

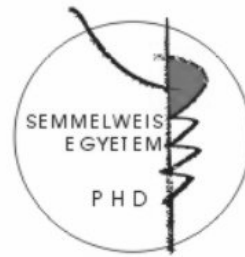
Biológiai hálózatok dinamikájának vizsgálata

Doktori tézisek

Szalay Kristóf Zsolt

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Csermely Péter egyetemi tanár, az MTA tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Hamar Péter egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Oborny Beáta egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Falus András egyetemi tanár, az MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Enyedi Péter egyetemi tanár, az MTA doktora

Dr. Palla Gergely tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest

2014

Bevezetés

A hálózatok körülvesznek minket. Hálózatot alkotnak a baráti társaságaink, az emberi társadalmak, az internet, a gazdasági rendszerek, az élővilág, és – nem utolsósorban – hálózatok találhatók bennünk is. A hálózat tulajdonképpen egy komplex rendszerek leírására széleskörűen használt modell, melynek alapfeltevése, hogy bonyolult rendszerek működése megérthetővé válik, ha a rendszert nem egyben, fekete dobozként, hanem elemeire és az elemek közötti kölcsönhatásokra szétbontva vizsgáljuk.

A hálózatokról összegyűjtött tudás a biológiában egyre nagyobb sebességgel szaporodó adatmennyiség ismeretében igen jól kamatoztatható, mivel érdekes, újfajta vizsgálatokra nyújt lehetőséget. A biológiában gyakorlatilag csak bonyolult, komplex rendszerekkel foglalkozunk, melyek működésének minél mélyebb megértése kulcsfontosságú feladat.

Ahhoz, hogy egy hálózatos modell segítségével a rendszert megfelelő mértékben megismerhessük, és erős predikciókat tudjunk tenni a rendszer várható viselkedésével kapcsolatban, elkerülhetetlenül "be kell kapcsolni" azt, azaz egy topológiai nézőpontra kívül a dinamikát, a rendszer állapotainak változását is figyelembe szükséges vennünk.

Az elektronikai rendszerelmélet (avagy jelek és rendszerek elmélete) a rendszert úgy határozza meg, mint alkotóelemek egy fizikailag összekötött csoportját, mely valamilyen bemeneti jel hatására valamilyen kimeneti jelet produkál. A jel itt bármilyen időben változó fizikai mennyiséget jelent, amely segítségével információ közvetíthető.

Egy ilyen rendszernek lehet egy vagy több **bemenete**, egy vagy több **kimenete**, illetve belső **állapotváltozói**, melyek a rendszer „memóriái”, annak belső állapotát határozzák meg, így az állapotváltozók pillanatnyi állapotától függően egy adott bemenetre a rendszer más-más kimenetekkel válaszolhat. A bemenetek ha-

tást gyakorolhatnak közvetlenül a kimenetre, vagy az állapotváltozókra, illetve az állapotváltozók is hatást gyakorolhatnak egymásra és a kimenetre.

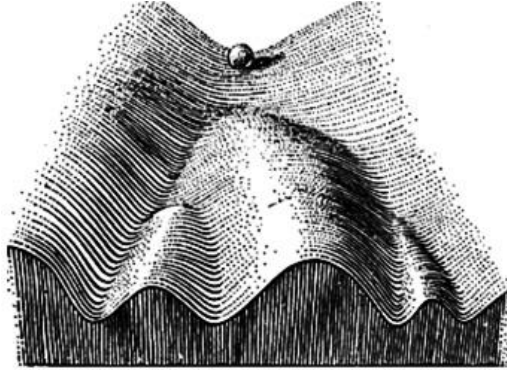
Az elektronikai rendszerelmélet nagyon természetes módon átültethető a hálózatos világba. A hálózat pontjainak állapotai lesznek az állapotváltozóink, az élek pedig az állapotváltozók közötti kölcsönhatások. A hálózatot kívülről tetszőleges ponton érő zavarok lesznek a bemenetek, illetve szintén tetszőlegesen vizsgált pontok értékei, vagy azok valamilyen kombinációban számolt összegei/átlagai a kimenetek.

Van a dinamikai vizsgálatoknak egy másik fontos területe is, amit sikerrel lehet hálózatos vizsgálatok során kamatoztatni. Ez abból a megfigyelésből ered, hogy egy magára hagyott rendszer nem tud bármilyen állapotot felvenni; ha hosszabb időre magára hagyjuk, akkor a rendszer beáll egy állandósult állapotba. Ezeket az állapotokat nevezzük dinamikai megfogalmazással *attraktoroknak*, mivel "magukhoz vonzzák" a rendszert. Egy rendszernek – annak bonyolultságától függően – igen sok attraktora is lehet, de az attraktorok száma általában az összes lehetséges állapotnak így is csak egy kicsiny töredéke.

Biológiai rendszerekben az első, attraktoroknak megfeleltethető leírás Waddington 1957-es *The Nature of the Genes* című könyvében található (1. ábra). A biológiai rendszerek ilyen leírását sokáig csak elméleti érdekességként tartották számon, míg Kauffman meg nem mutatta, hogy azok *felépítésüknél fogva* viszonylag kevés attraktortal kell, hogy rendelkezzenek.

Ebben az időben azonban még igen kevés információ állt rendelkezésre biológiai rendszerekről, Kauffman maga 1.000.000 különböző emberi gén létezését jósolta az idézett cikkben. Az emberi genom nagy részének 2001-es közlésével, majd a szekvencia 2003-as teljes feldolgozásával, valamint az adatfeldolgozási képességünk exponenciális növekedésével csak a 2000-es évek közepétől állt rendelkezésre elégséges mennyiségű adat jelátviteli rendszerek hálózatos vizsgálatához.

2006-ban Fauré és mtsai. mutatták be az első, valódi modellen végrehajtott attraktor-elemzést. Az általuk használt 10 elemű hálózat a sejtciklus működését



1. ábra. Waddington 1957-ben bemutatott képe a sejtek differenciációjának folyamatáról. A lejtőn legurított labda jelképezi azon állapotokat, melyeket a sejt a differenciáció során felvehet. A lejtő alján található négy völgy szimbolizálja a rendszer lehetséges végállapotait, azaz a differenciációs folyamat attraktoraait.

modellezte, és összesen két állandósult állapotot, egy nyugalmi és egy proliferáló attraktort találtak.

Ezt követően több cikk is született, ahol különféle rendszerek attraktoraikat vizsgálták. Ezek közül kiemelkedően részletesen, két teljes cikken keresztül is elemzésre került a Zhang és mtsai. által 2008-ban leírt 60 elemű T-LGL leukémiás hálózat. Ezt a hálózatot alkalmaztam az értekezésemben is verifikációs célból.

Az irodalomban már több helyen megmutatták, hogy a jelátviteli rendszerek attraktoraik megfelelhetők azok különböző lehetséges fiziológiás vagy patológiás állapotainak. A daganatos elváltozásokat, és az egyéb komplex betegségeket is hasonlóképp többször kötötték már a rendszer attraktoraikhoz. Így az a feltételezés sem alaptalan, hogy a sejten belüli hálózatok általános esetben stabil állapotban lévőnek vagy ahhoz közelinek tekinthetők.

Célkitűzés

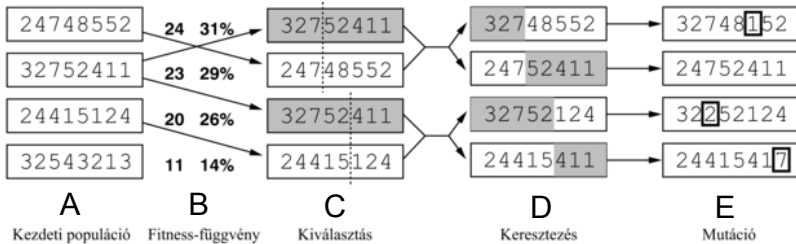
1. Összhangban a hálózatkutatás jelenleg a világ élvonalában lévő egyik legfontosabb célkitűzésével, munkám első célja biológiai hálózatok dinamikájának elemzése volt. Ehhez egy igen gyors, általános hálózatdinamikai elemző programot készítettem el.
2. Doktori munkám második célkitűzése az volt, hogy a hálózatdinamikai elemző programot a dinamikus rendszerek attraktorainak megkeresésére alkalmas modullal bővítsem. Az attraktorkereső modult több hálózaton, köztük biológiai rendszerek jelátviteli hálózatain sikerrel teszteltem zajmentes és zajjal rendelkező körülmények között.
3. Munkám harmadik célkitűzése a hálózatdinamikai programcsomag egy olyan tervező moduljának az előállítása volt, mellyel olyan beavatkozásokat lehet tervezni, amelyek a komplex rendszereket egyik attraktorukból egy általunk meghatározott másik attraktorba (pl. a beteg állapotra jellemző attraktorból az egészséges állapotra jellemző attraktorba) viszik át. Ezt a programcsomag modult rákos sejtekre jellemző jelátviteli hálózatokon teszteltem. A tervező programmal olyan egy-, vagy többcentrumú beavatkozásokat lehet azonosítani, melyek akár személyre szabott gyógyszeres kezelések majdani tervezéséhez is elvezethetnek.

Módszerek

A vizsgálatokat a saját fejlesztésű, C++ nyelven írt, Turbine-nak nevezett programmal készítettem, mivel jelenleg nincs elérhető, hasonló tudású program. A program lelke egy gyors hálózatszimulátor, mely kevesebb, mint 30 másodperc alatt képes egy összesen 10 millió pontból és élből álló hálózaton 1000 lépés kiszámítására. Kisebb, pár száz vagy ezer elemű hálózatokon egy hasonló szimuláció a másodperc töredékét veszi csak igénybe. Annak felismerésével, hogy ezres-tízezres elemszámú hálózatok

kon egy másodperc vagy kevesebb idő alatt elvégezhető egy szimuláció, elérhetővé vált szimulációk sokaságának futtatása egy adott hálózaton, amely rengeteg új és hasznos felhasználási lehetőséget nyitott meg számunkra.

Amennyiben úgy futtatunk egy szimulációsorozatot, hogy a pontok kezdőértékeit véletlenszerűen változtatjuk, feltérképezhetjük a rendszer attraktorait, azaz állandósult állapotait, így a Turbine attraktorkeresésre is alkalmas, és képes felismerni nem csak a fixpont-attraktorokat, hanem a határciklusokat és egyes határtóruszokat is, tetszőleges folytonos vagy diszkrét dinamika és külső állandó vagy periodikus gerjesztések használatával is. Amennyiben viszont nem csak "vakon", véletlenszerűen indítva futtatunk kísérleteket, hanem a szimulációs feltételek körönkénti beállítását egy mesterségesintelligencia-algoritmusra bízuk, úgy további rendkívül hasznos vizsgálati lehetőségek válnak elérhetővé. Jó példa erre a Turbine beavatkozás-tervezési algoritmus. A beavatkozás-tervező algoritmus képes arra, hogy egy adott "beteg" kezdőállapotot és egy adott "egészséges" célállapotot megadva megállapítsa, hogy mi az a minimális (illetve közel-minimális) beavatkozás-sorozat, melynek hatására a rendszer a beteg állapotból az egészséges állapotba vihető át. A szükséges beavatkozásokat a program egy genetikusan algoritmus segítségével keresi meg (2. ábra).



2. ábra. A genetikusan algoritmus működése. A populációból (A) a problémánkat meghatározó fitness-függvény segítségével (B) kiválasztjuk azokat a szülőket, akik a „génjeiket” átörökíthetik (C). Ebből a készletből az utódokat átkeresztezéssel (D) hozzuk létre, majd azok esetleges mutálódása (E) után alakul ki véglegesen a következő generáció. A populáció a Turbine esetében különféle lehetséges beavatkozásból áll, az egyes elemek fitness-értékeit egy szimuláció futtatásával határozza meg a program. Ábra: http://project.mit.bme.hu/mi_almanach/books/aima/ch04s03

Eredmények

Általános modellezés

Elsőként egy olyan modellt készítettem, melynek dinamikája a közlekedőedények viselkedéséből származtatható, és általános esetben egy első közelítést tud adni a rendszer perturbációkkal szemben tanúsított viselkedésére. Fehérjék szabadkoncentráció-perturbációi is ilyen, exponenciális függvényekkel írhatóak le. Ezen modell segítségével definiáltam egy, a pontok hálózatban vett fontosságát mérő **központi-sági** mérőszámot. Igen sok ilyen mérőszám létezik, ennek a dinamikát is figyelembe vevő változatnak a "terjesztési központosság" (perturbation centrality) nevet adtam.

Fehérjeszerkezet-hálózat vizsgálata. Először a Ghosh és Vishveshwara által 2007-ben leírt *E. coli* metionil-tRNS szintetáz (MetRS) hálózatok alapján kezdtem részletes vizsgálatba. Az eredeti PDB fileok alapján a RINerator nevű programmal elkészített fehérjeszerkezet-hálózat minden pontjára kiszámoltam a terjesztési központosság értékeket. Ezután a zárt (tRNS-t kötő) és a nyílt konformáció terjesztési központosság értékeit kivontam egymásból, és az így kapott értékek felső 20%-át vizsgáltam. A legfontosabb pontok két csoportban voltak megtalálhatóak, a nagyobb csoport a Met-kötő aktív centrum és a Met-tRNS kötőhely körül, a kisebb csoport pedig a tRNS antikodon hurok környékén. Ezzel a terjesztési központosságok különbségei a két konformáció között valóban sikeresen kijelölték a fehérje működésében szerepet játszó legfontosabb helyeket. Fontos megemlíteni, hogy a szimuláció során a tRNS maga nem szerepelt a hálózatban, így ezt a program a tRNS kötőhelyek ismerete nélkül, kizárólag a fehérje aminosav-hálózatából számította ki, tehát a tRNS kötőhely körül oly módon változott meg a fehérje aminosavainak konformációja, hogy a zárt konformációban a fehérje fontos pontjaiban jelentősen könnyebbé vált az információ terjesztése.

Fehérje-fehérje kölcsönhatás-hálózat vizsgálata. Ezután megvizsgáltam a módszer egy másik típusú irányítatlan hálózaton, élesztő (*S. cerevisiae*) fehérje-fehérje kölcsönhatás-hálózatán is. A vizsgálathoz a Mihalik és Csermely által közölt, különféle típusú (hősokk, oxidatív stressz, ozmotikus stressz) stresszeknek kitett élesztők fehérje-fehérje kölcsönhatási hálózatát hasonlítottam össze terjesztési központiség szempontjából, pontosabban a terjesztési központiságok nyugalmi állapothoz képest történő megváltozásának szempontjából. Az így kapott funkciók megfeleltek a stresszre jellemző, ismert válaszoknak. Mindhárom fajta stresszben a (terjesztési központiség szerint) fontosabbá váló fehérjék között jelentős dúsulást találtam a "response to stimulus", "carbohydrate metabolism", "trehalose metabolic process", "glycogen metabolic process" kulcsszavakra, illetve hősokkban és ozmotikus stresszben a "response to stress" kulcsszó is a legfontosabbak között volt megtalálható. A szénhidrát-metabolizmus ilyen változása élesztőben a szakirodalomban ismert. A stresszben a hálózatos fontosság jelentős csökkenését mutató fehérjék között egyértelműen a riboszóma-szintézissel és a translációval kapcsolatos kulcsszavakat emelte ki a módszer. A fehérje-transzláció leállítása stresszben szintén egy jól ismert válaszreakció. Így a terjesztési központiség mérőszám ebben az esetben is sikeresen kimutatta az ismert, jelentős stresszválaszokat, tehát a hálózatos központisági mérőszámok által mért fontosság, és annak megváltozása jó összefüggésben állhat az egyes elemek hagyományos értelemben vett fontosságával.

A jelátvitel specifikus modellezése

Természetesen várható, hogy sokkal pontosabb és jelentősebb predikciókat tudunk adni egy hálózatra, ha arra nem általános, hanem a hálózat specifikus működését leíró modellt tudunk alkalmazni. Ehhez a fehérjék közötti jelátvitel folyamatát választottam, mivel az irodalomban több példát találtunk rá, hogy a jelátvitel dinamikájának igen egyszerű, absztrakt leírásával is kísérletileg igazolt predikciókat sikerült tenni.

A további vizsgálatokhoz kétféle, a szakirodalomban leírt jelátviteli modellt készítettem el a Turbine-hoz: a Zhang és mtsai által leírt T-LGL leukémia modellezésére használt Boole-modellt, illetve a Fumiã és Martins által 2013-ban leírt humán daganatos jelátvitel modellezésében használt egyenlet szerint működő modellt. Mindkét modellt megvizsgáltam az eredeti cikkekben szereplő hálózatokon, és úgy találtam, hogy azok az eredeti dinamikai működést az eredeti cikkekben szereplő leírással és eredményekkel összehasonlítva teljes mértékben reprodukálták.

Verifikáció a T-LGL hálózaton. A T-LGL hálózat citotoxikus T-limfociták aktivációjában, és az aktiváció által okozott apoptózisában szerepet játszó fehérjék által alkotott jelátviteli hálózat, melyhez az alkotók az összes fehérje aktivációjának feltételeit Boole-szabályként mellékeltek. A rendszer jelentősége, hogy a későbbiekben a hálózat egyszerűsítésével, majd az egyszerűsített hálózat teljes, összes lehetőséget figyelembe vevő elemzésével mind attraktorkeresést, mind beavatkozás-tervezést végeztek rajta, ezért a készített mesterségesintelligencia-módszereim ezen a rendszeren verifikálhatóak voltak.

A nyugalmi T-LGL hálózatban a Turbine programmal 100.000 futtatás során mindössze egyetlen, apoptotikus attraktort találtam. Az eredeti cikknek megfelelően az IL15, Stimuli és PDGFR bemenetek bekapcsolása esetén két másik, a leukémiás állapotnak megfelelő tétel, kóros proliferációt eredményező attraktor is megjelent a rendszerben.

Ezután további vizsgálatként a Turbine beavatkozás-tervező eszközével olyan beavatkozásokat terveztem a rendszerbe, melyek segítségével a leukémiás állapotnak megfelelő attraktorból az egészséges attraktorba lehet mozdítani a rendszert.

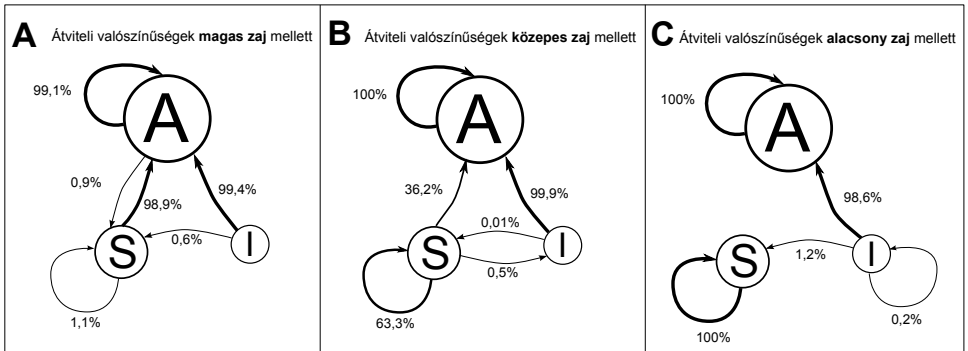
A 20 talált egyedi beavatkozásából 19 megegyezik a forráscikkben leírt 19 konszenzus beavatkozással, a huszadik (CREB aktiváció) hatásosságát csak valószínűsítik. A kombinációs beavatkozások gyakran előforduló elemei a forrásban használt elemzésben szintén nagy valószínűségű beavatkozási célpontok (sFas, TBET, Fas, FLIP).

Ezek alapján mondhatjuk, hogy mind a Turbine attraktorkereső, mind a beavatkozás-tervező algoritmus képes volt reprodukálni az eredeti eredményeket, illetve azokon felül új kombinációs beavatkozásokat jósolni, ezzel verifikálva az eszköz működőképességét.

Zaj hatása az attraktorokra. Az egyedi beavatkozási lehetőségek széles skáláját megfigyelve arra jutottam, hogy a proliferatív attraktorok jelenléte a standard hálózatban valóban érdekes, de annak mérete más mutációk nélkül olyan kicsi, hogy egyéb diszregulációk nélkül abba valós körülmények között várhatóan nem is kerül bele a sejt, illetve onnan könnyen kimozdul természetes úton is. Erre vonatkozó hivatkozás az irodalomban is található, itt a T-LGL leukémiát a Fas útvonalban található patológiás változásokhoz kötik.

Tudjuk, hogy egyetlen kommunikációs módszer sem működik tökéletes pontossággal, bizonyos hibaszázalékkal mindig számolnunk kell. Hipotézisem ezért az volt, hogy a rendszer lényeges stabil állapotainak jó zajtűréssel kell rendelkezniük, azaz az attraktor **medencéjének** akkorának kell lennie, hogy a rendszert érő véletlen zaj ne vihesse át egy másik, az adott körülményeknek nem megfelelő működést eredményező attraktorba a sejt működését.

Ezért ezen vizsgálataimat a folytonos modellel vizsgálható, humán daganatokban érintett fehérjék jelátviteli útvonalait ábrázoló hálózattal végeztem. Beállítottam az egyetlen olyan mikrokörnyezetet, ahol a szerzők egy fiziológiás és egy patológiás attraktort is találtak. Ebben a környezetben a sejt genotoxikus stressz alatt van, növekedési faktorok és tápanyagok jelenlétében, TNF- α jelenléte nélkül, normoxiában. Ilyen körülmények között a sejt fiziológiás válasza az apoptózis, a másik megfigyelhető válasz – a proliferáció – pedig patológiás. A szimulációim során az apoptotikus attraktor mellett két különböző proliferáló attraktor is megfigyelhető volt. A "stabil proliferáló" nevezett attraktorban csak a ciklinek ciklikus mozgása volt megfigyelhető, ezzel szemben az "instabil proliferáló" nevezett attraktorban ezen kívül más fehérjék aktivitása is ciklikusan változott.



3. ábra. A daganatos sejtek jelátviteli útvonalait leíró hálózat attraktorai közti átmenetek különféle zajszintek hatására. Magas és közepes szintű zaj mellett (A és B táblák) csak a legnagyobb, apoptotikus attraktor (A) stabil, alacsony zajszint mellett (C tábla) az S jelű, stabil proliferáló attraktor is stabilizálódik. A természetes zajszintnek leginkább a közepes szintű zaj feleltethető meg (B tábla).

Ezután a három különböző attraktort kezdőállapotként beállítva egy olyan kísérletsorozatot indítottam, melyben mindhárom attraktorra 1000 alkalommal kis (5 lépés ideig $\pm 0,001$ egység), közepes (10 lépés, $\pm 0,1$ egység) és nagy (30 lépés, $\pm 0,4$ egység) rózsaszín zaj alakú beavatkozást tettem, és vizsgáltam az attraktor viselkedését. Az eredményeket nagy, közepes és alacsony zaj esetében a 3. ábra A, B és C táblája mutatja, ahol A jelöli az apoptotikus attraktort, S a stabil proliferálót, I pedig az instabil proliferálót. A fiziológias apoptotikus attraktort a méretének megfelelően igen nehéz volt elmozdítani, csak a legnagyobb mértékű zaj esetében sikerült 0,9% eséllyel átvinni a stabil proliferáló attraktorba. Az instabil proliferáló attraktorban levő rendszereket ezzel szemben már a legkisebb zaj is képes volt elmozdítani, nagyrészt (98,6%) az apoptotikus attraktor felé, kisebb részben (1,2%) a stabil proliferáló állapotba. A stabil proliferáló állapot kis zaj esetén még stabilnak bizonyult, közepes és nagyméretű zaj esetében tapasztaltunk csak lehetőséget az attraktor elmozdulására, főként (36,2%) az apoptotikus attraktor felé. Ez azt jelenti, hogy – amennyiben a fiziológias attraktorok a patológias attraktoroknál általános esetben is nagyobbak – a természetes zaj *segíti* a jelátvitel szabályozását, annak

megfelelő keretek között tartását. Ezen eredmények segítenek annak a hipotézisnek az alátámasztásában is, mely szerint az állapotter méretétől függően a legnagyobb attraktorok azonosítása elég lehet a fő működési folyamatok megértéséhez, mivel természetes zaj mellett a kisebb attraktorok hamar destabilizálódnak.

Mutációs profilk meghatározása. Ugyan az attraktorok azonosítása, és a belőlük kinyerhető adatok vizsgálata önmagában is érdekes kutatási munkára ad lehetőséget, esetemben az attraktorkeresésnek kifejezett célja az volt, hogy azonosítani tudjuk a vizsgált hálózatunk olyan állapotait, melyek a beavatkozás-tervező algoritmus logikus kezdő-, és célállapotai lehetnek, és így mód nyíljon adott modelleken való konkrét beavatkozások megtervezésére.

A mutációk által érintett sejt állapottere azonban már jó eséllyel nem ugyanaz, mint mutációmentes esetben. Többen feltételezték már, hogy a daganatos állapotokhoz tartozó attraktorok normál állapotban nem elérhetőek, és a mutációk hatására változik meg úgy az állapotter alakja, hogy azok immár könnyen elérhetővé válnak.

Ez a feltételezés nem alaptalan. Egy kódoló szakaszban történt mutáció egy adott sejt genomjában, amennyiben az befolyásolja a pont aktivitását, egy *folyamatosan fennálló* beavatkozásnak tekinthető, ami ezért képes módosítani a sejt attraktortérképét (állapotterét).

A daganatos sejtekben tapasztalt jelentős rezisztencia alapján következő hipotézisem az volt, hogy a daganatok kialakulásában fontos "driver" (vezérlő) mutációk a sejt állapotterét úgy változtatják meg, hogy a patológiás attraktor mérete a fiziológiásnál jelentősen nagyobbra nő, amely ponton a természetes zaj segítő szerepe hátráltatóvá válik, mivel a patológiás attraktorból való kilépést ugyanúgy megnehezíti, mint mutációmentes esetben az abba történő belépést.

Következő lépésként ezért megpróbáltam ezen, a Fumiã és Martins által 2013-ban leírt hálózatban azonosítani olyan mutációkat, illetve mutációk olyan kombinációit, melyek alkalmazásával a proliferatív attraktor mérete jelentősen nagyobbra nő, mint

1. táblázat. A proliferáló attraktor dominanciájához vezető mutációsorozatok. A *ki* funkcióvesztő, a *be* konstitutív aktivációhoz vezető mutáció(ka)t jelent egy adott fehérje neve mögött. A P53, az ATM/ATR és az NF- κ B funkcióvesztése önmagában is elég erős hatás volt ahhoz, hogy egyeduralkodóvá tegye a daganatos attraktort. Az NF- κ B azért nincs feltüntetve, mivel az általa okozott „kvázi-proliferatív” állapotban a ciklinek aktiválódásának módja nem egyezik teljesen meg az eredeti közleményben bemutatott, proliferációt eredményező aktivációs mintával.

Sorszám	Mutációk
1.	P53 <i>ki</i>
2.	BCL-2 <i>be</i> , PTEN <i>ki</i>
3.	S-NAIL <i>be</i> , CHK1/2 <i>ki</i>
4.	ATM/ATR <i>ki</i>
5.	CHK1/2 <i>ki</i> , PTEN <i>ki</i>
6.	BCL-2 <i>be</i> , AKT <i>be</i>
7.	E-CADH <i>ki</i> , CHK1/2 <i>ki</i>
8.	PTEN <i>ki</i> , IKK <i>be</i>
9.	AKT <i>be</i> , CHK1/2 <i>ki</i>
10.	PTEN <i>ki</i> , BAX <i>ki</i>
11.	CHK1/2 <i>ki</i> , AKT <i>be</i>
12.	AKT <i>be</i> , E-CADH <i>ki</i>
13.	AKT <i>be</i> , BAX <i>ki</i>

a fiziológiás, apoptotikus attraktor, esetleg ez utóbbi teljesen meg is szűnik. 13 ilyen mutációsorozatot azonosítottam, ezeket mutatja be az 1. táblázat.

Az eredmények igen biztatóak. A P53 természetesen igen ismert tumor-szuppresszor, emellett mind az ATM/ATR, a PTEN, az AKT, a BCL-2, a BAX, a CHK1/2 és az IKK fehérjék táblázatban szereplő megváltozásainak daganatképződésre illetve sejtproliferációra gyakorolt hatása megtalálható az irodalomban. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a valós daganathoz vezető patológiás folyamatok kialakulásának mechanizmusa az állapottér alakjának megváltozásával jól modellezhető.

Beavatkozás-tervezés. A vezérlő mutációk által okozott állapottér-változások feltérképezésével adódik a kérdés, hogy lehetséges-e egy adott mutációs profilhoz specifikusan megtervezni egy olyan beavatkozást, mely a sejt állapotterét úgy változtatja meg, hogy az a beavatkozás alatt apoptotikus állapotba tud kerülni.

2. táblázat. Mutáció-specifikus beavatkozások. A *gtl.* gátlást, az *akt.* aktiválást jelent, a *be* konstitutív aktivációt, míg a *ki* konstitutív inaktivációt (funkcióvesztést). A dőlt betűkkel jelölt beavatkozások egészséges sejtben futtatott szimuláció alapján várhatóan toxikusak, a csillaggal jelöltek pedig nem vezettek teljes apoptózishoz (a hálózat „apoptózis” pontja ciklikusan kapcsolt csak be, nem volt minden lépésben aktív).

Sorszám	Profil	Beavatkozás-sorozat
1.	P53 <i>ki</i>	<i>RTK gtl. ÉS (JNK akt. vagy TGF-β akt. vagy BAX akt.)</i>
2.	BCL-2 <i>be</i> , PTEN <i>ki</i>	<i>AKT gtl. ÉS (TGF-β akt. vagy BAX akt. vagy JNK akt.) *</i>
3.	S-NAIL <i>be</i> , CHK1/2 <i>ki</i>	<i>RTK gtl.* vagy RAS gtl.* vagy PI3K gtl.* vagy P53 akt.</i>
4.	ATM/ATR <i>ki</i>	<i>P53 akt.</i>
5.	CHK1/2 <i>ki</i> , PTEN <i>ki</i>	<i>PDK1 gtl. * vagy AKT gtl. *</i>
6.	BCL-2 <i>be</i> , AKT <i>be</i>	N/A
7.	E-CADH <i>ki</i> , CHK1/2 <i>ki</i>	<i>AKT gtl. * vagy PDK1 gtl. * vagy RTK gtl. * vagy RAS gtl. * vagy PI3K gtl. *</i>
8.	PTEN <i>ki</i> , IKK <i>be</i>	<i>NF-κB gtl. vagy BCL-2 gtl.</i>
9.	AKT <i>be</i> , CHK1/2 <i>ki</i>	<i>P53 akt. vagy (IKK gtl. ÉS (VHL gtl. vagy P14 akt. vagy ROS akt.))*</i>
10.	PTEN <i>ki</i> , BAX <i>ki</i>	<i>AKT gtl. vagy PDK1 gtl.</i>
11.	CHK1/2 <i>ki</i> , AKT <i>be</i>	<i>P53 akt.</i>
12.	AKT <i>be</i> , E-CADH <i>ki</i>	<i>IKK gtl. vagy NF-κB gtl. vagy BCL-2 gtl.</i>
13.	AKT <i>be</i> , BAX <i>ki</i>	N/A

Ezt a vizsgálatot úgy oldottam meg, hogy kezdőállapotnak minden esetben az adott mutációs profilhoz tartozó legnagyobb attraktor egyik pontját jelöltem meg, végállapotnak pedig bármilyen apoptotikus állapotot. Mivel itt nem csak a rendszer pályáját, hanem az *állapotterét* kellett módosítani, így az alkalmazott beavatkozások szintén valamelyik fehérje aktivitásának állandó megváltoztatását jelentették.

Az egyes profilokhoz tervezett beavatkozásokat mutatja a 2. táblázat. Megnyugtató, hogy az eredmények között több ízben előkerült a receptor tirozin kináz gátlás, mint beavatkozás (RTK *gtl.*), mivel a legelső és a mai napig eredményesen alkalmazott célzott daganatterápiás beavatkozások receptor tirozin kináz gátlók

(cetuximab (Erbix), panitumumab (Vectibix): EGFR, sunitinib (Sutent): széles spektrumú RTK inhibitor, sorafenib (Nexavar): VEGFR, PDGFR). Mindemellett a többi gyakran előforduló talált beavatkozás is megjelenik az irodalomban, mint ígéretes kísérleti célpont, így mind a BCL-2, a PDK1, az IKK, az AKT, a PI3K és az NF- κ B gátlószerei.

Tervezés a toxicitás figyelembe vételével. A beavatkozások egyes elemei ugyan a szakirodalom által igazoltan is helyesnek tűnnek, de magukat a teljes beavatkozások sok esetben (1., ami, mint a P53 elvesztése, kiemelkedően fontos, ezen kívül a 2., 4. és a 11. profil, ez utóbbi kettő toxicitása a P53 közvetlen aktivációjának tulajdonítható) toxikusnak jósolhatjuk, ha megvizsgáljuk a beavatkozás hatását mutációmentes esetben, olyan mikro környezetben, melyben alapesetben egy csendes (nem apoptotikus, nem proliferatív) attraktort találunk. Az említett beavatkozások az ilyen sejteket is apoptózisba viszik, ami arra utal, hogy a beavatkozás nem csak a hibásan proliferatív sejtekre hat, hanem várhatóan a legtöbb sejtet elpusztítja.

Az algoritmust ezért úgy alakítottam át, hogy minden beavatkozás-jelölttel két szimulációt is futtattam a fitness-érték kiszámításához, egyet a mutációkat elszenvedett sejtre, egyet pedig a mutációmentes, nyugalmi állapotot eredményező környezetű sejtre, melyet a beavatkozás sem apoptózisba, sem proliferációba nem vihetett. Az így számolt két fitness-érték összeadásával adódott az új beavatkozás szelekciós értéke. Ezeket a beavatkozás-sorozatokat a 3. táblázat tartalmazza.

Érdekes jelenség, hogy a beavatkozás-sorozatok több esetben tartalmazták a von Hippel-Lindau fehérje gátlását. (VHL *gtl.*). Ez nem egy természetes beavatkozás, mert a VHL fehérje hibás működése von Hippel-Lindau szindrómában épphogy vesedaganat kialakulásához vezet, mindazonáltal közelebbről megvizsgálva ezeket a beavatkozásokat kiderült, hogy a VHL gátlására valóban nem az effektivitáshoz volt szükség, hanem ezen beavatkozás hozzáadása védte meg az egészséges sejteket az apoptózistól. Mindez azt jelentheti, hogy a VHL fehérje rövid idejű gátlása a célzott

3. táblázat. Nem toxikusra tervezett beavatkozások. A *gtl.* gátlást, az *akt.* aktiválást jelent, a *be* konstitutív aktivációt, míg a *ki* konstitutív inaktivációt (funkcióvesztést). Ezek a beavatkozások az egészséges sejtnak a szimulációk alapján nem ártanak, de a proliferáló sejtben apoptotikus jeleket mutatnak.

Sorszám	Mutációk	Nem toxikus beavatkozás
1.	P53 <i>ki</i>	BCL-XL <i>gtl.</i> ÉS VHL <i>gtl.</i> ÉS (PDK <i>gtl.</i> vagy AKT <i>gtl.</i> vagy PI3K <i>gtl.</i>)
2.	BCL-2 <i>ki</i> , PTEN <i>ki</i>	TGF-B <i>akt.</i> ÉS P90 <i>gtl.</i> ÉS PDK1 <i>gtl.</i>
4.	ATM/ATR <i>ki</i>	VHL <i>gtl.</i> ÉS (RAS <i>gtl.</i> vagy PHD <i>gtl.</i>)
11.	CHK1/2 <i>ki</i> , AKT <i>be</i>	BCL-2 <i>gtl.</i> ÉS PHD <i>gtl.</i> ÉS SMADE2F <i>gtl.</i>

kezelések toxicitását csökkentheti, illetve eddig toxikusnak tartott beavatkozások válhatnak a fehérje gátlásának szinergiájával alkalmazhatóvá.

Zavaró mutációk. Amikor egy rosszindulatú daganat észlelhetővé válik, akkor természetesen már nem csak a vezérlő mutációkat tartalmazza. A daganatos sejtek genomjába olyan "potyautas" (passenger) mutációk is bekerülhetnek, melyek kifejezetten rezisztenssé tehetik azt a célzott terápiára. Ennek legjobb példája a KRAS gén mutációja, mely esetében a konstitutívan aktív KRAS fehérje a tumort EGFR-gátló gyógyszerekkel szemben igen ellenállóvá teszi.

Ezért megvizsgáltam azon mutációs profilokat, melyekre tervezett beavatkozás receptor tirozin kináz gátlást is tartalmaz (1., 3., 7.), hogy egy újabb, RAS-t aktiváló mutáció esetén a szimuláció szerint is elvesztik-e a hatékonyságukat.

Valóban ez történt. Az összes vizsgált beavatkozás elvesztette az apoptotikus hatását. Ezzel szemben azok a beavatkozások, melyek más útvonalakat céloztak, továbbra is hatásosak maradtak, tehát például a PI3K gátlása továbbra is hatásos terápia volt a konstitutívan aktivált RAS-sal kiterjesztett 3. és 7. profil esetében, továbbá a 7. profil esetében a PDK1 és az AKT gátlása is.

Az 1. profil esetében viszont minden egyszerű beavatkozás-sorozat tartalmazott RTK gátlást. Így, mivel a P53 fehérje funkcióvesztése igen általános különféle daga-

natok kialakulása során, erre a specifikus esetre (P53 *ki*, RAS *be*) külön terveztem egy kezelést.

A legegyszerűbb ilyen beavatkozás-sorozat három elemből áll: RAF gátlás, BAX aktiválás és vagy a PI3K vagy a PDK gátlása. Ennek segítségével a sejt teljesen apoptózisba vihető, cserébe az egészséges sejtekre számolt szimulációk alapján magas toxicitás várható. Érdeemes itt megemlíteni, hogy az első, Vemurafenib nevű bRAF gátlószer 2011 augusztusában került piacra, előrehaladott melanóma kezelésére való indikációval. A legegyszerűbb olyan kezelés, ami az egészséges sejteket nem vitte apoptózisba, de a daganatos sejteken kifejtett apoptotikus hatást (habár nem teljesen), megegyezik az 1. profilra eredeti, kRAS-mutáció mentes esetben számolt nem-toxikus beavatkozással a 3. táblázatban, azaz BCL-XL gátlás, VHL gátlás és például AKT gátlás szükséges hozzá.

Következtetések

Munkám legfontosabb eredményei a következő pontokban foglalhatóak össze:

- Elkészítettem a Turbine nevű gyors, általános hálózatszimulációs rendszert, mely rendkívül nagy hálózatok hatékony szimulációjára is képes, ezen kívül olyan, magasabb szintű dinamikai vizsgálatok is megvalósíthatóak a program használatával, mint az attraktorkeresés, vagy a beavatkozás-tervezés.
- Készítettem a programhoz egy általános dinamikai modellt, melyet közlekedő-edény-modellnek neveztem el, illetve egy specifikus, jelátviteli hálózatok pontosabb elemzésére képes jelátvitel-dinamikai modellt.
- Ezen általános modell segítségével definiáltam egy terjesztési központiság nevű mérőszámot, mely az *E. coli* Met-tRNS szintetáz enzimén a többi központisági módszertől eltérően mindkét tRNS kötőhely kiemelésére képesnek bizonyult. Megmutattam továbbá, hogy a terjesztési központiságok értéke követi a fehér-

jék másodlagos struktúráinak rendezett-rendezetlen változását, sőt élesztőben ismert stresszreakciókat is sikeresen kiemelt.

- Kísérleteim alapján megállapítottam, hogy a rendszerek viselkedésének leírásához a legnagyobb attraktorok ismerete elég lehet azok számától függetlenül, mivel a relatív kis attraktorok a természetes szintnek megfeleltethető zaj hatására destabilizálódnak.
- Megmutattam, hogy sok, daganatokban jellemző diszreguláció úgy változtatta meg egy sejt jelátviteli hálózatának állapotterét, hogy a patológiás attraktor vált a legnagyobb méretűvé.
- Végül ezen diszregulációkat alkalmazva a használt jelátviteli hálózatra megmutattam, hogy a beavatkozás-tervező eszköz segítségével racionálisan tervezhetőek olyan beavatkozások, melyek a diszregulált sejtet apoptózisba viszik úgy, hogy közben az egészséges sejteket a szimulációk tanúsága szerint nem, vagy kevésbé károsítják.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönetet szeretnék mondani **Prof. Csermely Péter** akadémikusnak, témavezetőmnek és immár barátomnak, hogy tanácsaival, tapasztalatával segített az elmúlt években, és hogy keményen dolgozott azon, hogy kutatót faragjon belőlem.

Köszönöm **Prof. Mandl József** akadémikusnak, és **Prof. Bánhegyi Gábornak**, hogy lehetőséget biztosítottak számomra az intézetben való munkára.

Köszönöm **Dr. Söti Csabának** a labormunkában való megmerítkezés lehetőségét, és **Somogyvári Milánnak**, hogy megtanított a *C. elegans* vizsgálatának rejtelmeire.

Köszönöm **Szöts Ákosnak** a Turbine CUDA modul elkészítését.

Köszönöm **Mihalik Ágostonnak** az élesztő stresszválaszában nyújtott tanácsadását.

Köszönöm **Dr. Amit Ghosh**-nak és **Prof. Saraswathi Vishveshwara**-nak a MetRS fehérjeszerkezeti adatokat.

Köszönöm továbbá **Portschy Ádámnak** a Turbine összehangolását a BOINC rendszerrel és a helyi BOINC kiszolgálónk felállítását.

Szeretném továbbá megköszönni munkacsoportomnak, a **LINK-Group** összes tagjának ötleteiket, tanácsaikat és a közös munkát.

Hálásan köszönöm édesanyámnak, **Szalay Évának** és édesapámnak, **Szalay Zsoltnak**, hogy mindenben támogattak, segítettek, és bíztak bennem az idáig vezető úton.

Köszönettel tartozom feleségemnek, **Pintér Eszternek**, hogy mellettem állt, segített, bátorított, és támaszt nyújtott nekem mindig, amikor szükségem volt rá. Bízom benne, hogy az elkövetkező években viszonzni tudom.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Szalay **KZ**, Csermely P (2014) Attractor structures of signaling networks: consequences of different conformational barcode dynamics and their relations to network-based drug design. *Mol Inf* 33: 463–468. **IF: 2.013**

Szalay **KZ**, Csermely P (2013) Perturbation centrality and Turbine: a novel centrality measure obtained using a versatile network dynamics tool. *PLoS ONE* 8: e78059. **IF: 3.534**

Farkas IJ, Korcsmáros T, Kovács IA, Mihalik Á, Palotai R, Simkó GI, **Szalay KZ**, Szalay-Bekő M, Vellai T, Wang S, Csermely P (2011) Network-based tools for the identification of novel drug targets. *Science Signaling* 4: pt3.

Egyéb közlemények

Veres DV, Gyurkó MD, Thaler B, **Szalay KZ**, Fazekas D, Korcsmáros T, Csermely P (2014) ComPPI: a cellular compartment-specific database for protein-protein interaction network analysis. *Nucleic Acids Res*, doi: 10.1093/nar/gku1007 **IF: 8.808**

Csermely P, Hódsági J, Korcsmáros T, Módos D, Perez-Lopez AR, **Szalay K**, Veres DV, Lenti K, Wu LY, Zhang XS. (2014) Cancer stem cells display extremely large evolvability: alternating plastic and rigid networks as a potential mechanism. *Semin Cancer Biol* nyomtatás alatt, doi: 10.1016/j.semcancer.2013.12.004.

Hegedűs T, Gyimesi G, Gáspár ME, **Szalay KZ**, Gangal R, Csermely P (2013) Potential application of network descriptions for understanding conformational changes and protonation states of ABC transporters. *Curr Pharm Des* 19: 4155–4172. **IF: 3.288**