

# ***A gap* gének vizsgálata kísérletes és hálózatos módszerekkel**

Doktori tézisek

**Gyurkó Márton Dávid**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: 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

## Bevezetés

A tanulási képesség romlásával és memóriazavarokkal kísért neurokognitív kórképek, valamint a tumoros megbetegedések világszerte az egyénre és társadalomra legnagyobb terhet róvó állapotok közé tartoznak. Mindkét klinikai terület molekuláris háttere gazdagon tanulmányozott, átfedésükről azonban viszonylag keveset tudunk. E metszetben állnak a GTPáz aktiváló fehérjék (GAPok), melynek tagjai a G-fehérjék intrinzik guanin-foszfátáz aktivitását fokozzák. A RasGAP fehérjék a kis GTPázok családjába tartozó Rat sarcoma fehérje (Ras) specifikus GTPáz aktiváló fehérjéi, annak GTP-t hidrolizáló aktivitását serkentik, ezáltal gátolva a Ras/MAPK jelpályát.

A RasGAP család tanulásban és memóriában legismertebb tagja a humán SynGAP fehérje. Kalcium/kalmodulin kináz II általi aktiválódása feltehetően összeköti a sejten belüli kalciumszint változását, az N-metil-D-aszpartát receptorok aktiválódását, a kis G-fehérjék által indukált szinaptikus méretnövekedést, az AMPA receptor kihelyeződést és végső soron a szinaptikus potenciációt. A RasGAPok szerepére emberi tanulásban és memóriában közvetetten a Ras/MAPK jelpálya csiravonali mutációi által okozott kórképek, az úgynevezett Rasopátiák is fényt derítenek. Ezek közös jellemzői a fejlődési rendellenességek és tumorokra való megnövekedett hajlam mellett a kognitív tünetek, így a tanulás zavarai is. Az egyik leggyakoribb, mintegy minden kétezredik magzatot érintő Rasopátia az I-es típusú neurofibromatózis (von Recklinghausen betegség), melyet a GAPokat kódoló gének családjába tartozó neurofibromin 1 mutációja okoz.

A tanulás és memória kutatásában a patkány, egér, gyümölcslégy, zebrahal és fonálféreg egyaránt bevált modellrendszerek. A *gap* gének filogenetikai fája hasonlóan széles, a *Caenorhabditis elegans* 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. E modellrendszer a tanulás és memória jellemzésére széleskörű viselkedésbiológiai és molekuláris biológiai eszköztárat is kínál, ráadásul a rövid generációs idő a vizsgálatok időszükségletét csökkenti, a nagy utódszám a statisztikai megbízhatóságot javítja.

A *gap* géncsalád tagjai *C. elegans*-ban a *gap-1*, *gap-2* és *gap-3* gének, leírásukra fonálféregben fejlődési folyamatokkal kapcsolatban, a Ras/MPK-1 MAP kináz jelpálya szabályozóiként került sor. Emberi ortológjaikhoz való hasonlóságuk rendre 87%, 79% és 90%. A RasGAPok hatása eddigi ismereteink szerint a Ras/mitogén aktivált fehérje kináz (MAPK) jelpályán keresztül érvényesül.

A RasGAPok jelátvitelének megértése *C. elegans*-ban ugyanakkor több kihívással is kecsesget. A Ras/MAPK jelpálya szerepe feltételezhető, mely azonban központi mivolta révén számos jelátviteli úttal állhat eddig tisztázatlan, vagy nem triviális kapcsolatban. E komplexitás megközelítésében hasznos eszközökkel szolgál a hálózattudomány, 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 feltérképezettségére 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. Szintén kihívás a jelátviteli adatok adatbázisokban való szétszortottsága, valamint a számos eltérő nevezéktan, vagyis az azonos molekulákra, biológiai folyamatokra különféle nevekkkel való hivatkozás. Ezekre a nagy léptékű adatintegráció a válasz, vagyis a források szintetizált, azonos nevezéktan szerinti egységesítése, mely bevett rendszerbiológiai és gyógyszerkutatói megoldás.

## Célkitűzések

1. Kutatásom első célja a *gap* géncsalád funkcióvesztő mutánsainak tanulással és memóriával kapcsolatos, *C. elegans* modellrendszerben történő, átfogó kísérletes fenotipizálása volt, mely alatt a kemotaxis, motilitás, tanulás, rövid- és hosszú távú asszociatív memória és Ras-függés vizsgálata, valamint az ezekhez szükséges modellrendszer meghonosítása is értendő.
2. Doktori munkám második célkitűzése a GAP fehérjék jelátviteléről rendelkezésre álló adatok nagy léptékű integrációja és egységesítése, valamint ezen keresztül minőségének javítása volt.
3. Harmadik célként azt tűztem ki, hogy az egyesített és egységesített adatok alapján megalkossam a Ras/MAPK jelpálya, valamint a tanulás és a memória főbb jelpályáinak kis léptékű, idegsejtekre specifikus, manuálisan kurált hálózatát, mely képviseli a RasGAPok fiziológias és patológias folyamatokban játszott molekuláris jelátvitelét, valamint annak lehetséges gyógyszerészeti vonatkozásait is.

## Módszerek

**Törzsek.** A GAP tanulásban és memóriában betöltött szerepének vizsgálatára *gap-1(gal33)*, *gap-2(tm748)*, *gap-3(gal39)*, *gap-1(gal33) gap-2(tm748)*, *gap-1(gal33);gap-3(gal39)*, *gap-2(tm748);gap-3(gal39)* funkcióvesztő *gap* mutánsokat, valamint *eri-1(mg366);lin-15B(n744)* (KP3948) genotípusú RNS-érzékenyített *C. elegans* törzset használtam. A Ras-függés megállapításához *gap-x;let-60(n2021)* kettős mutációt hordozó állatokkal végeztem tanulási és memóriateszteket. Kontrollként *C. elegans* N2 Bristol variáns szolgált, amennyiben ezt másként nem tüntettem fel. A törzsek fenntartása inkubátorban, állandó 20° Celsius hőmérsékleten történt 10 centiméteres Petri csészébe öntött NGM (Nematode Growth Medium) lemezeken.

**Kemotaxis teszt.** A férgek szaglásának vizsgálata során az egyes illékony anyagok, a diacetil, benzaldehid és izoamilalkohol (attraktánsok) iránt tanúsított ösztönös vonzódást számszerűsítjük. A vizsgálat során 50-200 állatot helyezünk a tesztlemez közepére, majd 1 óra múltán számláljuk össze a két oldalon lévő, illetve az azokon kívül maradt állatokat. A kemotaxis indexet az alábbi képlettel határozzuk meg:

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

ahol A az attraktánsal átítatott területre mászott állatok számát jelöli a lemez egyik oldalán, B a kontrollként szolgáló területekre mászott állatok száma, C pedig az ezeken kívül eső területen maradt férgek száma. A viselkedésbiológiai módszereket a Bázeli Egyetem Molekuláris Pszichológia Tanszékével együttműködésben honosítottam meg.

**Motilitási tesztek.** A motilitási tesztek során a férgek egy percre eső mozgási ciklusainak számát rögzítjük nyugalmi táplálkozó, táplálékkereső, valamint 1 órás éhezést követő táplálkozó magatartás során.

**Tanulás és rövid távú memória tesztje.** E vizsgálatok során az állatok fentebb leírt, ezúttal diacetil iránti ösztönös vonzódását egy negatív ingerrel, az éhezéssel társítjuk (kondicionálás), melynek köszönhetően elkerülő magatartás alakul ki. A naiv, kondicionált, valamint kondicionálás után pihentetett állatokat rendre egy-egy, a kemotaxisnál leírt tesztben vizsgáljuk, melyek eredményei rendre a férgek naiv állapotát, tanulási képességét és memóriefunkcióját írják le.

**Hosszú távú memória tesztje.** A mutációk hosszú távú asszociatív memóriára gyakorolt hatását hasonlóan vizsgáljuk, mint a tanulás és rövid távú memória tesztje, azonban háromszori kondicionálást és pihentetést alkalmazunk, valamint a kondicionálás után 16 és 24 órával is megvizsgáljuk az állatok diacetil iránti vonzódását.

**Transzgen *gap-1(ga133);sur-5::mDsRed* törzs létrehozása.** A teljestest-expressziót biztosító *sur-5* promoterral hajtott, dsRed fehérjét kódoló gént egyesítettem a *gap-1* génnel, majd a létrejött konstruktot *gap-1(ga133)* genotípusú férgekbe injektáltam.

**RNS interferencia kísérletek.** Az RNS interferencia kísérletek során az RNS-érzékeny *eri-1(mg366);lin-15B(n744)* (KP3948) törzset *gap-1*, *gap-2* és *gap-3* kétszálú RNS-t hordozó baktériumpázsittal tápláltam.

**Bioinformatikai módszerek.** A ComPPI létrehozásához Ubuntu 14.04 linuxon alapuló nginx webkiszolgálót, MySQL 5 adatbázis-kezelőt, valamint PHP 5, Javascript 1.2, HTML 4, CSS 3 és Python 3.4 programnyelveket, illetve a Symfony 2 és jQuery 1.4 keretrendszereket használtuk. A hálózatok megjelenítése d3.js könyvtárral és Cytoscape 3, illetve GIMP 2.8 programokkal készült.

**Statisztikai elemzés, grafikonok és ábrák.** A kísérletes eredmények statisztikai elemzéséhez és ábrázolásához Python 3.4 nyelven írtam programot, mely a numpy 1.8 numerikus könyvtárat, a matplotlib 1.4 grafikus könyvtárat, valamint a SciPy 0.13.3-as változatában megvalósított statisztikai modult használta fel. A szignifikanciát Welch-féle t-tesztel és kettős ANOVA tesztel számítottam, a p érték minden esetben két oldalú t-tesztre utal. Több populáció összehasonlítása esetén mindig Bonferroni szerinti korrekciót végeztem.

## Eredmények

**A *gap* funkcióvesztés hatása a *C. elegans* kemotaxisára.** A tanulási és memóriatesztek a kemotaxistól függenek, mivel a környezeti információkat a férgek szaglász útján szerzik meg. A kemotaxis tesztek során ezért megvizsgáltam a *gap* funkcióvesztő mutációkat hordozó törzsek diacetil, benzaldehid és izoamilalkohol iránti vonzódását.

A *gap* mutáns törzsek mindegyike reagált a szaglász ingerekre. 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 és az izoamilalkohol mindkét koncentrációja iránt, miközben a benzaldehid iránti vonzódás érintetlen maradt. A *gap-3(ga139)* mutáns törzs esetében szintén csökkent vonzódást találtam magas koncentrációjú diacetil iránt, 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. E törzset kivéve a *gap* mutációk nem okoztak szignifikáns változást a diacetil alacsony koncentrációjának érzékelésében, ezáltal a szagláson alapuló negatív asszociatív tanulási és memóriakísérletekre nincsenek hatással.

**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. Ezt nyugalmi táplálkozó, táplálékkereső és 1 órás éhezést követő táplálkozó magatartás során mértem az egy percre eső mozgási ciklusok számával. A nyugalmi táplálkozó és az éheztetett állatok percenkénti mozgási ciklusai az N2 vad típusnak megfelelőek. A táplálékkereső állatoknál ugyanez elmondható, kivéve a szignifikánsan csökkent motilitású *gap-1(gal133);gap-3(gal139)* törzset. Defektusára magyarázatul szolgálhat a kemoszenzoros zavarból származó csökkent táplálékkereső motiváció, ugyanis táplálkozó és éheztetett állapotban nem figyelhető meg eltérés.

A törzsek mozgásszervrendszerét és annak neuronális vezérlését tehát a *gap-1(gal133)*, *gap-2(tm748)*, *gap-3(gal139)*, *gap-1(gal133) gap-2(tm748)*, *gap-2(tm748);gap-3(gal139)* mutációk egyik kísérleti felállásban sem befolyásolják, a *gap-1(gal133);gap-3(gal139)* törzset a már tárgyalt kemoszenzoros és lehetséges lokomotoros defektus miatt a további módszeres vizsgálatokból kizártam.

**A RasGAPok komplex együttműködése szükséges a tanuláshoz és a rövid távú asszociatív memória kialakulásához.** A tanulást és rövid távú asszociatív memóriát vizsgáló tesztek során a naiv férgek diacetil iránti ösztönös vonzódását a kondicionálási lépésben az éhezés negatív ingerével társítjuk, ezáltal elkerülő magatartás alakul ki, mellyel az állatok tanulási képessége jellemezhető. Fél órás pihentetés után a kondicionált populáció fennmaradt részével végzett kemo taxis teszt pedig a memóriefunkcióról ad jellemzést.

A kondicionálás minden esetben jelentősen csökkentette a férgek diacetil iránti vonzódását. A *gap-1(gal133)* törzs ugyanakkor szignifikáns tanulási defektust mutat a vad típushoz képest. Memóriadefektus is mérhető, mely azonban a mutáns állatok kondicionált és pihentetett állapotát összehasonlító kettős ANOVA teszt alapján a tanulási defektus következménye. A *gap-2(tm748)*, *gap-3(gal139)*, *gap-1(gal133) gap-2(tm748)* és *gap-2(tm748);gap-3(gal139)* kettős mutáns törzseknél egyaránt a rövid távú memória defektusa figyelhető meg tanulási zavar nélkül. A *gap-1(gal133);gap-3(gal139)* kettős mutáns törzs esetében a kemoszenzoros defektus miatt a tanulási és memóriefunkció nem volt értékelhető. 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.

**A RasGAPok szerepet játszanak a hosszú távú memória kialakulásában.** A hosszú távú asszociatív memória vizsgálatának elve a rövid távúéhoz hasonló, azonban a kondicionálást és az azt követő pihentetési fázist háromszor ismételttem meg, valamint az állatokat 16 és 24 óra múltán is teszteltem. A *gap-1(ga133)* törzs korábban megfigyelt tanulási zavara nem volt mérhető, melyre a háromszori kondicionálás lehetséges magyarázattal szolgál. A hosszú távú asszociatív memória robosztus zavara volt azonban megfigyelhető a *gap-2(tm748)*, *gap-3(ga139)*, *gap-1(ga133) gap-2(tm748)* és *gap-2(tm748);gap-3(ga139)* törzsek mindegyikénél. Utóbbi törzs tanulási defektussal is rendelkezik.

**A gap gének szerepeinek validálása géncsendesítéssel és mentett vonalakkal.** RNS interferencián alapuló géncsendesítés és mentett vonalak segítségével a megfigyelt mutáns fenotípusok és a *gap* gének közötti kapcsolat megerősítést nyert.

**A let-60 gén szükséges a megfigyelt funkcióvesztő gap fenotípusokhoz.** A *gap* mutációkat és a LET-60 *C. elegans* Ras fehérjét kódoló génnek, a *let-60*-nak funkciócsökkentő mutációját együttesen is vizsgáltam, mivel a *gap* mutáció okozta túlműködést a *let-60* alulműködése kompenzálhatja. Az eredmények 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. Mindez azt sugallja, hogy a megfelelő tanuláshoz és a memória kialakulásához a Ras/MAPK jelpálya egyensúlya szükséges.

A kísérletes eredményeket az 1. táblázat foglalja össze.

#### 1. 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
<i>gap-1</i>	OK	OK	Defektus	OK	OK
<i>gap-2</i>	OK	OK	OK	Defektus	Defektus
<i>gap-3</i>	OK	OK	OK	Defektus	Defektus
<i>gap-1 gap-2</i>	OK	OK	OK	Defektus	Defektus
<i>gap-1;gap-3</i>	Defektus	OK*	N/V	N/V	N/V
<i>gap-2;gap-3</i>	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.



**ComPPI, a kompartmentalizált fehérje-fehérje interakciós adatbázis.** A ComPPI (Compartmentalized Protein-Protein Interaction Database) egy fehérjéket, kapcsolataikat és szubcelluláris lokalizációjukat hálózatos megközelítésben gyűjtő, integrált adatbázis, valamint elemző és kiszolgáló szoftvercsomag.

A nagy kapacitású kísérletek hatalmas adatmennyiséget generálnak. Az eredményeknek azonban csak töredéke érhető el nyilvános adatbázisokban, és ezek is eltérő nevezéktanok szerint, több forrás közt szétszórva férhetőek hozzá. A források közti átfedés csekély, áttekintő keresésük rendkívül időigényes. E kihívásokra ad választ a ComPPI. Fő része az adatokat tároló adatbázis, az ennek forrásadatbázisokból való feltöltését végző úgynevezett interfészek, valamint az adatok kereshetőséget, letöltését és megjelenítését biztosító honlap. A szoftvercsomag része még az adatelemzéshez szükséges kódhátter, valamint a teljes szoftvercsomag kezelését és telepítését segítő infrastruktúra is.

A ComPPI-ban 9 fehérje-fehérje interakciós adatbázisból és 8 szubcelluláris lokalizációs adatbázisból egységesítettünk és szinkronizáltunk adatokat. 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 fehérjék kapcsolatainak és lokalizációinak biológiai valószínűségét, vagyis az adatok megbízhatóságát külön-külön minőségi mérőszámok jellemzik.

A kis léptékű adatelemzéshez a ComPPI honlapján felhasználóbarát keresőfelületet biztosít, mellyel bioinformatikai tudás nélkül böngészhetőek, szűrhetőek és jeleníthetőek meg a fehérjék fontosabb adatai, kapcsolataik és sejten belüli lokalizációik. A keresés eredménye exportálható is. A használatot helyzetérzékeny súgók és oktatóanyagok szintén segítik.

A nagy léptékű adatelemzést, valamint a tudományos reprodukálhatóságot a teljes adatbázis aktuális és korábbi verzióinak letöltése szolgálja. Ezekből, valamint a forráskódból vonatkozó szaktudással a teljes szoftvercsomag felépíthető és futtatható akár egy közönséges asztali számítógépen is.

**A RasGAPok szomszédsági hálózata a ComPPI-ban.** A RasGAP fehérjecsalád fehérje-fehérje interakciós szomszédsága 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 prekursor eltávolításával 5 komponensre bomlik szét. A hálózat tagjainak biológiai szerepei közt az általános jelátviteli feladatok mellett a neurogenézis, axonogenézis, valamint a Ras jelátvitelével kapcsolatos funkciók is szerepelnek. Szubcelluláris lokalizációk



tekintetében a szomszédsági hálózat fehérjéinek legtöbbje a membránhoz kapcsolatos, a citoszolban, illetve a sejtmagban helyezkedik el.

**A Ras/MAPK, IP<sub>3</sub>/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI<sub>3</sub>K jelátvitelének hálózata.** A ComPPI-ban meghatározott RasGAP hálózat adataira, valamint a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes jelátviteli információira építve létrehoztam a Ras/MAPK jelátviteli hálózatát, illetve a tanulással és memóriával kapcsolatba hozott főbb jelátviteli hálózatok humán ortológusait, hálózatát. Az UniProt nevezéktan szerint egységesített hálózat minden csúcsa és éle esetén ellenőriztem, hogy a molekula neuronális jelenlétét szomszédai és publikációk nem zárják-e ki.

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 jelátviteli hálózatok között volt keresztbeszélgetés. A Ras/MAPK jelátviteli hálózat és a tanulással, illetve memóriával kapcsolatba hozott főbb jelátviteli hálózatok között összesen 18 keresztbeszélgetést azonosítottam, ezek közül 7 GAPokon és GEFeken keresztül modulálja a Ras/MAPK jelátviteli hálózat aktivitását. A bemutatott keresztbeszélgetések révén a Ras/MAPK jelátviteli hálózat kapcsolatban áll az NMDA és AMPA receptorok szabályzásával, a citoskeleton átalakulásaival, valamint közvetlen szerepe lehet a szinaptikus fehérjék expressziójának szabályzásában is, mely folyamatokról humán sejtekben csak korlátozott ismereteink vannak, *C. elegans* modellrendszerben pedig egyáltalán nem ismert kísérletes adat.

További érdekesség, hogy a Ras/MAPK jelátviteli hálózat szerepet játszik a tanulásban és memóriában, tumorellenes szereket a jelátviteli hálózatot célzó kemoterápia mellékhatásai átfednek a Rasopátiák tüneteivel. Ezek alapján felmerül, hogy a Ras/MAPK jelátviteli hálózatot célzó kemoterápiás kezelések okozta kognitív diszfunkció hátterében akár a Rasopátiák kognitív tüneteit is okozó, közös molekuláris háttér állhat. A RasGAPok jelátviteli hálózatát elemezve a Raf bírt a legnagyobb közti centralitás értékkel, mely érték a jelátvitelben betöltött fontossággal jól korrelál. A jelátviteli hálózatához kapcsolódó tumorellenes szereket közül is a legtöbb valóban ezt célozza meg. A Ras farmakológiai befolyásolása ezzel szemben nehéz, ezért modulálóinak, így például a RasGAPoknak hálózatos-gyógyszerészeti vizsgálata izgalmas további irányokkal kecsegtet.

## 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 kemotaxisához, a tanuláshoz, a rövid-, valamint a hosszú távú asszociatív memória kialakulásához. A kemotaxisal 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 kvantitatívan 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<sub>3</sub>/DAG/PKC, cAMP/PKA, Ras/PI<sub>3</sub>K jelpályák és a Ca<sup>2+</sup> jelátvitelének figyelembe vételével. 18 keresztbeszélgetést tartam fel a Ras/MAPK jelpálya, a tanulás és a memória főbb jelpályái között. Felvettem 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.

## Saját publikációk jegyzéke

### 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**, Stetak A, Söti 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.

### A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények

**Gyurkó MD**, Söti C, Stetak 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 DV, Nánási T, Csermely P. (2009) Network strategies to understand the aging process and help age-related drug design. *Genome Med* 1:90.