

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Dúl Zoltán

Semmelweis Egyetem Fogorvostudományi Kar, fogorvos szak IV. évfolyam

Módos Dezső

Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar, orvos szak VI. évfolyam

Hálózati motívumok azonosítása és elhelyezkedése a jelátviteli útvonalak hálózatában

Országos Tudományos diákköri dolgozat

Eötvös Lóránd Tudomány Egyetem

Témavezetők:

Dr. Korcsmáros Tamás

Eötvös Loránd Tudomány Egyetem Természettudományi Kar

Genetikai Tanszék

Földvári-Nagy Lászlóné Dr. Lenti Katalin

Semmelweis Egyetem Egészségtudományi Kar

Morfológiai és Fiziológiai Tanszék

Prof. Csermely Péter

Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet

TARTALOMJEGYZÉK

<u>TARTALOMJEGYZÉK</u>	<u>2</u>
<u>BEVEZETÉS</u>	<u>3</u>
<u>CÉLKITŰZÉSEK</u>	<u>6</u>
<u>MÓDSZERTAN ÉS ESZKÖZÖK</u>	<u>7</u>
<u>EREDMÉNYEINK</u>	<u>11</u>
Motívumok azonosítása a jelátviteli hálózatban	11
Motívumok a jelátviteli útvonalakban	11
Motívumok elhelyezkedése a jelátviteli útvonalakban: a jelátviteli pozíció meghatározása	12
Motívumok szöveti expressziója	15
Jelátviteli motívumok megoszlása az útvonalakon belül és az útvonalak közötti cross-talk motívumokban	16
Motívumok orvosi vonatkozásai	19
Motívumok gyógyszerészeti elemzése	19
<u>DISZKUSSZIÓ</u>	<u>21</u>
<u>KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS:</u>	<u>24</u>
<u>HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE</u>	<u>25</u>

BEVEZETÉS

Az élőlényekben, más komplex rendszerekhez hasonlóan megfigyelhetőek hálózatok, amelyek rendszerszintű elemzésével új ismeretekre tehetünk szert. Biológiai hálózatokat megfigyelhetünk a populáció, az egyed, a szervrendszerek, a sejt, a szubcelluláris elemek és a molekulák szintjén. Jelen munkánkban az utóbbi szinttel foglalkozunk, és hálózati motívumokat azonosítottunk és elemeztünk az emberi jelátviteli útvonalak hálózatában.

Hálózati motívumoknak nevezzük az olyan természetes és mesterséges hálózatokban előforduló kapcsolati mintázatokat, amelyek a randomizált hálózatoknál gyakrabban fordulnak elő és a hálózat felépítéséhez szükségesek ⁽¹⁾. Ilyen motívumok például a visszacsatolási, ún. *feedback* és az előrecsatolási, ún. *feed-forward* motívumok. Az elmúlt évtized kutatásai rámutattak arra, hogy a legkülönbözőbb biológiai hálózatok (ökológiai vagy sejten belüli hálózatok) nagyon hasonló belső felépítéssel rendelkeznek, és hasonló motívumok építik fel őket ⁽¹⁾. A hálózati motívumokat először az

Coherent FFL

Coherent type 1



Coherent type 2



Coherent type 3



Coherent type 4



Incoherent FFL

Incoherent type 1



Incoherent type 2



Incoherent type 3



Incoherent type 4



Negative feedback



Positive feedback

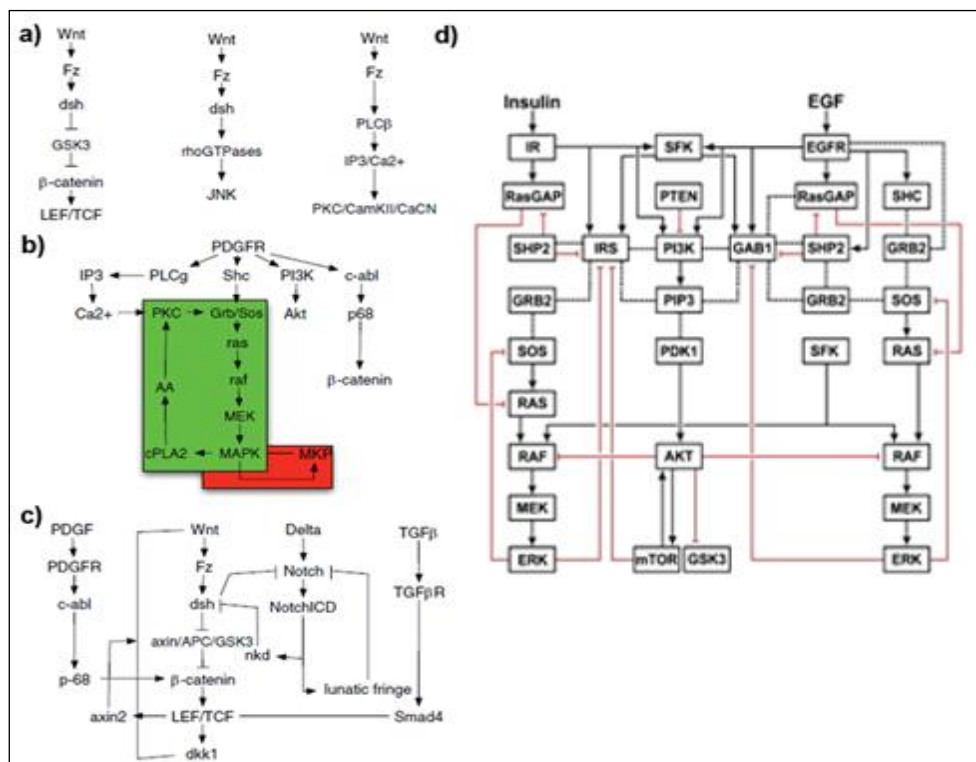


1. ábra: Hálózati motívumok. 4 koherens és 4 inkohereus feedforward típus, valamint 1-1 pozitív és negatív feedback Forrás: (1)

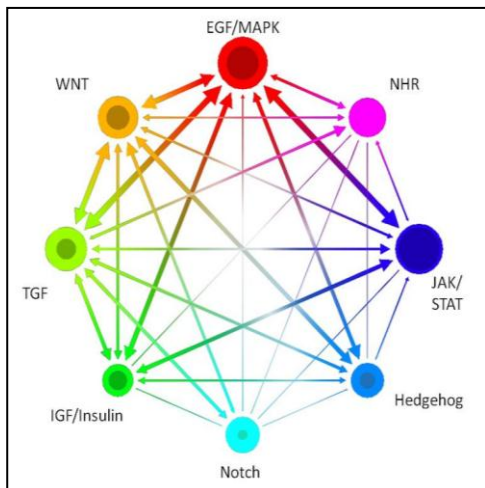
E. coli baktérium transzkripcionális szabályozásánál írták le, mint fontos szabályzók ⁽²⁾. Majd kimutatták, hogy a hálózati motívumok evolúciósan konzerváltak és szerepük van a biológiai adaptáció és a szabályzás kialakításában ⁽¹⁾. A hálózati motívumok, mint a bonyolult rendszerek funkcionális alegységei, segítenek új nézőpontot kialakítani a nagy mennyiségű adatból készült adatbázisokban. Továbbá a motívumok segítségével jobban megérthetjük a rák kialakulása során bekövetkező rendszerszintű változásokat ⁽³⁾. Az így szerzett eredmények alkalmazásával pedig új gyógyszercélpontok felfedezésre nyílik lehetőség ⁽⁴⁾.

Hálózati motívumok a jelátviteli útvonalakban is ismertek. A feed-forward motívumoknak fontos szerepe van a jeltovábbítás dinamikájában és az adaptációban ⁽⁵⁾. A sejtciklus jelátvitelének egyik fontos eleme a negatív feedback szabályzás, amely segíti a visszacsatolást a képződött fehérje és a transzkripció között ⁽⁶⁾. A pozitív feedback pedig alapvető jelentőségű a jelátviteli útvonalakban a jel erősítésében ^(1,7) (1. ábra).

A jelátviteli útvonalak kutatása nemrégiben egy komoly paradigmaváltáson esett át. Egy évtizeddel ezelőtt még a fejlett eukarióták esetében is a jelátviteli útvonalakat önálló, egymástól jól elkülönülő, lineáris molekuláris (genetikai vagy fehérje) kaszkádokként kezelték (2/a ábra). Az elmúlt években alkalmazott módszerek fejlődésének köszönhetően egyre több kísérletes adat mutatott rá a jelátviteli útvonalakon belüli és azok közötti kapcsolatok jelenlétére (2/b-d ábra). Az útvonalak közötti kapcsolatokat *keresztbeszélgetésnek*, angolul *cross-talk*-nak nevezik. A jelátviteli útvonalak közötti kapcsolatok részei lehetnek hálózati motívumoknak is. A 2/b ábrán a PDGFR növekedési faktor receptorból kiinduló jelátviteli utak és az itt található pozitív és negatív szabályozó motívumok láthatóak. A 2/c ábrán három további útvonal, a WNT, Notch és TGF- β útvonalak közötti néhány cross-talk motívum szerepel. Az EGF/MAPK és az Insulin útvonal közötti kapcsolatok és hálózati motívumok a leginkább ismertek, így ezekről egy külön tanulmány is készült ⁽⁸⁾. A 2/d ábrán jól láthatóak egyrészt az útvonalakon belüli legfontosabb kapcsolatok, másrészt a két útvonalat összekötő cross-talk kapcsolatok. A különböző serkentő és gátló hatású motívumok biztosítják a két útvonal együttműködésének a szabályozását.



2. ábra A jelátviteli útvonalak és hálózatok felépítése, a keresztbeszélgetések jelentősége. a) A WNT ligandum által aktivált lineáris elrendezésű jelátviteli útvonalak. **b)** Pozitív és negatív visszacsatolási hurkok egy növekedési faktor (PDGF) által aktivált MAPK kaszkádban. A pozitív visszacsatolás zölddel, a negatív pirossal van jelölve. Itt az is látható, hogy az aktiválás hatására nemcsak a MAPK, hanem egyéb útvonalak felé is haladhat a jel. **c)** A PDGF, a WNT, a Notch és a TGF- β jelátviteli útvonalak közötti keresztbeszélgetések által alkotott jelátviteli hálózat. **d)** Az EGF/MAPK és az Insulin jelpálya cross-talk kapcsolatai és hálózati motívumai. Források: a-c) (9); d) (8)



3. ábra A SignaLink jelátviteli adatbázis. Az ábrán a nyilak vastagsága egyenesen arányos a az útvonalak közötti kapcsolatok számával. A körök mérete a jelátviteli útvonalak méretével arányos. A sötétebb körök az útvonala esszenciális (core) régióját mutatják. Forrás: (10)

Mindezen eredmények következtében ma már a jelátviteli rendszereket egységes jelátviteli hálózatként kezelik, amelynek a sűrűn kapcsolt útvonalak a főbb építőkövei. Ez az újfajta szemlélet és a megnövekedett adatmennyiség miatt új adatforrásokra van szükség a jelátviteli hálózat rendszerszintű vizsgálatához. Ezt felismerve az elmúlt öt évben témavezetőink kutatócsoportjai, együttműködésben az MTA Statisztikus és Biofizikai Kutatócsoportjával elkészítették a SignaLink adatbázist ⁽¹⁰⁾. Ez a jelátviteli útvonal adatbázis

egységes, kézi gyűjtés alapján készült, és csak irányított, ill. publikált kapcsolatokat tartalmaz. Így alkalmas a cross-talkok rendszerszintű elemzésére ⁽¹⁰⁾. A SignaLink vizsgálata során a kutatócsoportunk azt találta, hogy nyolc fontos útvonal

egységes cross-talk hálózatot alkot: valamennyi útvonala kapcsolatban áll egymással ⁽¹⁰⁾ (3. ábra). Egy ilyen sűrűn kapcsolt jelátviteli hálózat precíz szabályozást igényel. Tekintettel a néhány, kevészámú útvonal között azonosított cross-talk motívumra (2. ábra) és a cross-talkok általános jelenlétére (3. ábra), felmerült, hogy a SignaLink adatbázist felhasználva rendszerszinten, több útvonal hálózatában is azonosítsunk cross-talk motívumokat.

CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásunk kezdetén célul tűztük ki, hogy azonosítsuk az irodalomban leírt hálózati motívumok közül a háromelemű három kapcsolattal rendelkező motívumokat az emberi jelátviteli hálózatból. Továbbá az alábbi elemzéseket is célul tűztük ki az azonosított jelátviteli motívumokkal kapcsolatban:

- **Jelátviteli útvonalak rendszerszintű összehasonlítása:** Az egyes útvonalak motívum tulajdonságainak összehasonlítása annak érdekében, hogy felderítsük, hogy van-e szignifikáns eltérés az egyes útvonalakban megjelenő motívumtípusok között.
- **Jelátviteli pozíció meghatározása:** Az egyes jelátviteli pozíciókra (pl.: receptor, ligand, transzkripció faktor), illetve a pozíciók között leginkább jellemző motívumok azonosítása és a motívumtípusok összehasonlító vizsgálata jelátviteli pozíciók szerint.
- **Szöveti expresszió összehasonlítása:** A talált hálózati motívumok megoszlása, az egyes szövet típusokban való expresszáció szerint.
- **Jelátviteli motívumok vizsgálata az egyes útvonalakon belül és az egyes útvonalak között:** A talált jelátviteli motívumok megoszlása egy adott jelátviteli útvonalon belül és az útvonalak közötti cross-talkokban.
- **Orvosi vonatkozások:** Az egyes hálózati motívumok betegség gén tartalom szerinti megoszlása. Illetve patológiás, rákos állapotokban az azonosított jelátviteli motívumok előfordulásának vizsgálata és a motívum pozíciók szerinti elemzése.
- **Gyógyszerészeti vonatkozások:** Az egyes motívumok, illetve a motívum típusokban lévő egyes motívum pozíciók gyógyszerészeti relevanciájának, illetve gyógyszer-célpontosságának összehasonlító vizsgálata.

MÓDSZERTAN ÉS ESZKÖZÖK

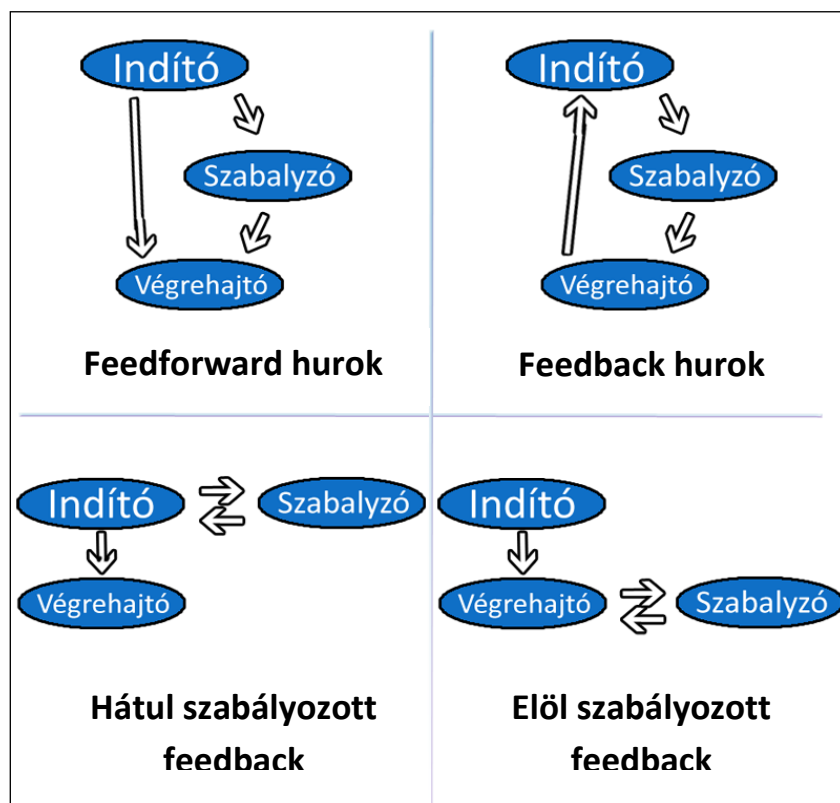
Ahhoz, hogy hálózati motívumokat a jelátviteli rendszer szintjén azonosítsuk elengedhetetlenül szükséges egy megfelelő jelátviteli útvonal adatbázis. Az irodalomban több adatbázis is létezik, amelyet gyakran használnak jelátviteli útvonalak vizsgálata során. Ilyen a KEGG, a NetPath, vagy a REACTOME ⁽¹¹⁻¹³⁾. Azonban ezek nem alkalmasak az egységes jelátviteli hálózat vizsgálatra, mivel nem megfelelő részletességgel tartalmazzák az útvonalak közötti kapcsolatokat ⁽¹⁰⁾. Célkitűzéseink között szerepelt, hogy az útvonalak közötti cross-talk kapcsolatokban is felderítsük a motívumokat. Ezért a cross-talk vizsgálatra leginkább alkalmas Signalink adatbázist (www.signalink.org) használtuk adatforrásul. A Signalink a jelátviteli útvonalak közül nyolc, a differenciációban és a tumorgenezisben alapvető fontosságú, biokémiai és evolúciós szempontokból jól elkülönülő útvonalat tartalmaz ⁽¹⁰⁾. Ezek a WNT, Hedgehog, NHR, Notch, JAK/STAT, EGF/MAPK, TGF- β és az Insulin/IGF útvonal. A Signalink összehasonlítása a KEGG, a NetPath, és a REACTOME adatforrásokkal rámutatott arra, hogy a Signalink (1) pontosan definiált útvonalakat tartalmaz; (2) a legtöbb fehérjét és irányított kapcsolatot tartalmazza az összehasonlított útvonalak között; (3) a legtöbb cross-talkot és azt alkotó fehérjét tartalmazza; (4) a legnagyobb az átfedése a másik három útvonal-adatbázissal; (5) a legtöbb irodalmi forrást tartalmazza (6) szerepel benne az egyes fehérjéknek az útvonalakon belüli szerepe is ⁽¹⁰⁾. Az itt bemutatásra kerülő munka szempontjából a cross-talkok nagy száma és azok irányának, illetve serkentő/gátló hatásának a megadása volt az, ami miatt a Signalink adatbázis tűnt a legalkalmasabbnak arra, hogy cross-talk motívumokat azonosítsunk a jelátviteli útvonalak között. Az adatbázis az emberi fajban 525 fehérjét tartalmaz, amely között 1006 irányított kapcsolat került leírásra ⁽¹⁰⁾.

A jelátviteli hálózat megjelenítésére és a hálózati motívumok kereséséhez szükségünk volt egy hálózat ábrázolásra képes szoftverre. Ebből a célból a Cytoscape programot használtuk (<http://www.cytoscape.org>, ⁽¹⁴⁾) a hálózatok megjelenítésére és elemzésére. Míg az ehhez elérhető NetMatch pluginnel (<http://baderlab.org/Software/NetMatch>, ⁽¹⁵⁾) azonosítottuk az összes hálózati motívumot a Signalink jelátviteli hálózatban.

A hálózati motívumok azonosítása során az Uri Alon által a molekuláris biológiába bevezetett besorolást alkalmaztuk, amely differenciálta a motívumokat feed-forward és feedback mintázatokra. A feed-forward motívumon belül megkülönböztethetők a koherens és inkoherens feed-forward motívumtípusok (1. ábra). Feedback típusok elemzéséhez a háromelemű és három kapcsolatot tartalmazó motívumok közül 3 motívum típust definiáltunk: (1) körkapcsolásos feedback, amikor a jel önmagába tér vissza (2) hátul- és (3) elől szabályozott feedback, amikor a szabályzó molekula vagy az indító vagy a végrehajtó molekulát szabályozza oda-vissza kapcsolattal.

A motívumok egyszerűbb elemzése és áttekinthetőség miatt az egyedi motívumtípusokat felépítésük szerinti kategóriákban vontuk össze. Összesen 4 kategóriába csoportosítottunk (4. ábra), ezek a következők:

- **feed-forward hurkok** (koherens+inkoherens feed-forward hurok)
- **körkapcsolásos feedback hurkok** (pozitív és negatív feedback hurok)
- **elől szabályozott feedback hurkok** (elől szabályozott pozitív és negatív feedback)
- **hátszabályozott feedback hurkok** (hátszabályozott pozitív és negatív feedback)



4. ábra A vizsgálatok során definiált hálózati motívum típusok. Felül: feed-forward hurkok, mellette a körkapcsolásos feedback. Alul: hátszabályozott, valamint előszabályozott feedback motívumok.

A talált hálózati motívumokat ezt követően, kézzel egyenként leellenőriztük, és útvonal tagságokat és útvonal pozíciókat rendeltünk hozzájuk a Signalink adatbázis alapján (egy fehérje több útvonal tagja is lehet). PHP és Python programozási nyelvek segítségével elemzéseket végeztünk a kapott motívumokon, vizsgáltuk azok megjelenését, megnéztük hogyan oszlanak el a különböző jelátviteli útvonalakban, valamint megvizsgáltuk, hogy a jelátviteli topológia szempontjából mely régióban találhatók.

A motívumon belüli pozíciók elemzéséhez 3 motívum pozíciót definiáltunk: indító, szabályzó és végrehajtó pozíciót (4. ábra). Ezek a pozíciók minden motívum típus esetén eltértek. Értelmszerűen a körkapcsolt feedback motívumok esetében ezeket a motívum pozíciókat nem vettük figyelembe, mivel azokban a motívumokban nézőpont kérdése, hogy melyik pozíciót tölti be éppen az alkotó fehérje.

Az útvonalak közötti cross-talk vizsgálatához, illetve ábrázolásához kutatócsoportunk által Python programozási nyelven fejlesztett mátrix-ábrázoló programot használtuk fel. A szöveti információkat az egyes expressziós mintázatok elemzéséhez az ENSEMBL adatbázisból (<http://www.ensembl.org/>) töltöttük le. Itt az egyes szövettípusokat és kategóriákat összevontunk a könnyebb értelmezés miatt. Összesen 17 szöveti kategóriát definiáltunk és vizsgáltunk.

Az azonosított hálózati motívumok rák-fejlődésben (tumorgenezis) betöltött szerepének vizsgálatához a COSMIC (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>) és a CGC (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/Census/>) adatbázisokat alkalmaztuk. A CGC adatbázis igazoltan daganatot okozó géneket tartalmaz, míg a COSMIC adatbázisban olyan gének is szerepelnek melyek nem szükségesek a tumor kialakulásához. Ezen utóbbiaknak főleg akkor van szerepük, amikor egy benignus sejtburjánzás elfajul és malignizálódik.

Gyógyszercélpont vizsgálatokhoz felhasználtuk a DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>) adatbázist, amely tartalmazza az egyes gyógyszerek célmolekuláit. Ez az adatbázis csak a közvetlen fehérje hatásokat veszi figyelembe a távolabbi hálózati turbulenciákat nem.

A motívumok gyógyászati relevanciájának vizsgálatához felhasználtuk egy kutatócsoportunk által korábban publikált relevanciaszámítási módszert ⁽¹⁰⁾, ami megmondja, hogy mennyire lenne az adott fehérje valós gyógyszercélpont. Ehhez a vizsgálathoz minden fehérje esetében egy értéket számítunk, ami a következőkből tevődik össze: a motívumbeli fehérje (1) enzim-e, (2) rendelkezik-e kináz doménnel, (3) membránfehérje-e ill. (4) részt vesz-e betegségek alkotásában. Minél magasabb a szám, annál valószínűbb, hogy a fehérje alkalmas lenne gyógyszercélpontnak.

Végezetül eredményeinket statisztikai elemzésnek vetettük alá, *Khi-négyzet próbát*, *Fischer tesztet*, *Kolmogorow-Smirnow tesztet* és *Wilcoxon rang próbát* végeztünk. Minden statisztikai elemzésnél a 0,05 alatti értéket tekintettük szignifikánsnak. Az ábrákon ennek megfelelően, ha szignifikánsak voltak az eltérések azt jeleztük is a p értéktől függően:

- + / -: <0,05 szignifikancia szint;
- ++ / --: <0,01 szignifikancia szint;
- +++ / ---: <0,001 szignifikancia szint.

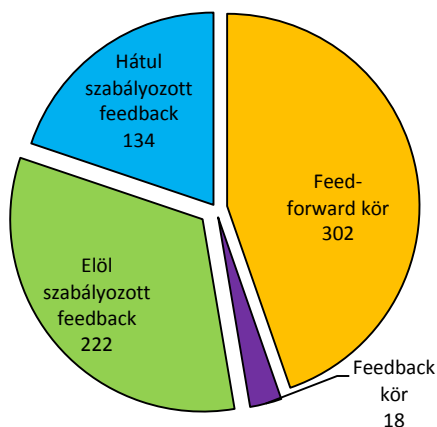
A motívumok útvonalakra eső gyakoriságához a teljes adatbázisban való előfordulásával vetettük össze a motívumok útvonalakon belüli előfordulását. Egyes útvonalak és útvonal régiók gyakorisága a motívumok pozícióiban elemzésnél azt vizsgáltuk meg, hogy az adott útvonal/útvonal régió egy fehérjéjére hány motívum esik, és ez eltér-e a teljes adatbázishoz képest pozitív illetve negatív irányban. Hasonló elvet alkalmaztunk a motívumok orvosi, illetve daganatokbeli vizsgálatánál is. A gyógyszerészeti vizsgálatok esetében megnéztük, hogy van-e eltérés a gyógyszercélpontok megoszlásának a motívum pozíciók szempontjából. A gyógyszerészeti relevancia érték kiszámításakor

motívumonként hasonlítottuk össze az egyes pozíciókat, hogy melyik pozíció lenne a legalkalmasabb gyógyszer-célpontnak.

EREDMÉNYEINK

Motívumok azonosítása a jelátviteli hálózatban

A SignaLink jelátviteli adatbázist felhasználva összesen 676 egyedi motívumot azonosítottunk a 4 motívum kategória alapján: feed-forward, körkapcsolt feedback, elől szabályozott feedback, hátul szabályozott feedback (ld. 4. ábra). A kategóriák elkészítése után készült eloszlást az 5. ábra mutatja. A legtöbb motívumot a feed-forward típusból találtuk, továbbá elől illetve hátul szabályozott



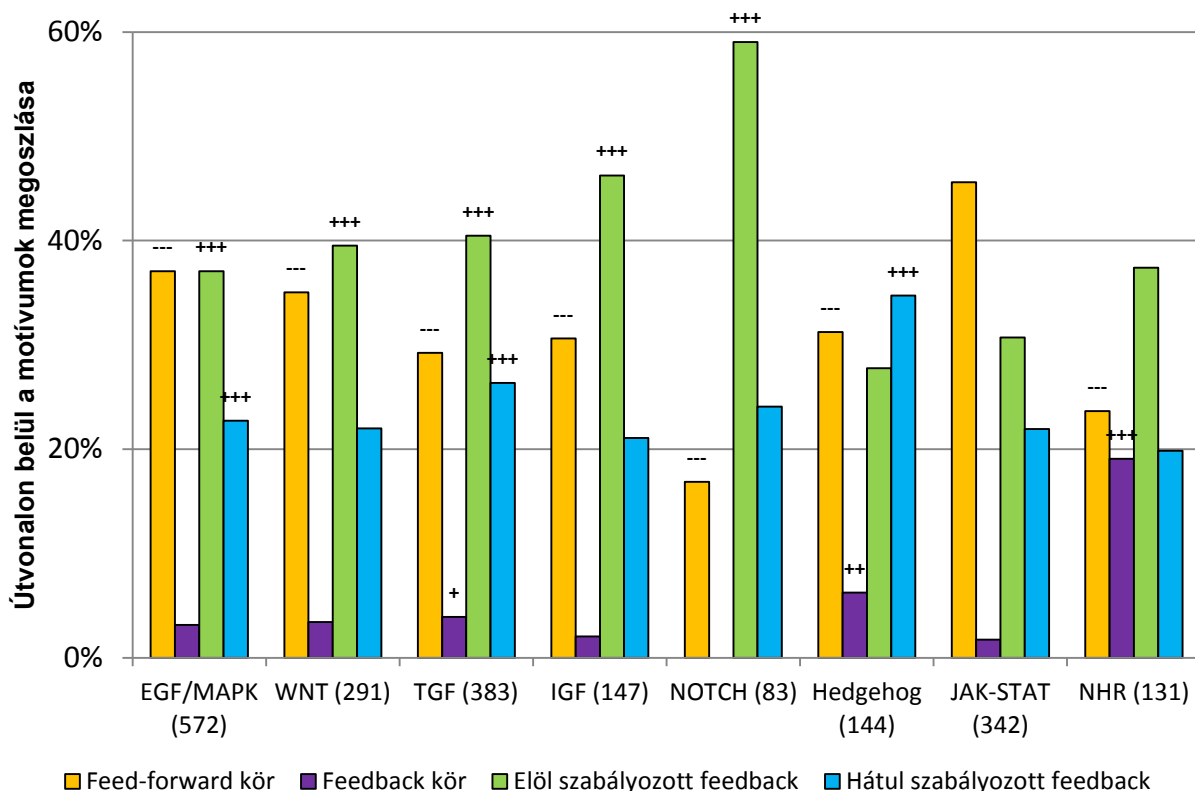
5. ábra A motívumok megoszlása a SignaLink adatbázisban
Összesen 676 egyedi motívumot találtunk.

feedbackek voltak megtalálhatóak az adatbázisban. Érdekes módon a feedback hurokból viszonylag kevés motívumot találtunk.

Motívumok a jelátviteli útvonalakban

Elemzésünk következő lépéseként mind a 676 motívum mindhárom fehérjéjéhez útvonaltagságot rendeltünk. Egy motívum akkor tartozott egy útvonalba, ha legalább egy fehérjéje eleme volt az adott útvonalnak. Ha egy fehérjének több útvonal tagsága volt, akkor

értelmszerűen „útvonaltagság – motívum” alapján több alkalommal került számlálásra. Ennek alapján megnéztük a mely útvonalakra mely motívum kategória volt jellemző. Az EGF-MAPK, WNT, TGF, IGF és Notch útvonalak esetében szignifikánsan gyakoribbak voltak az elől szabályozott motívumok (6. ábra). Míg a hátul szabályozott feedback típus az EGF-MAPK, TGF és Hedgehog esetében volt szignifikánsan gyakoribb az adatbázis eredeti motívum megoszlásához képest (6. ábra). A feed-forward motívumok esetében az EGF-MAPK, WNT, TGF, IGF, Notch és NHR útvonalak esetében viszont szignifikánsan ritkább volt a motívumok előfordulása (6. ábra).



6. ábra Adott útvonalban lévő motívumok eloszlása. Az x tengelyen az egyes jelátviteli útvonalakat tüntettük fel. A számok az adott jelátviteli útvonalba legalább egy fehérjével tartozó motívumokat jelölik. Az y tengelyen az adott útvonalba tartozó motívumok aránya látható. Az oszlopokon a teljes adatbázishoz mérve a szignifikancia szinteket látjuk (ld. Módszertan fejezet)

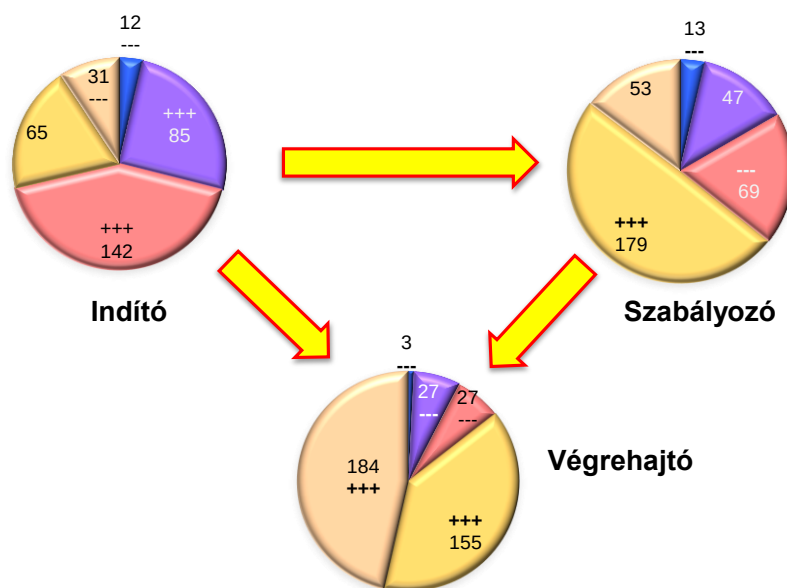
Motívumok elhelyezkedése a jelátviteli útvonalakban: a jelátviteli pozíció meghatározása

A jelátviteli fehérjéket a jelátvitel topológiájában betöltött funkció szerint az alábbi típusokba sorolja a SignaLink adatbázis: *ligandum, receptor, mediátor, kofaktor, transzkripciós faktor, egyéb*. A SignaLink adatbázisban egy fehérjének maximum két funkcióval rendelkezhet. Ezt a motívumokban szereplő fehérjéknél is alkalmaztuk. Miután azonosítottuk a hálózati motívumokat az egyes jelátviteli útvonalakban, arra voltunk kíváncsiak, hogy az egyes topológiai pozíció milyen motívumra a leginkább jellemző. A 7. ábrán az általunk vizsgált 4 fő motívum típusban láthatjuk az adott jelátviteli topológiai tulajdonság gyakoriságát az adott motívum egyes pozícióiban.

A feed-forward jelátviteli motívumban az indító fehérjék között szignifikánsan gyakoribbak voltak a receptorok és a kofaktorok. Ritkábbnak bizonyultak a transzkripciós faktorok. A szabályozó elem esetén szignifikánsan gyakoribbak a mediátor fehérjék. A receptorok, transzkripciós faktorok és kofaktorok szintje pedig szignifikánsan ritkább volt, mint ahogy az adatbázisbeli előfordulásukhoz képest várnánk. A végrehajtó fehérjék közül szignifikánsan gyakoribbak voltak a transzkripciós faktorok és a mediátorok (7/a. ábra).

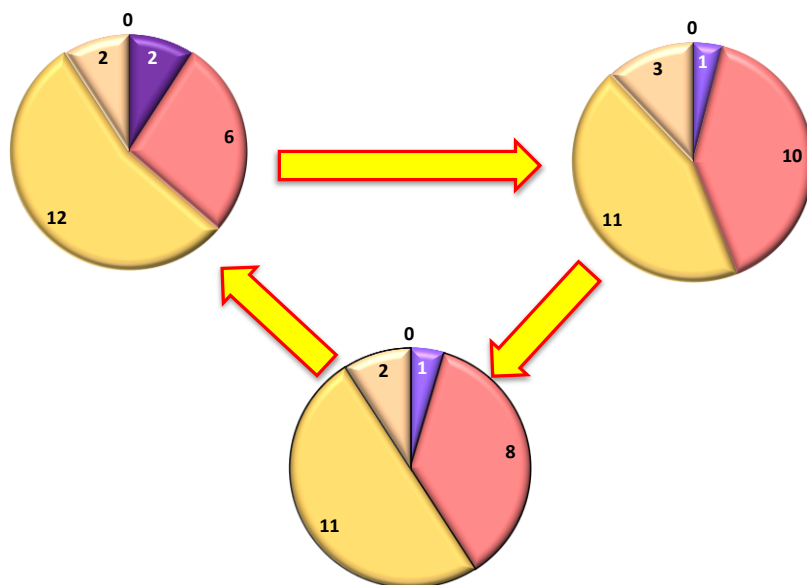
a)

Feed-forward hurok



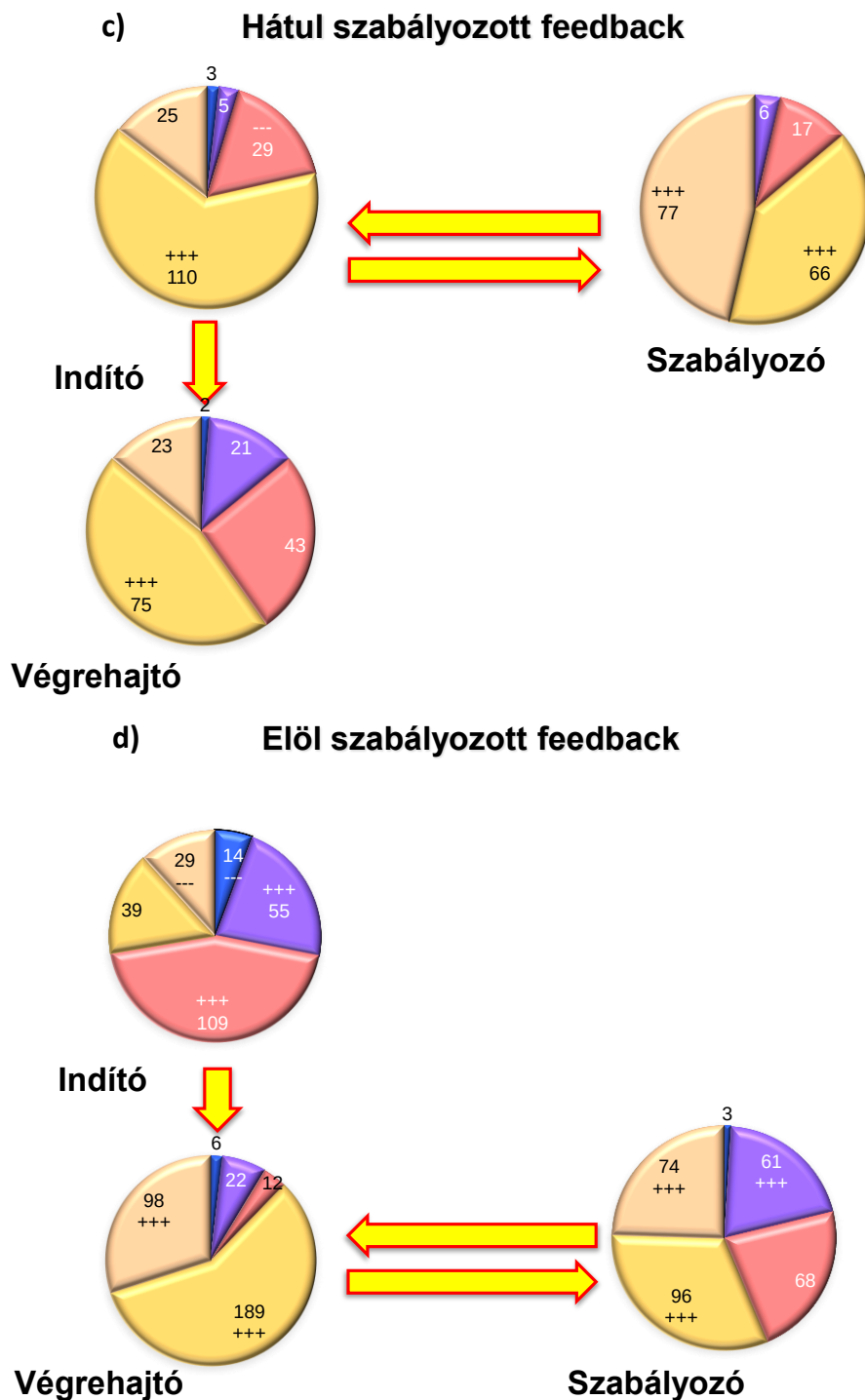
b)

Feedback kör



■ Ligand ■ Receptor ■ Kofaktor ■ Mediator ■ Transzkripció faktor

6. ábra A jelátviteli útvonalakban lévő motívumok eloszlása a jelátviteli és motívum pozíciók szerint. a) Feed-forward hurok, b) Feedback hurok (Itt nem jelöltünk külön pozíciókat mivel a feedback hurok esetén ezek egyenértékűek.) c) Hátul szabályozott feedback d) Elöl szabályozott feedback motívumok. A színek az egyes fehérjék útvonal pozícióját jelentik. A számok a fehérjék számát jelentik, amelyek az adott típusba tartoznak. A – jel jelzi, hogy az adott útvonal pozíció szignifikánsan ritkább az adott motívum adott pozíciójában, míg a + jel azt jelzi, hogy szignifikánsan gyakoribb. A – és + jelek száma a szignifikancia szintjét jelzi (ld. Módszertan fejezet).



■ Ligand ■ Receptor ■ Kofaktor ■ Mediator ■ Transzkripciós faktor

A feedback körkapcsolás motívumokból nagyon kevés volt az adatbázisban (18 darab), illetve mivel mind a 3 fehérje mind a 3 pozíciót betöltheti nem vizsgáltuk pozíció megnevezés szerint. Kvalitatívan annyi látható hogy a motívum fehérjéi minden pozícióban legalább 50%-ban mediátor fehérjék. Ez az arány jóval magasabb, mint a SignaLink adatbázisban a mediátor fehérjék aránya (18%). Statisztikai teszttel ez az állítás azért nem bizonyítható mivel a khi-négyzet teszt nem

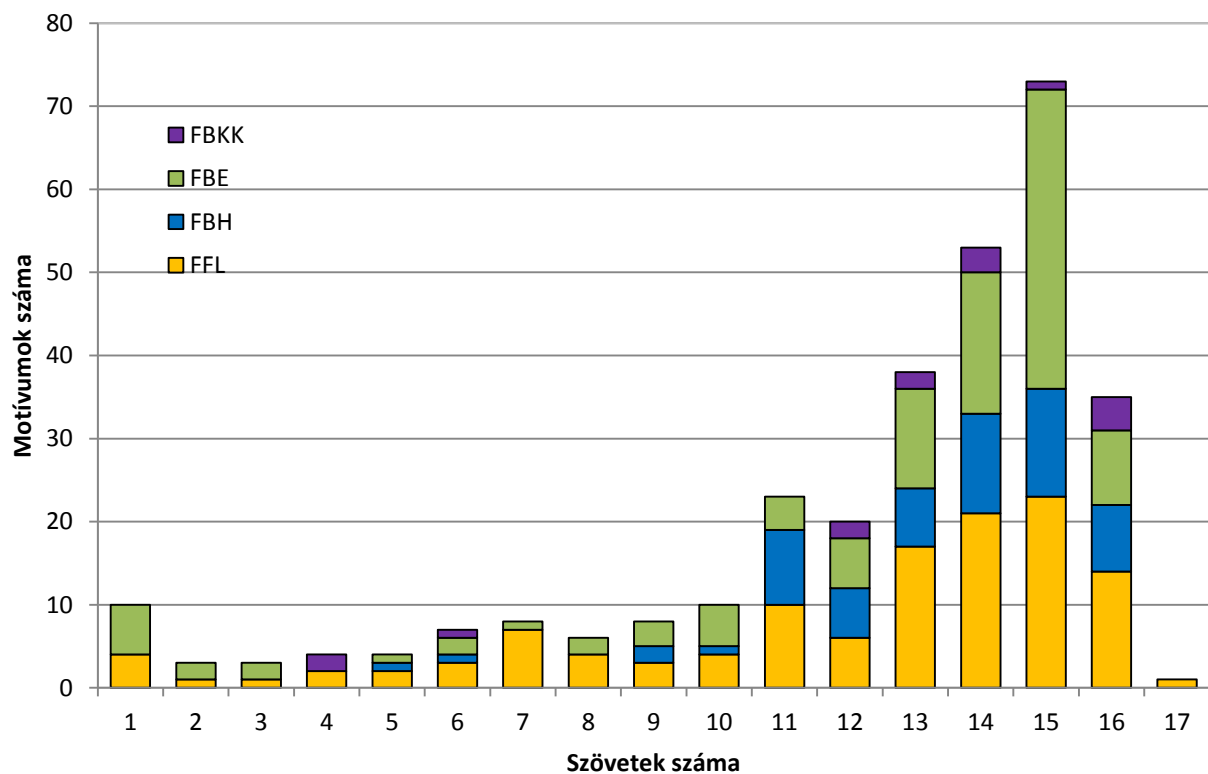
végezhető a túl kicsi mintaszám miatt. A Fischer teszt pedig Matlab programmal nem végezhető a kontroll magas értéke miatt.

A hátul szabályozott feedbackek vizsgálata során az indító és a végrehajtó fehérjék között a javítottásban kulcsfontosságú mediátorokat találtuk szignifikánsan gyakoribbnak. Ezen két pozícióban sokkal ritkább a transzkripciós faktork előfordulása. Viszont a szabályozó fehérjék között szignifikánsan gyakrabban találunk transzkripciós faktorokat a mediátorok mellett. (7/c. ábra)

Az elől szabályozott feedbackek vizsgálata szerint az indító fehérjék között a kofaktoroknak és a receptoroknak szignifikánsan magasabb volt az aránya. A végrehajtó fehérjék között szignifikánsan több a mediátor és a transzkripciós faktorok aránya. A szabályozó fehérjék között egyaránt találunk mediátorokat, transzkripciós faktorokat és kofaktorokat az adatbázisbeli előfordulásuknál jóval gyakrabban. (7/d. ábra)

Motívumok szöveti expressziója

Elemzésünkben arra voltunk kíváncsiak, hogy az emberi szervezetben milyen szövetekben expresszálódnak az általunk talált jelátviteli hálózati motívumok. Az összes motívumkategóriát megvizsgálva azt találtuk, hogy vannak általánosan előforduló motívumok, amelyek 13-16 szövet típusban előfordulnak, illetve szövetspecifikus motívumok, amelyek 1-5 szövettípusban fordulnak elő. (7. ábra)



7. ábra Szöveti expressziók eloszlása. A rövidítések az egyes szövet típusokat jelentik. FBKK: körkapcsolt feedback, FBE: elől szabályozott feedback, FBH: hátul szabályozott feedback, FFL: feedforward hurok.

Jelátviteli motívumok megoszlása az útvonalakon belül és az útvonalak közötti cross-talk motívumokban

Elemzésünkben ezt követően arra voltunk kíváncsiak, hogy a talált jelátviteli motívumoknak milyen megoszlása van egy adott jelátviteli útvonalon belül és az útvonalak közötti cross-talkokban. Az elemzést a 8. ábrán láthatjuk, amelyet kutatócsoportunk által kifejlesztett mátrix ábrázoló programmal készítettük. Az ábrán a mátrix soraiban a kiindulási útvonalak, míg a mátrix oszlopaiban a cél útvonalak szerepelnek. Ennek megfelelően a főátló az azonos útvonalon belüli kapcsolatokat jelzi. A mátrix színezésén két színskálát találunk. Első egy sárga-piros skála, amelyen azt ábrázoljuk, hogy mennyire gyakori a kapcsolat a két jelátviteli útvonal között, a viszonyítási alapunk az összes azonos motívumtípusban található kapcsolat volt. Sárgább a mátrix négyzet akkor, ha ritka volt az előfordulása ebben a pozícióban az összes kapcsolathoz képest, piros, ha gyakoribb az adott pozíciók között. A másik ábrázolásunk egy szürke-fehér színskála, amelyen azt mutatjuk be, hogy a kapcsolat miért nem jelenik meg az adott két pozíció között. Fehér, ha jelen van az adatbázisban, de nem jelenik meg az adott két útvonalat összekötő motívum pozíció között, szürke, ha nem létezik az adatbázisban. Mivel irányított kapcsolatokról beszélünk, és nem létezik minden pár esetében oda-vissza kapcsolat, ezért az ábrák az átlójuk mentén nem tükrözhetőek (8. ábra). A feedback körök elemzését kihagytuk mivel a pozíciók itt is megcserélhetőnek tekinthetők.

A feed-forward motívumban a JAK/STAT jelátviteli útvonal volt gazdagabb (6. ábra). A JAK/STAT útvonal kapcsolataiból szignifikánsan több a cross-talk a motívumban a motívum többi útvonalának kapcsolataihoz képest. Ha megfigyeljük a 8. ábrát, láthatjuk, hogy az indítóból a szabályozó pozícióba mutató kapcsolatok a JAK/STAT cross-talkok nagyobb részét érintik. A JAK/STAT, NHR és Hedgehog útvonal között az egyes motívumpozíciókban látványos különbségeket láthatunk. Az ábráról leolvasható az is hogy motívumpozíciótól függetlenül a Notch útvonal fehérjei csak a WNT jelátviteli útvonallal alkotnak cross-talkot.

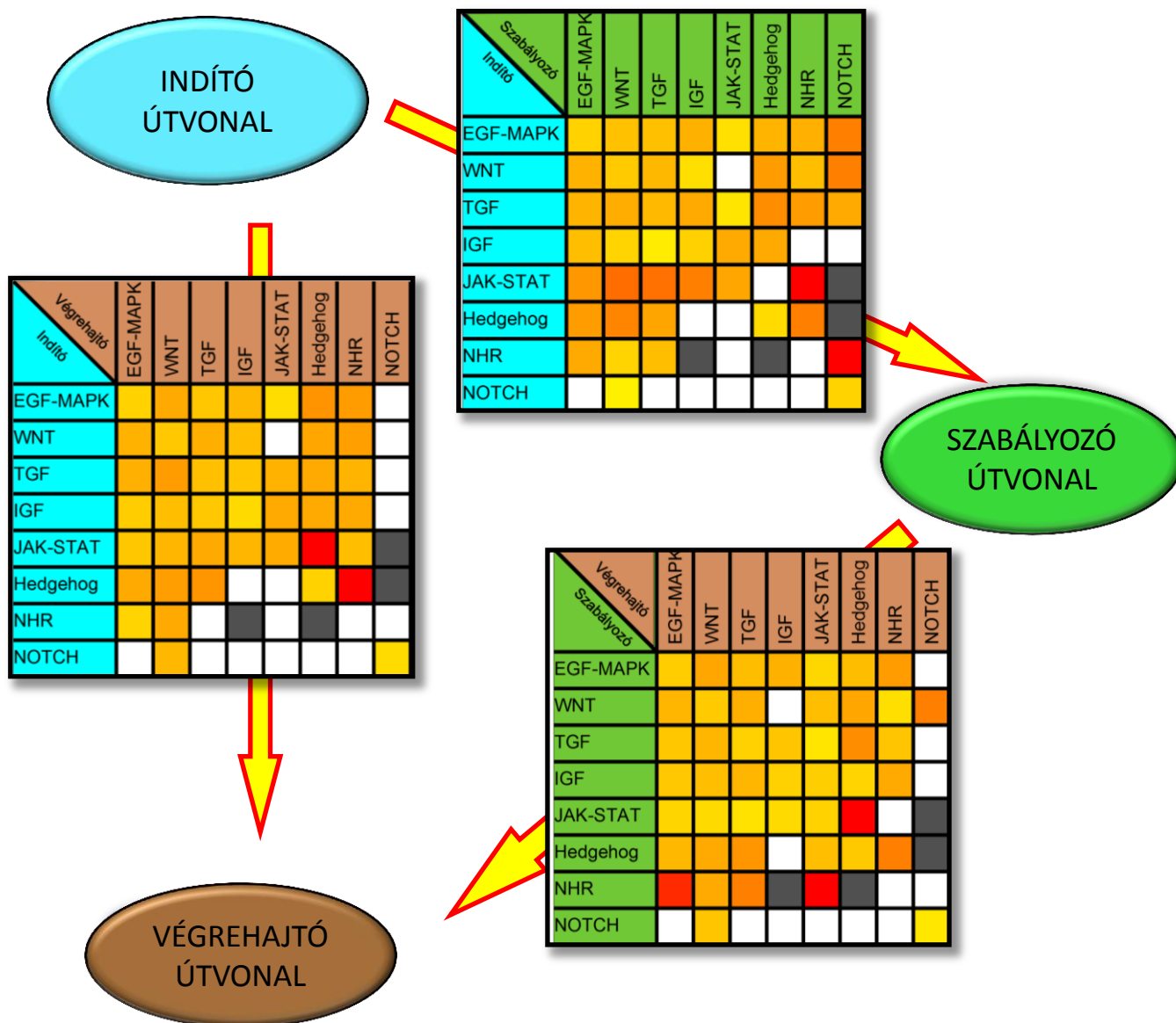
Az elől illetve hátul szabályozott feedbacknél jellegzetes mintázatra lehetünk figyelmesek az egyes motívumpozíciók esetén. Mindkét motívumban elsősorban a jelterjedést jelentő indító végrehajtó kapcsolatban figyelhetők meg a cross-talkok.

Az elől szabályozott feedback esetén meglepő hogy sem a Hedgehog sem az IGF jelátviteli útvonalban nem található saját útvonalon belüli oda vissza kapcsolat. Ez azt jelenti, hogy a fenti jelátviteli útvonalakban szereplő elől szabályozott feedback motívumok valamennyien cross-talk motívumok. Fontos megjegyezni, hogy az NHR útvonalnak szinte valamennyi cross-talkja jelentkezik a motívum indító és végrehajtó pozíciója között.

A hátul szabályozott feedback motívum kapcsolatainak 80%-a cross-talk motívum. Az útvonalak közül a JAK-STAT útvonal saját magával alkotott kapcsolataira érdemes felhívni a figyelmet. Látható,

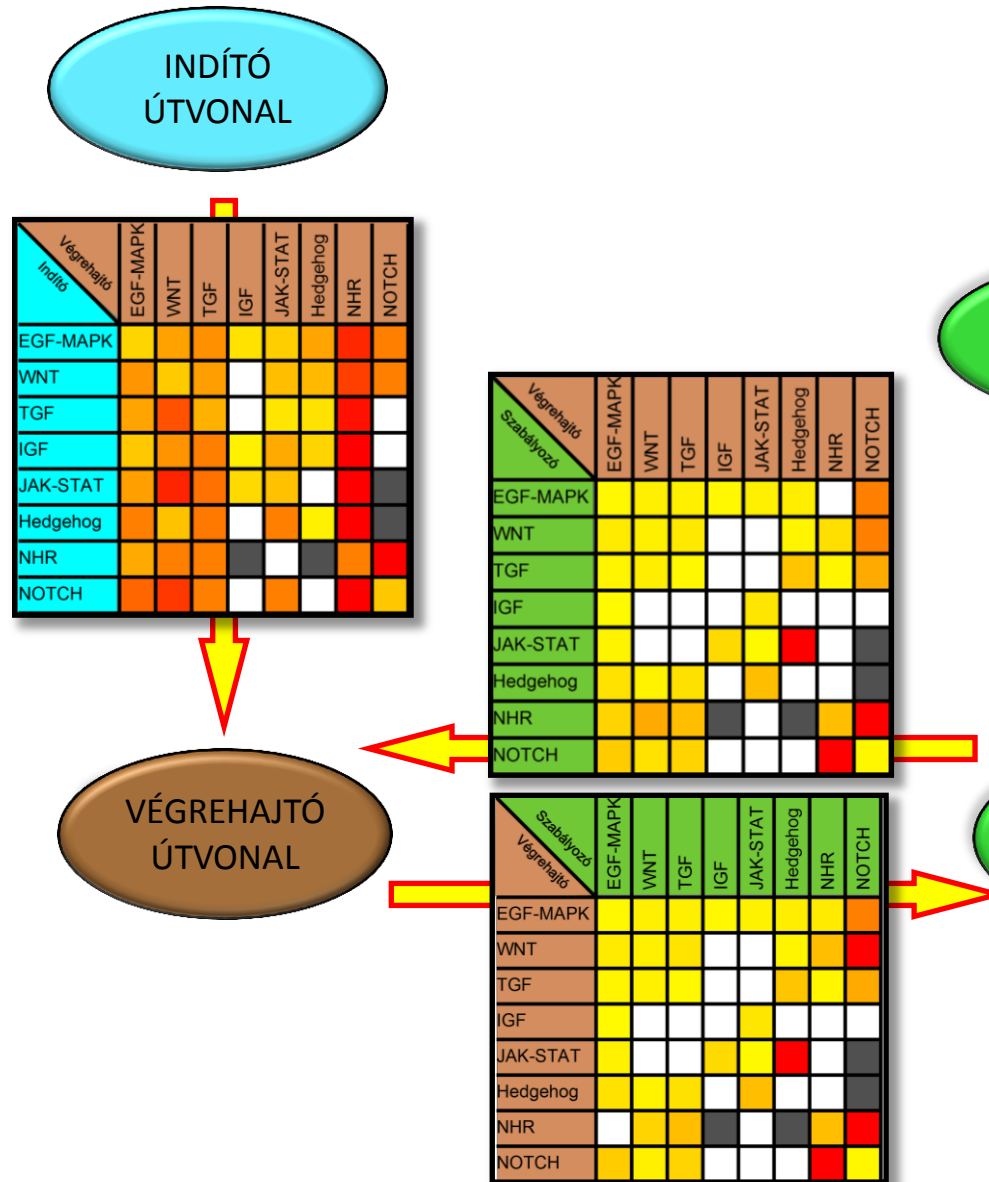
hogy nagyon sok kapcsolat ezen az útvonalon belül részt vesz az hátul szabályozott feedbackek kialakításában. A Notch útvonalban a szabályozó elemnél mindkét irányba közel az összes cross-talk kapcsolat megjelenik.

a) Feedforward kör

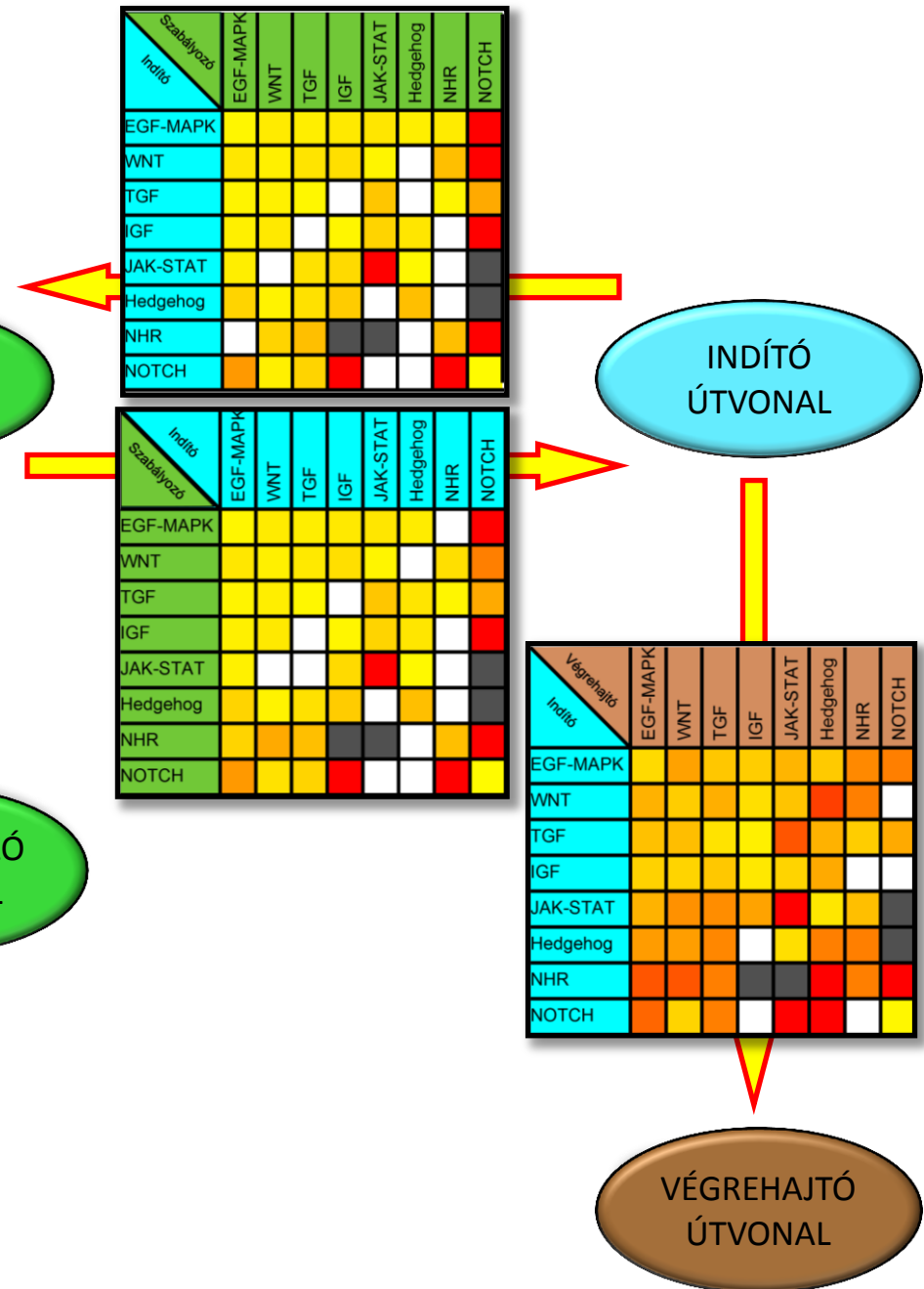


8. ábra Az egyes motívumtípusokban a jelátviteli útvonalak megoszlása. Az egyes mátrixok jelzik a kapcsolatok gyakoriságát a két motívumpozícióban lévő fehérje között. „x” tengelyen az kiinduló, „y” tengelyen a végződő jelátviteli útvonalak vannak. Jelzési skála: sárga-piros: kapcsolat előfordulása a motívumban; fehér: nem fordult elő a kapcsolat a motívumban szürke: nem létezik ilyen irányú útvonalak közötti kapcsolat a Signalinkben **a) feed-forward** Következő oldalon: **b) elől szabályozott feedback** c) **hátul szabályozott feedback**.

b) Elöl szabályozott feedback



c) Hátszabályozott feedback



Motívumok orvosi vonatkozásai

Elemzésünkben ez után megvizsgáltuk, hogy találunk-e eltérést a rákban előforduló fehérjék és a motívumokban pozíció szerint megjelenő fehérék között. Vizsgálatunkban a rák kialakulása szempontjából két fontos fehérje állapotot vettünk figyelembe. Egyrészt vizsgáltuk a rák kialakulásáért felelős ún. *driver mutációkat*, amelyek indító lépései egy malignus elfajulásnak. Másrészt vizsgáltuk a *malignizálódásért felelős mutációkat*. Vizsgálatunkhoz a motívumok közül a feedback körkapcsoláson kívüli össze motívumot figyelembe vettük, és összevetettük a motívumokon belül a többi fehérjével. E két tulajdonság vizsgálata azt mutatta, hogy az indító pozícióba tartozó fehérjék között szignifikáns ritkábban fordulnak elő a rákot okozó driver és malignitást okozó másodlagos mutációk ($p < 0,001$). A szabályozó pozícióban a malignitást okozó mutációk szignifikánsan gyakoribbak ($p < 0,001$), a driver mutációknak pedig enyhén nagyobb a gyakorisága ($p < 0,05$). A végrehajtó pozícióban a driver mutációk voltak szignifikánsan gyakoribbak ($p < 0,001$).

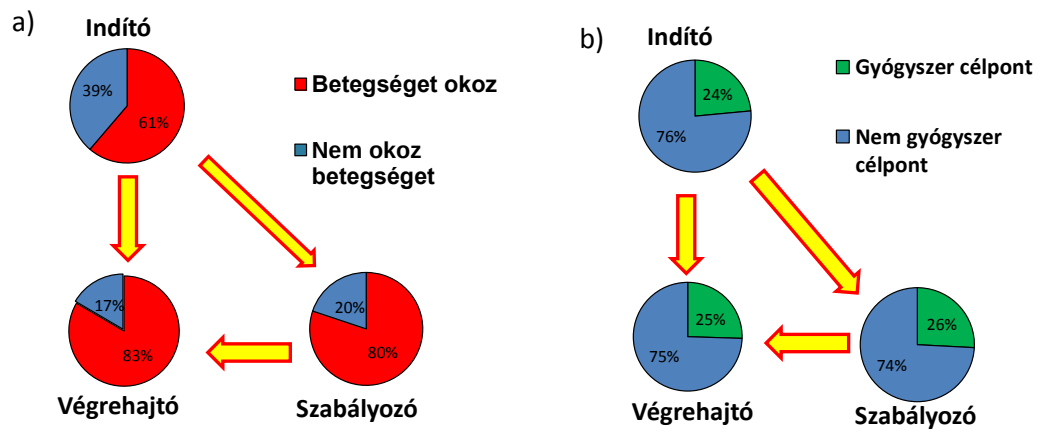
Megvizsgáltuk hogy ammotívumok fehérjei között milyen arányban találunk olyanokat melynek génjének mutációját leírták betegség okozásában. Azt találtuk hogy a motívumok 94% tartalmazott elgalább egy ilyen fehérjét. Ezen géneknek megoszlása inkább a szabályozós és a végrehajtó pozícióra volt jellemző ($p < 0,001$ khi négyzet teszt).

Motívumok gyógyszerészeti elemzése

Ugyan szinte valamennyi általunk megtalált motívum tartalmaz olyan gént melynek mutációja betegséget okozhat a motívumoknak csak az 55%-ra hat gyógyszer. A motívumokon belül pozíció szinten nincsen különbség a gyógyszercélpontok megoszlásában.

Ezen általános megállapításoktól a feed-forward motívum részben eltér (9. ábra). Azt találtuk, hogy feed-forward motívumok esetében főleg a motívumok szabályozó pozíciójában lévő fehérjében van betegséggén. E mellett az indító és a végrehajtó pozíciókban a betegséggének előfordulása szignifikánsan ritkább. Viszont a gyógyszercélpont vizsgálatok azt mutatták, hogy a feed-forward motívumok esetében a gyógyszercélpontok előfordulása szignifikánsan nem tér el, egyik pozíció esetében sem. Tehát lényegében nincs különbség az indító, szabályzó illetve végrehajtó pozíciók között, ahogy az összes többi motívumban sincs.

Továbbá szerettünk volna rámutatni, hogy a talált hálózati motívumok milyen eséllyel lehetnének jó gyógyszercélpontok. Ennek vizsgálatához relevanciaértékeket számítottunk, amely alapján azt találtuk, hogy minden motívumkategóriánként a szabályzó pozícióban lévő fehérjék célzása lenne indokolt ($p < 0,001$ Kolmogorow-Smirnow teszt illetve Wilcoxon rang próba).



9. ábra Motívumok betegség-gén tartalma és gyógyszercélpont vizsgálata. Az ábra a feedforward motívumokat mutatja be. Az a.) részén az látható, hogy szabályzó pozícióban szignifikánsan több betegség-gén van, mint indító vagy végrehajtó pozícióban. Míg a b.) része, hogy a gyógyszercélpont vizsgálatoknál nincs eltérés a 3 pozíció között.

DISZKUSSZIÓ

Az általunk vizsgált SignaLink emberi jelátviteli hálózatban összesen 676 motívumot sikerült azonosítanunk. Ezek a motívumok 8 jelátviteli útvonalban vagy azok között voltak megtalálhatóak. Annak érdekében, hogy megismerjük a hálózati motívumok rendszerszintű tulajdonságait, szerepét és jelentőségét a jelátviteli hálózatban hat elemzést végeztünk az azonosított motívumokon: (1) Összehasonlítottuk az egyes útvonalakon belül előforduló motívumokat; (2) Megvizsgáltuk, hogy az egyes motívumtípusok adott pozícióiban (indító, végrehajtó, szabályozó) a különböző jelátviteli topológiai pozíciójú fehérjék (pl.: receptor, transzkripciós faktor) előfordulását; (3) Megnéztük, hogy az egyes motívumok milyen szövetekben exprezálódnak; (4) Továbbá elemeztük az egyes motívumtípusok adott pozícióiban az útvonalak előfordulását, valamint a motívumokon belüli kapcsolatokban (pl.: indító-végrehajtó; indító-szabályozó) a cross-talkok gyakoriságát; (5) Megvizsgáltuk, hogy a rákot vagy malignitást okozó mutációk milyen előfordulással vannak jelen a motívumokban (6) Végezetül megnéztük a motívumok gyógyászati relevanciáját, illetve, hogy jelenleg mennyi motívum fehérje ellen létezik gyógyszer.

Az egyes jelátviteli útvonalakban a 4 vizsgált motívumtípus közül az EGF/MAPK útvonalra az elől és hátul szabályozott feedbackek voltak a leginkább jellemzőek. Ennek oka valószínűleg az útvonalra igen jellemző, egymást kölcsönösen befolyásoló kinázok és foszfatázok ⁽¹⁶⁾. A Notch útvonalban kiemelkedően magas az elől szabályozott feedbackek mennyisége. Ez az útvonal alapvetően különleges felépítéséből fakad. Az útvonalban minden szabályozó elem a különböző NOTCH receptor izoformákra hat, amelyek továbbviszik a jelet a sejtmagba. Kiemelendő még, hogy a feed-forward hurkok csak a JAK/STAT útvonalra voltak jellemzők, ahol a névadó JAK és STAT fehérjék, valamint a különböző citokin receptorok alkotnak hatékony aktiváló motívumot ⁽¹⁸⁾.

A motívumok jelátviteli topológiai pozíció szerinti elhelyezkedésének elemzését 4 motívum típus szerint külön végeztük. A korábbi irodalmi adatokkal összhangban a feed-forward motívum kiindulási elemei elsősorban a receptorok voltak. Köztes, szabályozó elemként a jelet megváltoztató, amplifikáló vagy gátlássá alakító fehérjéket találunk. Például: a GSK3B-SMAD3-JUN motívum esetén a SMAD3 a szabályozó fehérje, míg az ERK1-Raf1-MEK1 motívumnál, a Raf1. A végrehajtó fehérjék között a jelátvitel továbbvivőiként mediátorok, illetve végállapotként transzkripciós faktorok szerepelnek. A feed-forward koherens motívum lehetővé teszi, hogy rövid impulzusokról is értesüljön az adott végponti fehérje, komolyabb reakció nélkül vagy minimál válaszreakcióval ⁽¹⁾. Míg hosszabb impulzus esetén pedig teljes kisüléssel, maximális információ továbbadással, esetleg maximális transzkripcióval válaszolhat ⁽¹⁾. A feed-forward inkoherens motívum jelentősége a jel érzékenység késésen alapul. Ez azt jelenti, hogy az indító fehérje a közvetlen úton egy gyors választ indít el, ami

azonnali jeltovábbításhoz, illetve transzkripcióhoz vezet. Viszont folyamatos impulzus esetén emellett egy több fehérjét tartalmazó úton egy lassabb választ is elindít, amely felülszabályozza az előző folyamatot ⁽¹⁾. Ennek szerepe van a receptorok sejtfelszínéről való internalizációban, a receptor autoregulációban, és szerepet játszhatnak a gyógyszerekkel szembeni rezisztencia kialakulásban is ⁽¹⁾.

A hátul szabályozott feedback motívumot úgy is értelmezhetjük, mintha a jel két irányba menne tovább a forrás fehérjétől, de közvetlenül csak az egyik irányból kap visszajelzést. Ezért fordulnak elő a jelet kiadó fehérjék között a mediátorok nagy arányban. A közvetlenül visszaható fehérjék között a transzkripciós faktorok nagy száma a transzkripció finom beállítását célzó mechanizmust sejtet. Ezen fehérjék közé például a SMAD3 tartozott.

Az elől szabályozott feedback motívumoknál az indító pozíció mellett a szabályozó helyen is szignifikánsan gyakoribbak a receptorok. Ezért ez a motívum feltehetően a receptorok szabályozásában fontos. A kiindulási kofaktoroknak a nagy száma is egyrészt a receptorokat (pl.: NOTCH1 receptor szabályozói (MAML, LFNG, stb.) másrészt a mediátor fehérjéket szabályozzák (pl.: az ERK1 szabályozó scaffold MORF1).

A motívumok szöveti megjelenésének vizsgálata során az azonosított motívumok 55%-áról találtunk szöveti adatokat. Az elemzés segítségével két csoportra tudtuk osztani a motívumokat. Egyrészt megállapítható volt egy szinte valamennyi szövetben megjelenő *ubiquiter/house-keeping* típus, másrészt speciális, mindössze egy vagy néhány szövetben előforduló motívumokat is találtunk. Ezeket a motívumokat részletesen megvizsgálva kiderült, hogy az immunvédekezés szempontjából jelentős interleukinok és azok receptorai alkotják (IL28, 22, 29 és receptorai).

A négy fő motívumtípus adott pozícióiban (indító, szabályozó, végrehajtó) elemeztük, hogy leginkább milyen útvonalak fordulnak elő, valamint azt, hogy az egyes motívum-kapcsolatokban (pl.: indító-végrehajtó; indító-szabályozó) mi a cross-talkok gyakorisága és jellege. A jelátviteli útvonalak vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a feed-forward körön belül a Notch és a JAK/STAT útvonal elsősorban saját útvonalukon belül alkot kapcsolatot. Ez az útvonalak belső felépítésének következménye, amely szükségessé teszi az erős belső szabályozást. Mind az elől, mind a hátul szabályozott motívumokra jellemző, hogy a legtöbb motívum-kapcsolat cross-talk volt. Ez egy újabb bizonyíték arra, hogy a biokémiai mechanizmusukban és evolúciójukban különböző útvonalak nagyon szoros, szabályozó és irányító kapcsolatban állnak egymással. A kutatócsoportunk korábbi eredménye szerint bármely két útvonal között sűrű cross-talk kapcsolatok találhatók ⁽¹⁰⁾. Az itt bemutatott eredményeink rámutatnak a cross-talkok rendszerszintű szerepére az útvonalak koordinált, egymás közötti szabályozásában. Az Inzulin és a Hedgehog jelátviteli útvonalban fontos megjegyezni, hogy az elől szabályozott feedbackek valamennyi tagja cross-talk.

A jelátviteli hálózatban lévő motívumok, különösen a cross-talk motívumok jelátviteli és hálózatos elhelyezkedésük és szerepük miatt fontosak lehetnek a különböző betegségek kialakulásában. A motívumokban résztvevő fehérjék tumorbeli mutációs előfordulása alapján úgy gondoljuk, hogy az ezen fehérjéket kódoló génekben bekövetkező mutációknak fontos szerepe van a jelátviteli hálózat patológiás áthuzalozásában. Azt találtuk, hogy a motívumok indító pozíciójába tartozó fehérjék között szignifikáns ritkábban fordulnak elő a driver és a malignitást fokozó mutációk. Különösen a JAK/STAT, IGF és TGF útvonal mutáció fordulnak elő itt ritkábban. Ezek főleg tumorszuppresszorként ismert útvonalak. A végrehajtó pozícióban szignifikánsan gyakoribbak voltak a driver mutációt szenvedő fehérjék, különösen a sok onkogént tartalmazó EGF/MAPK és WNT útvonalból. Érdekes módon a szabályozó pozícióban lévő fehérjék között különösen a malignitást fokozó mutációk voltak szignifikánsan gyakoriak. Ezek az eredmények összhangban vannak a tumorigenezis során bekövetkező indító és rendszerszintű folyamatokkal. A tumoros sejt driver mutációk következtében először függetlenedik a bejövő növekedési faktor jelektől, valamint a kikapcsolja a DNS javító, ún. gatekeeper mechanizmusokat ⁽¹⁹⁾. Mindezt a „legkönnyebben” a végrehajtó pozícióban lévő elemek megváltoztatásával lehet elérni. A driver mutációk hatására folyamatos osztódás és patológiásan jó indulatú daganat alakul ki. A rosszindulatú, agresszív tumor kialakulásához a jelátvitel rendszerszintű megváltozására van szükség ⁽²⁰⁾. Az így kialakuló legfőbb daganatbeli tulajdonságok a korlátlan szaporodó képesség, az érésképzés, az invazivitás és metasztatizálás, a növekedés ellenes faktorok elkerülése és az apoptózis indukáló faktorok jelének elterelése ⁽¹⁹⁾. Ezen állapotok eléréséhez szükség van a jelátviteli rendszer áthuzalozásra, ahogy arról például a prosztata rák esetében beszámoltak ⁽²¹⁾. A jelátviteli hálózat áthuzalozása leghatékonyabban a jelterjedést közvetlenül befolyásoló, a motívumok szabályozó pozíciójában lévő elemek mutációján keresztül érhető el. Ezt erősíti, hogy a vizsgált jelátviteli fehérjék között itt voltak egyedül szignifikánsan gyakoribbak a másodlagos, malignitást fokozó mutációk.

A daganatokbeli szerepük miatt a cross-talk motívumok szabályozásában résztvevő fehérjék fontos gyógyszer-célpontjelöltek lehetnek. Azonban hálózati motívumok elemeire nehéz megfelelő gyógyszer-molekulát tervezni ⁽²²⁾. Láthattuk, hogy a motívumok elemeinek mindössze fele gyógyszer-célpont. A jövőben talán lehetőség lesz egyes interakciós felszínre szelektív gyógyszer-molekulákat tervezni, amelyek csak egy adott motívumban változtatja meg az adott jelátviteli fehérje funkcióját. Ehhez azonban még sok adatra és elemzésre van szükség.

A SignaLink adatbázis 2012 tavaszán elkészülő, új verziója már tartalmazni fog transzkripcionális kapcsolatokat is. Így később lehetőségünk lesz elvégezni olyan motívum-kereső vizsgálatokat, amelyek az útvonalak közötti cross-talk kapcsolat transzkripcionális vonatkozásait is

meg tudjuk majd vizsgálni, illetve amelyek a mikro RNS-ek szabályozó szerepét is be tudjuk majd építeni a jövőbeni hálózati motívum-elemzéseinkbe.

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS:

A szerzők szeretnék megköszönni témavezetőik hathatós segítségét és támogatását. Szeretnék megköszönni a Semmelweis Egyetemen működő Link csoport és az Eötvös Lóránd Tudomány Egyetemen működő NetBiol Hálózatbiológiai csoport valamennyi tagjának a hasznos hozzászólásokat, kritikákat. Fazekas Dávidnak pedig az informatikiai munkában nyújtott segítséget.

HIVATKOZÁSOK JEGYZÉKE

1. Alon U. Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8(6):450-461.
2. Seshasayee ASN, Bertone P, Fraser GM, Luscombe NM. Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Curr. Opin. Microbiol.* 2006;9(5):511-519.
3. Cloutier M, Wang E. Dynamic modeling and analysis of cancer cellular network motifs. *Integr Biol (Camb).* 2011;3(7):724-732.
4. Winkler DA. Network models in drug discovery and regenerative medicine. *Biotechnol Annu Rev.* 2008;14:143-170.
5. Macía J, Widder S, Solé R. Specialized or flexible feed-forward loop motifs: a question of topology. *BMC Syst Biol.* 2009;3:84.
6. Novák B, Vinod PK, Freire P, Kapuy O. Systems-level feedback in cell-cycle control. *Biochem. Soc. Trans.* 2010;38(5):1242-1246.
7. Le D-H, Kwon Y-K. The effects of feedback loops on disease comorbidity in human signaling networks. *Bioinformatics.* 2011;27(8):1113-1120.
8. Borisov N, Aksamitiene E, Kiyatkin A, et al. Systems-level interactions between insulin-EGF networks amplify mitogenic signaling. *Mol. Syst. Biol.* 2009;5:256.
9. Kestler HA, Wawra C, Kracher B, Köhl M. Network modeling of signal transduction: establishing the global view. *Bioessays.* 2008;30(11-12):1110-1125.
10. Korcsmáros T, Farkas IJ, Szalay MS, et al. Uniformly curated signaling pathways reveal tissue-specific cross-talks and support drug target discovery. *Bioinformatics.* 2010;26(16):2042-2050.
11. Joshi-Tope G, Gillespie M, Vastrik I, et al. Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D428-432.
12. Kandasamy K, Mohan SS, Raju R, et al. NetPath: a public resource of curated signal transduction pathways. *Genome Biol.* 2010;11(1):R3.
13. Ogata H, Goto S, Sato K, et al. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(1):29-34.
14. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-2504.
15. Ferro A, Giugno R, Pigola G, et al. NetMatch: a Cytoscape plugin for searching biological networks. *Bioinformatics.* 2007;23(7):910-912.
16. Kondoh K, Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1773(8):1227-1237.
17. Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007;19(2):176-184.
18. Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem. Pharmacol.* 2006;72(11):1538-1546.
19. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
20. Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Lankelma J. Cancer: a Systems Biology disease. *BioSystems.* 2006;83(2-3):81-90.
21. Papatsoris AG, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. The power and promise of "rewiring" the mitogen-activated protein kinase network in prostate cancer therapeutics. *Mol. Cancer Ther.* 2007;6(3):811-819.
22. Stelling J, Sauer U, Szallasi Z, Doyle FJ 3rd, Doyle J. Robustness of cellular functions. *Cell.* 2004;118(6):675-685.