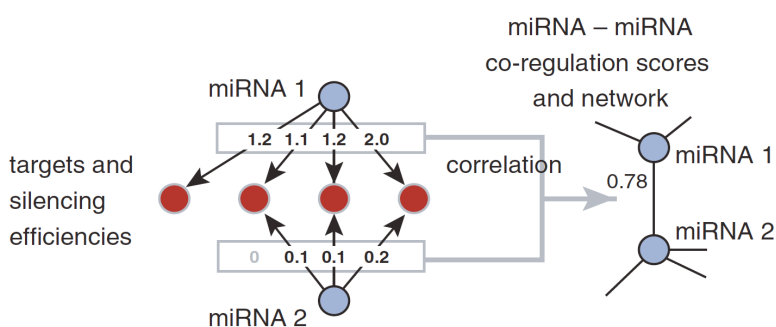
A projekt címe: Komplex hálózatok a molekuláris biológiai szabályozásban
(Complex networks in molecular biological regulation)

A projekt támogatásával referált nemzetközi folyóiratokban 3 publikáció jelent meg, ezeknek az összesített impakt faktora 14.2. A záró szakmai beszámoló időpontjáig (2011. júliusig) a 2009-ben megjelent cikkekre 5, a 2010-ben megjelent cikkekre 3 független hivatkozás érkezett referált nemzetközi folyóiratokban. A kutatás eredményeiről 2011 júniusában a vezető kutató nemzetközi konferencián (International Conference of Biological Physics) előadást tartott. A projekt időtartama alatt az eredmények megjelentek 5 nemzetközi konferencia poszteren és számos szemináriumi előadáson.

Szabályozási feladatok átfedése emberi mikroRNS-ek hálózatában

A rövid szabályozó RNS-ek számos biológiai folyamatot szabályoznak. A transzkripciós faktor fehérjékhez képest specializáltabb szabályozási lehetőséget biztosítanak, és eltávolításuk ritkábban teszi az adott sejtet életképtelenné.

A rövid szabályozó RNS-ek egyik típusa a mikroRNS (miRNS). A mikroRNS-ek messenger RNS-ek (mRNS-ek) működését gátolják: egy mikroRNS több mRNS-t is gátolhat, és egy mRNS-t több mikroRNS gátolhat. A mikroRNS-mRNS bipartit hálózatot jelenleg kísérleti módszerekkel nem lehet meghatározni megfelelő pontossággal (sem emberi, sem más sejtekben). A kísérletekben ellenőrzött mikroRNS-mRNS párok száma jelenleg 100 alatt van (Sethupathy, 2006). Számos bioinformatikai módszer ismert a bipartit hálózat éleinek (mikroRNS-mRNS pároknak) a pontosabb felsorolására (Griffiths-Jones, 2008; Kertesz, 2007; Lall, 2006; Lewis 2003). Eredményeik (Boross, 2009) szerint a különböző bioinformatikai módszerekkel meghatározott mikroRNS-mRNS pár listák között jelentős különbségek vannak. Vizsgálatainkhoz ezeknek a listáknak az összesítése helyett a – kísérleti eredményekkel összehasonlítva – két legjobb minőségű listát választottuk, és mindkettővel elvégeztük az itt leírt elemzéseket. Első lépésként elkészítettük a humán (emberi) mikroRNS-ek együtt szabályozási hálózatát, amelyben minden csúcspont egy mikroRNS-t jelöl. Ebben a hálózatban két pont össze van kötve, ha a két mikroRNS-nek van közös célpontja (létezik olyan messenger RNS, amelyet mindkét mikroRNS gátol). Az él erősségét a két összekötött csúcspont által jelölt két mikroRNS szabályozási erősségeinek a korrelációjaként definiáltuk (1. ábra).



1. ábra. Az ábra átvétel a projekt támogatásával megjelent (Boross, 2009) publikációból. A mikroRNS-eket (miRNS-eket) kék, a messenger RNS-eket (mRNS-eket) piros pontok jelölik. A két jelölt mikroRNS együtt szabályozási erősségét a két, szürke kerettel jelölt számsor korrelációjaként definiáltuk. A kapott él erősségek határozták meg az élek erősségét a mikroRNS-ek együtt szabályozási hálózatában.

A mikroRNS-ek együtt szabályozási hálózatában azonosítottuk együtt szabályozó mikroRNS-ek csoportjait a CFinder hálózati modulkereső módszerrel (Palla, 2005; Adamcsek, 2006). Annak ellenére, hogy a CFinder modulkereső megengedi az átfedéseket a hálózati modulok között, a mikroRNS-ek azonosított csoportjai között nagyon kevés átfedést találtunk. Ez valószínűleg kapcsolatos azzal, hogy a mikroRNS-ek szabályozási kölcsönhatásaira igen erős hatása van a szekvenciájuk 2-estől 8-as bázisig tartó része, és jóval kisebb hatással a szekvencia többi része. További részletek találhatóak a pályázat támogatásával készült (Boross, 2009) publikációban.

A mikroRNS-ek azonosított csoportjai alapján és a mikroRNS-ek kísérletekből (Landgraf, 2007) ismert expressziós szintjei segítségével definiáltuk, hogy a mikroRNS-ek az emberi sejtek működéséhez mennyire fontosak (essenciálisak). A fontosság („essentiality”) definiálásához az egyes biológiai funkciók kiemelésé helyett azt vettük figyelembe, hogy egy olyan csoportban, amelyben a mikroRNS-ek igen hasonló szabályozási feladatokat végeznek, mely mikroRNS-ek

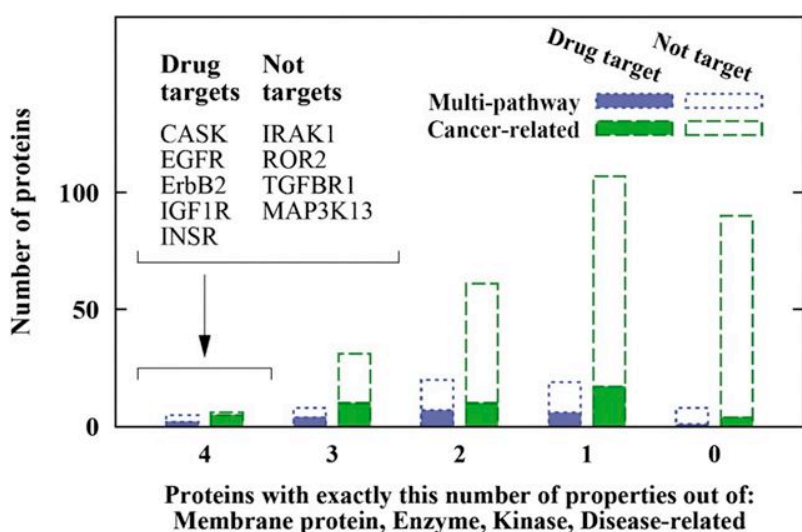
vannak jelen a többitől eltérő időpontban vagy sejt típusban. Másként fogalmazva: Azonos szabályozási feladatot végző, de eltérő szabályozás alatt álló mikroRNS-eket kerestünk. Hasonlatként gondoljunk dolgozók egy csoportjára, akik közül sokan azonos helyen és azonos időpontban végzik a munkájukat (ezért közülük egy fő hiányzását a teljes csoport nem „érzi”), viszont néhányan a többiektől eltérő időpontban és helyszínen dolgoznak (az ő hiányzásuk könnyebben észrevehető).

Vizsgálataink megerősítették azokat a korábbi kísérleti eredményeket, amelyek szerint a mikroRNS-ek a transzkripció faktoroknál jóval specializáltabb szabályozást (Farh, 2005) végeznek. Továbbá eredményeink javaslatokat adnak konkrét mikroRNS kiütési („knock-out”) kísérletekhez, amelyekkel mérhető, hogy az adott mikroRNS kiütések közül melyeknek vannak jelentős fenotípusos hatása. Szintén érdekes eredmény, hogy a gyengébb minőségű kiindulási adatsorokon belül az átlagosnál lényegesen jobb minőségű adat részcsoportokat azonosítottunk.

Sejten belüli jelátviteli útvonalak hálózatának felhasználása gyógyszer célpont fehérjék kijelölésére

A sejten belüli jelátviteli útvonalak jelentős biológiai szerepe ellenére az útvonalakban részt vevő fehérjéket és jelátviteli kölcsönhatásaikat felsoroló adatbázisok (Ogata, 1999; Kandasamy, 2010; Joshi-Tope, 2005) között jelentős eltérések találhatók. Emiatt az útvonalak között összehasonlító vizsgálatok és modellezési vizsgálatok nehezen végezhetőek.

Irodalmi adatok alapján elvégeztük 8, sejten belüli jelátviteli útvonalban (EGF/MAPK, Hh, IGF/Ins, JAK/STAT, NHR, Notch, TGF, WNT/Wingless) található jelátviteli kölcsönhatások egységes összegyűjtését 3 fajban (*C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*). A gyűjtéshez 170 összefoglaló (review) cikket használtunk, valamint 600-nál több kutatási cikket. Egy kölcsönhatás (hálózati él) csak akkor került bele a gyűjtésbe, ha az adott kölcsönhatásról elsődleges biokémiai kísérleti bizonyíték állt rendelkezésre. A gyűjtés jelentős előnye, hogy a – cikk kiegészítő anyagában (supplementary material) – leírt részletes gyűjtési feltételek egységes használata mind a 8 útvonal és mindhárom faj esetén egységes útvonal adatbázist hozott létre.



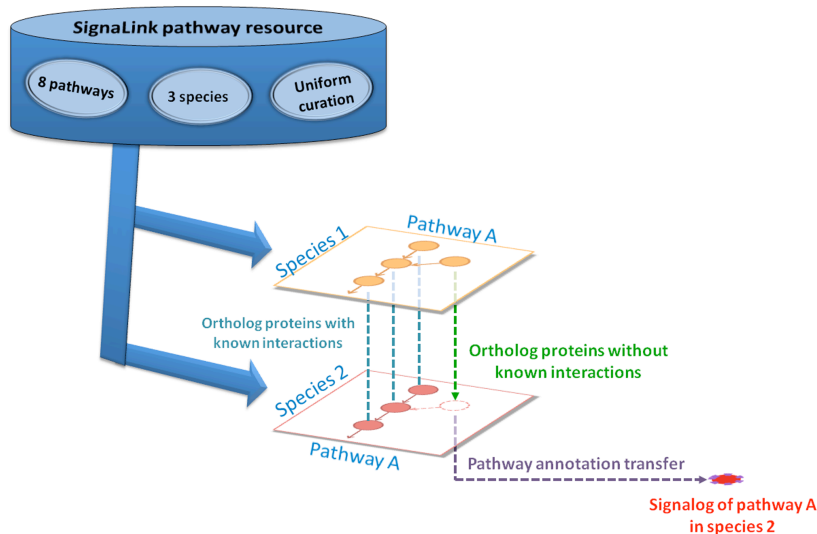
2. ábra. Az ábra átvétel a projekt támogatásával megjelent (Korcsmáros, 2010) publikációból. A jelátviteli kölcsönhatás-hálózat és ismert gyógyszer célpont fehérjék tulajdonságai alapján a négy legnagyobb eséllyel javasolt gyógyszer célpont fehérje az IRAK1, ROR2, TGFBR1 és MAP3K13 fehérjék. Ezek közül a ROR2 fehérjét már javasolták egy kísérleti publikációban (Morioka, 2009) gyógyszer célpontnak. A másik három fehérjére a (Korcsmáros, 2010) publikáció idejében még nem volt ismert hasonló eredmény.

A létrehozott jelátviteli útvonal-hálózat alapján azt találtuk, hogy emberi sejtekben a 8 útvonal közül bármelyik kettő között van jelátviteli kölcsönhatás. További érdekes eredmény, hogy ismert gyógyszer célpont fehérjék jellemző tulajdonságaira történő többszörös szűréssel azonosítottunk fehérjéket (fontossági sorrendben felsorolva) amelyek gyógyszer célpontok lehetnek. Az összeállított biokémiai kölcsönhatás-hálózat alkalmas dinamikai modellezésre. Az eredményeket bemutató weboldal: <http://Signalink.org>.

Sejten belüli jelátviteli útvonalak korábban nem ismert résztvevő fehérjeinek előrejelzése más szervezetek jelátviteli fehérjeivel való szekvencia hasonlóság alapján

A Signalink adatbázis jelátviteli útvonal hálózati adataiból kiindulva hálózati és bioinformatikai eszközök segítségével felsoroltunk olyan fehérjéket mindhárom fajban (*C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*), amelyek jelentős eséllyel egy-egy jelátviteli útvonalnak további (eddiggi kísérletekkel nem igazolt) tagjai. A 3 fajban jósolt 200 feletti új útvonal tag fehérje közül 6, a *C. elegans*-ban

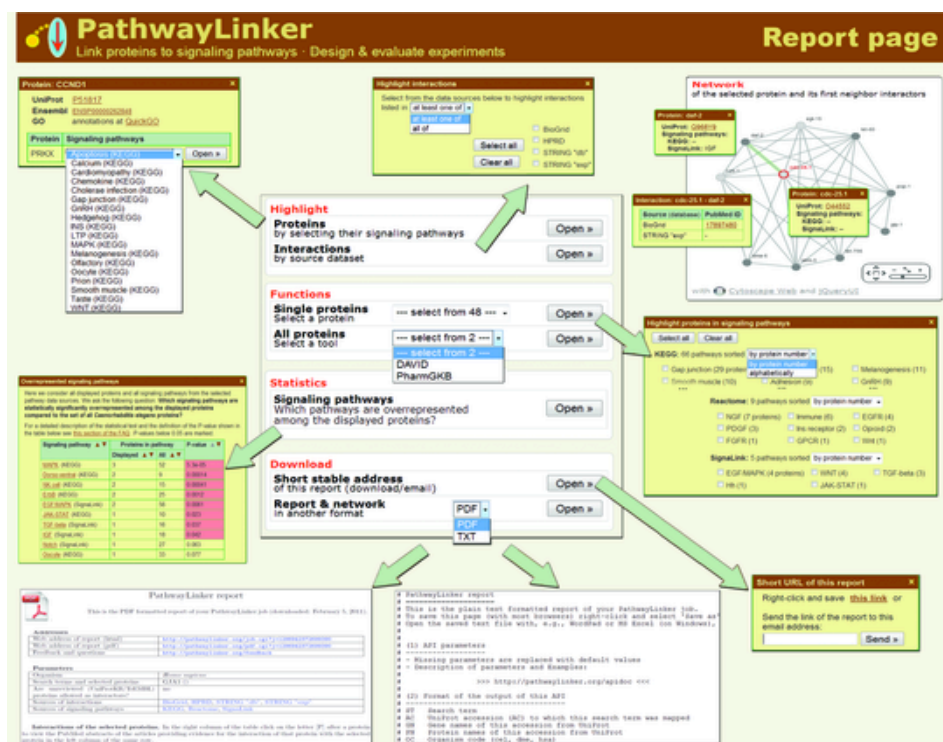
található fehérje Notch jelátviteli útvonalbeli működését kísérletesen igazolták a pályázat által támogatott, megjelent cikk (Korcsmáros, 2011) társszerzői az ELTE Genetika tanszékén. A *C. elegans*-ban előrejelzett további 82, *D. melanogaster*-ben 92, és emberi sejtekben felsorolt 73 új jelátviteli útvonal fehérje jelentős eséllyel szintén részt vesz a jelátviteli hálózatban. A jelátviteli hálózat pontosabb és teljesebb feltérképezése modellezési és gyógyszerkutatósi szempontból egyaránt jelentős.



3. ábra. Az ábra átvétel a projekt támogatásával megjelent (Korcsmáros, 2011) publikációból. A három vizsgált faj jelátviteli hálózata között ortológ faj (szekvenca hasonlóság) alapján készítettünk megfigletéseket. Az egymásra vetített hálózatrészek segítségével előrejelztünk összesen 253 új útvonal tag fehérjét. Ezek közül 6 *C. elegans* fehérjéről sikerült kísérletekkel igazolni, hogy valóban a Notch útvonalban vesznek részt. Az elemzések kiindulópontja minden esetben a korábban készített Signalink jelátviteli útvonal adatbázis volt.

Sejten belüli jelátviteli hálózati annotációk gyors elemzése

A projekt során vizsgált molekuláris biológiai szabályozási hálózatok egyik fontos tulajdonsága, hogy a hálózat csúcspontjai (fehérjék) számos annotációval (jelöléssel) rendelkeznek. Ezek közül az egyik legjelentősebb a jelátviteli útvonal tagság: az adott fehérje melyik jelátviteli útvonal(ak) működésében vesz részt. A korábban vizsgált három faj (*C. elegans*, *D. melanogaster*, *H. sapiens*) jelátviteli útvonalainak gyors kereshetősége érdekében készítettünk egy kereső szolgáltatást, amelynek célja, hogy a felhasználó által kiválasztott néhány fehérjére és a velük közvetlen kölcsönhatásban lévő további fehérjékre meghatározza, hogy mely jelátviteli útvonalakban vesznek részt. A szolgáltatást kísérleti munkát végző kollégák részére készítettük és a szolgáltatást bemutató publikáció jelenleg előkészületben van. Az online szolgáltatás címe: <http://PathwayLinker.org>.



4. ábra. Az ábra átvétel a projekt támogatásával előkészületben lévő kéziratból (Farkas, Szántó, Korcsmáros). A <http://PathwayLinker.org> web címen található szolgáltatás egy erősen annotált molekuláris biológiai szabályozási hálózat, a jelátviteli hálózat gyors elemzését segíti. A kereső oldalon a felhasználó által beírt fehérjéket és az azokkal közvetlen kölcsönhatásban álló további fehérjéket a szerver riport oldala megjeleníti hálózatos és többféle kereshető formátumban. A szolgáltatás egyik fontos alkalmazása annak megállapítása (szignifikancia tesztek és P értékek segítségével), hogy a kijelölt fehérjék és kölcsönható szomszédai mely jelátviteli útvonalakban vesznek részt.

Publikációk

A projekt támogatásával referált nemzetközi folyóiratokban megjelent publikációk

- Boross, G., Orosz, K., Farkas, I. J., Human microRNAs co-silence in well-separated groups and have different predicted essentialities. *Bioinformatics* (2009) **25**, 1063. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm952>
Impakt faktor: **4.9**; Független hivatkozások referált nemzetközi folyóiratokban (2011. júliusig): **5**
Peng, X., et al., Computational identification of hepatitis C virus associated microRNA-mRNA regulatory modules in human livers. *BMC Genomics* (2009) **10**, 373. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-373>
Xu, J., et al., MiRNA-miRNA synergistic network: construction via co-regulating functional modules and disease miRNA topological features. *Nucl. Acids Res.* (2011) **39**, 825. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq832>
Jiang, Q., et al., Prioritization of disease microRNAs through a human phenome-microRNAome network. *BMC Systems Biology* (2010), **4** (Suppl 1), S2. <http://dx.doi.org/10.1186/1752-0509-4-S1-S2>
Radfar, M. H., et al., Computational Prediction of Intronic microRNA Targets using Host Gene Expression Reveals Novel Regulatory Mechanisms. *PLoS ONE* (2011) **6**, e19312. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019312>
Satoh, J., Tabunoki, H., Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Min.* (2011) **4**, 17. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0381-4-17>
- Korcsmáros, T.*, Farkas, I. J.*, et al., Uniformly curated signaling pathways reveal tissue-specific cross-talks and support drug target discovery, *Bioinformatics* (2010) **26**, 2042. (*: megosztott első szerzők) <http://Signalink.org>, <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq310>
Impakt faktor: **4.9**; Független hivatkozások referált nemzetközi folyóiratokban (2011. júliusig): **3**
Yuryev, A., Integrating fragmented software applications into holistic solutions: focus on drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* (2011) **6**, 383. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2011.557659>
Gu, Y. et al., Analysis of pathway mutation profiles highlights collaboration between cancer-associated superpathways. *Human Mutation* (2011) közlés alatt. <http://dx.doi.org/10.1002/humu.21541>
Wang, J., et al., GO-function: deriving biologically relevant functions from statistically significant functions. *Brief. Bioinformatics* (2011) közlés alatt. <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bbr041>
- Korcsmáros, T., et al., Signalogs: Orthology-Based Identification of Novel Signaling Pathway Components in Three Metazoans. *PLoS ONE* (2011) **6**, e19240. <http://dx.doi.org/journal.pone.0019240>
Impakt faktor: **4.4**; Független hivatkozások referált nemzetközi folyóiratokban (2011. júliusig): –

A projekt támogatásával előkészületben

- Farkas, I. J., Szántó, Á., Korcsmáros, T., PathwayLinker: Linking proteins to signaling pathways for experiment design and evaluation. <http://PathwayLinker.org>

További hivatkozott irodalom

- Adamcsek, B., et al., CFinder: locating cliques and overlapping modules in biological networks. *Bioinformatics* (2006) **22**, 1021. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl039>
- Farh, K.K., et al., The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* (2005) **310**, 1817. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1121158>
- Griffiths-Jones, S., et al., miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* (2008) **36**, D154. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm952>
- Joshi-Tope, G., et al., Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucl. Acids Res.* (2005) **33** (suppl 1), D428. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki072>
- Kandasamy, K., et al., NetPath: a public resource of curated signal transduction pathways, *Genome Biol.* (2010) **11**, R3. <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2010-11-1-r3>
- Kertesz, M., et al., The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* (2007) **39**, 1278. <http://dx.doi.org/10.1038/ng2135>
- Lall, S. et al., A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Curr. Biol.* (2006) **16**, 460. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.050>
- Landgraf, P., et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* (2007) **129**, 1401. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>
- Lewis, B.P., et al., Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* (2003) **115**, 787. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3)
- Morioka, K., et al., Orphan receptor tyrosine kinase ROR2 as a potential therapeutic target for osteosarcoma. *Cancer Sci.* (2009) **100**, 1227. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01165.x>
- Ogata, H., et al., KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucl. Acids Res.* (1999) **27**, 29. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/27.1.29>
- Palla, G., et al., Uncovering the overlapping community structure of complex networks in nature and society. *Nature* (2005) **435**, 814. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03607>
- Sethupathy, P., et al., A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets, *Nat. Methods* (2006) **3**, 881. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth954>