

A transzkriptóma vizsgálata multifaktoriális bőrbetegségekben

Dr. Manczinger Máté

Témavezetők:

Prof. Dr. Kemény Lajos PhD, DSc és Dr. Lakatos Lóránt PhD

PhD Tézis

Szegedi Tudományegyetem
Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

2016

Bevezetés

A leggyakoribb betegségek kialakulásában számos endogén és környezeti tényező játszik szerepet. A kiváltó faktorok hatására több különböző gén expressziója, így több fehérje mennyisége megváltozik. Ezek összessége okozza a betegség fenotípusát, ezért nem elegendő csak egy gént vagy fehérjét vizsgálni, az egész rendszert figyelembe kell venni ahhoz, hogy megértsük a betegségek kialakulásának folyamatát és hatékony gyógyszereket fejleszthessünk ki. Dolgozatomban két multifaktoriális bőrbetegség vizsgálatával foglalkozom: a vulvovaginális candidiasissal (VVC) és a pikkelysömörrel. Az előbbiben *in vitro* modelleztük a betegséget és RNS szekvenálást végeztünk annak érdekében, hogy a gomba virulencia faktorait azonosítani tudjuk. Az utóbbiban microarray meta-analízis és hálózatanalízis segítségével vizsgáltuk a pikkelysömört. A vizsgálat eredményeként a betegség kialakulásában potenciálisan fontos fehérjéket azonosítottunk és a terápiában feltehetően használható gyógyszereket találtunk.

A mikrobiom szerepe az utóbbi időben a biomedikális kutatások középpontjába került. Mind egészséges állapotban, mind betegségek kialakulásában fontos szerepet tulajdonítanak a kommenzális flórának. A *Candida albicans* (*C. albicans*) egy dimorf gomba. Képes sarjadzó formában növekedni, mely nem patogén, a kommenzális flóra tagja és megtalálható a bőrön és a nyálkahártyák felszínén. Emellett a patogén hifás formájában betegségeket okoz. A gomba számos módon alkalmazkodott az emlősök bőrén és nyálkahártyáin lévő körülményekhez. Bármilyen körülményt számára kedvezőtlené teszi, a hifás növekedést indukálja. A hifás forma a sejtekbe penetrál, azokat elpusztítja. Emellett a sarjadzó forma képes fagocitózist indukálni invazív molekulák segítségével. Ebben az esetben a fagocitómán belül indukálódik a hifás növekedés, mely a sejtek lízisét okozza.

A gomba két formájának elkülönítésében fontos szerepet játszik a természetes immunitás. Molekuláris mintázatok felismerésére alkalmas receptorok felismerik a gomba felszínén lévő glikoproteineket. A gomba két formájában a sejtfal felépítése különböző, ugyanis a hifás növekedés kezdetekor a sejtfal is átépül. A hifás forma kifejezetten immunogén, míg a sarjadzó forma kevésbé indukál immunválaszt. Az adaptív immunválasz szerepe a *C. albicans*-szal szembeni védekezésben kevésbé tisztázott. Néhány vizsgálat a gombára specifikus antitestek jelenlétét igazolta a humán szérumban. Számos vizsgálat alapján a sejtes immunválasz fontosabb szerepet játszik a gomba elleni védekezésben, mint a humorális.

Érdekes megjegyezni, hogy míg az adaptív immunválasz szerepe bizonyított a tápcsatorna candidás fertőzéseiben, csak a természetes immunitás szerepét feltételezik VVC-ban.

Hatalmas mennyiségű adat áll rendelkezésre a humán mikrobiommal kapcsolatban. A mikrobák genetikai, genomikai, metagenomikai, epigenomikai, transzkriptomikai, proteomikai, metabolomikai és evolúciós analízise a modern kutatás egyik legfőbb eszközévé vált. A nagy áteresztő képességű szekvenálás lehetővé tette teljes genomok, epigenomok, transzkriptómák és a mikrobák összetételének vizsgálatát, melynek eredményeként a virulencia faktorok és ezáltal potenciális gyógyszercélpontok hatékonyabb azonosítása vált lehetővé.

A pikkelysömör az egyik leginkább vizsgált bőrbetegség. Több, mind 39000 találatot kapunk a “psoriasis” keresőszóra a PubMed adatbázisában és ez a szám napról napra növekszik. A betegek bőrén hyperkeratotikus, vaskos plakkok láthatók. Leginkább a könyökök, térdék és a keresztcsont környéke érintett, de a hajas fejbőrön és a teljes bőrfelületen megjelenhet a betegség. Létrejöttében genetikai faktorok és környezeti tényezők egyaránt szerepet játszanak. Eddig összesen 36 lókuszt azonosítottak a genomban, mely pikkelysömörré hajlamosít. Emellett számos gyógyszer, a dohányzás, a stressz, a bőr sérülésének, a streptococcus fertőzés és hormonális változások szerepét is feltételezik a kialakulásában. A pikkelysömör egy immunmediált betegség, melynek pathomechanizmusában számos immunsejt és citokin szerepet játszik. Autoimmun hátterét is valószínűsítik, bár konzisztens autoantigént még nem sikerült azonosítani. A pikkelysömörös betegeknek nagyobb az esélyük a metabolikus szindróma kialakulására és ez a rizikó növekszik a bőrelváltozások súlyosságával. Mindkét betegség hátterében immunológiai folyamatok húzódnak, emellett ismertek lókuszek a genomban, melyek mindkettőre hajlamosítanak, például a CDKAL1. A kórkép egyik ugyancsak fontos jellemzője a keratinocyták túlzott proliferációja, amely a pikkelyek képződéséért tehető felelőssé.

A betegség kezelésére számos lehetőség van. A terápiás javallatok függenek a betegség súlyosságától, a társbetegségektől és a korábbi terápiás anamnézistől. A kezelés történhet helyileg, szisztémásan és UV fényel. A helyi kezelések közé tartoznak a szteroid, D3 vitamin, dithranol, retinoid, vagy calcineurin inhibitor tartalmú externák, míg a leggyakrabban használt szisztémás kezelések a methotrexát, calcineurin inhibitorok és a biológiai terápiák. A kezelésekre eltérő betegek eltérő módon reagálnak. Vannak terápia-rezisztens esetek, sőt, előfordul, hogy a kezelés hatására az állapot romlását tapasztaljuk. Ez is azt mutatja, hogy a pikkelysömör sokkal komplexebb annál, mint amennyit eddig ismerünk róla és elengedhetetlen a betegség rendszerbiológiai vizsgálata. Ehhez segítséget nyújtanak az ún. “omics” adatok. Az

adatok bioinformatikai feldolgozása, megfelelő szűrése és normalizálása viszont fontos ahhoz, hogy a fals eredményeket elkerüljük. Egy valid in silico modell megalkotása csak ezek után lehetséges.

A génexpresszió tartós változása felelős különböző betegségek fenotípusának kialakulásáért és fenntartásáért. A DNS microarray egy széles körben használt módszer a transzkriptóma vizsgálatára. Ma már különböző splicing variánsok, nukleotid polimorfizmusok, fúziós gének és transzkripciós faktorok kötődési helyének vizsgálata is lehetővé vált a módszer továbbfejlesztésével. A microarray viszonylag olcsó és számos szoftver és algoritmus áll rendelkezésre az adatok feldolgozására in silico. A módszer hátránya, hogy új mRNS-ek azonosítására nem alkalmas, mivel előre meghatározott szekvenciák jelenlétét detektálja csak. A pikkelysömörrel kapcsolatban több microarray vizsgálat eredménye elérhető. Ezek meta-analízise lehetőséget ad arra, hogy a vizsgálatok közötti különbségeket kiszűrjük és egy általános képet kapjunk a génexpresszióról.

Az új generációs szekvenálós módszerek az 1990-es évek végén jelentek meg. Ezek segítségével teljes genomok és transzkriptómák szekvenciája határozható meg, de lehetőség van epigenomikai analízisre és protein-fehérje interakciók azonosítására is. Eleinte a vizsgálatok költsége kifejezetten magas volt, de az ár csökkenésével az alap kutatásban is lehetővé vált a használatuk. Az eljárások a klasszikus lánctermináción alapuló Sanger szekvenálásnál nagyságrendekkel gyorsabbak és olcsóbbak. A leggyakoribb módszerek a ligáción (SOLiD) és szintézisen alapuló (Illumina) módszerek, valamint a piroszekvenálás és az ion-áram elven alapuló szekvenálás. A vizsgálataink során mi a SOLiD módszert alkalmaztuk. Az említett előnyök mellett fontos, hogy új mRNS-ek azonosítása is lehetséges RNS szekvenálással. Ugyanakkor, habár az eljárások költsége csökken, még mindig nagyon drága lehet biológiai párhuzamosok alkalmazása. Ha ez nem lehetséges, akkor az eredmények validálása elengedhetetlen.

A hálózatanalízis egy új és gyorsan fejlődő terület a rendszerbiológián belül. A génexpressziós adatokat figyelembe véve, sejten belüli hálózatok vizsgálatával lehetővé vált különböző folyamatok komplex jellemzése. Ezek a hálózatok génekből és/vagy az általuk kódolt fehérjékből épülnek fel. A hálózatok csomópontjait úgynevezett centralitás értékekkel jellemezzük. Az összeköttetésben álló csomópontok hálózati motívumokat alkotnak, melyeknek fontos szerepe van a hálózat dinamikájában. A sejten belüli fehérjéket fontos hálózat részeként vizsgálni. A modern hálózatelmélet leírása óta rohamos fejlődés tapasztalható a sejten belüli hálózatok kutatásában, melyhez számos in silico módszer áll rendelkezésre. A sejten

belüli szignáltranszdukciós és metabolikus útvonalakat is hálózatokként foghatjuk fel. Ezen útvonalakról nagy mennyiségű információ áll rendelkezésre online adatbázisokban. Emellett lehetőségünk van hálózatok építésére fehérje-fehérje és fehérje-DNS interakciókat tartalmazó adatbázisok adatait felhasználva. A hálózatanalízis egyre fontosabbá válik a gyógyszerkutatásban is. Új gyógyszer-célpontok megfelelő pontosságú azonosításához a sejten belüli rendszerekről rendelkezésre álló minden adat integrálása szükséges. Ehhez a legkézenfekvőbb módszer hálózatok létrehozása, melyek segítségével gyógyszermellékhatások, gyógyszerkölcsonhatások azonosítása is lehetővé vált.

Célkitűzések

- I. Első vizsgálatunkban egy in vitro VVC modell létrehozását terveztük. Azt feltételeztük, hogy a humán sejtek jelenlétében növekvő hifák jelentősen különböznek a kontrolltól, mely humán sejtek nélkül növekszik. Ugyancsak feltételeztük, hogy a kizárólag sejtek jelenlétében upregulálódó gének potenciálisan virulencia faktorok lehetnek.
- II. Második vizsgálatunkban olyan sejten belüli hálózatok alkotását tűztük ki célul, melyeket a léziós és nem léziós pikkelysömörös bőr között eltérő expressziót mutató gének (differentially expressed genes – DEG) és/vagy az általuk kódolt fehérjék alkotnak. Feltételeztük, hogy a hálózatok megfelelő analizisével a pikkelysömör kialakulásában fontos tényezőket és potenciálisan hatékony gyógyszereket azonosíthatunk.

Módszerek I

Felhasznált törzsek és tenyésztési körülmények

A *C. albicans* SC5314-es klinikai izolátumát YPD táptalajban tenyésztettük 30°C-on standard körülmények között. Az immortalizált PK E6/E7 humán vaginális epitheliális sejtvonal (vaginal epithelial cell line - VECL) sejtjeit CO₂ termosztátban 37°C-on szérummentes komplett keratinocita táptalajban (complete keratinocyte medium - CKM) tenyésztettük. 10⁵ db sejtet osztottunk lyukanként 6 lyukú sejttenyésztő plate-ekbe és 24 órán keresztül inkubáltuk a tenyészeteket szérummentes CKM-ban. 24 órával a fertőzést megelőzően a táptalajt antibiotikum-antimikotikum mentes CKM-ra cseréltük. A sejteket 3:1 arányban sarjadzó állapotban lévő gombával kezeltük, majd CO₂ termosztátban 37°C-on tenyésztettük tovább három órán keresztül. A gomba ilyen körülmények között fonalas formában növekszik. Hifás kontrollként szérummentes CKM-ban gombát tenyésztettünk

humán sejtek nélkül azonos körülmények között 3 órán keresztül. Sarjadzó kontrollként a gombából a 0. időpontban RNS-t izoláltunk.

Virulencia teszt

A *C.albicans* virulenciáját a humán sejtek életképességének impedancia-alapú mérésével végeztük. Ún. E-plate-ekbe lyukanként 10^4 VECL sejtet osztottunk. A sejtek a lyukak aljához tapadtak, majd 3 napig hagytuk őket növekedni. Ezt követően a sejteket *hxl1Δ* mutáns és vad típusú (DIC185) *C. albicans*-szal kezeltük. Pozitív kontrollként Triton-X-et alkalmaztunk, mely a humán sejtek azonnali lízisét eredményezte. A 10 percenként mért impedancia-értékek alapján ún. sejtindexet számoltunk minden időpontra: $(R_n - R_b)/15$, ahol R_n az aktuális impedancia, R_b a háttér impedancia (amikor a lyuk csak tápanyagot tartalmaz). A sejtindex arányos a sejtek számával, adhéziójával, növekedésével és életképességével. Az egyes csoportok közötti különbségek statisztikai becsléséhez két- és egyutas ANOVA-t használtunk. A csoportonkénti összehasonlítást kétmintás T próbával végeztük, a kapott p értékeket Bonferroni szerint korrigáltuk. Legalább három technikai és biológiai párhuzamost alkalmaztunk kísérleteink során.

A C. albicans adhéziójának vizsgálata

A PK E6/E7 VECL sejteket addig tenyésztettük, míg konfluens tenyészeteket nem kaptunk. Összesen 10^5 *hxl1Δ* mutáns vagy vad típusú (DIC185) sejtrel kezeltük a humán sejteket. A felülúszót leszívtuk, majd két alkalommal mostuk a tenyészetet 1x PBS-sel. A sejteket ezt követően 3.7%-os (v/v) paraformaldehiddel rögzítettük. Az adherens gomba sejteket fénymikroszkóp alatt megszámloltuk 10 véletlenszerűen kiválasztott látótérben. Kísérletünket 3 alkalommal megismételtük. Az eredmények statisztikai feldolgozásához kétmintás T próbát alkalmaztunk.

Szekvenálás, bioinformatikai és statisztikai analízis

A teljes transzkriptóma szekvenálását a korábban publikált módszerek és ajánlások szerint végeztük. Az eredmények analíziséhez a CLC Genomics Workbench szoftvert alkalmaztuk. A kapott szekvenciákat szál-specifikusan a *C. albicans* SC5314 „assembly 19” referencia genomjára illesztettük. A génexpresszió normalizálásához az ún. „scaling” módszert használtuk. Az eltérő expressziót mutató gének azonosításához az R DEGSeq könyvtárát használtuk. Egy gén expresszióját két állapot között szignifikánsan eltérőnek tekintettük,

amennyiben a kapott FDR érték 0.05 alatt volt és legalább 2-szeresére vagy felére változott a génexpresszió.

Kvantitatív reverz-transzkriptáz polimeráz láncreakció (QRT-PCR)

Legalább 100 ng RNS-ből komplementer DNS-t (cDNS) szintetizáltunk. A kiválasztott mRNS szekvenciák relatív mennyiségének meghatározásához a SybrGreen módszert alkalmaztuk. Kontrollként cDNS-mentes mintákkal is elvégeztük a vizsgálatokat. A kontroll és modell hifás minták génexpresszióját a sarjadzó formához viszonyítva, azt 1-nek véve számoltuk ki. Két technikai és három biológiai párhuzamost alkalmaztunk. Az egyes minták mRNS-mennyiségét a 18S rRNS mennyiségével normalizálva a $2^{-\Delta\Delta CT}$ módszerrel számoltuk ki. A szignifikánsan eltérő génexpressziót ANOVA, páronkénti T teszt és Bonferroni korrekció alkalmazásával határoztuk meg.

Módszerek II

Microarray meta-analízis

Hat olyan microarray vizsgálatot töltöttünk le a GEO adatbázisból, mely pikkelysömörös betegek léziós és nem léziós mintáinak adatait tartalmazza. Minden minta minőségét megvizsgáltuk az arrayQualityMetrics R könyvtár segítségével és a nem megfelelő minőségűeket kizártuk a további analízisből. A nyers adatokat az Easy Microarray data Analysis (EMA) R könyvtárral normalizáltuk. A nem megfelelő minőségű vizsgálatok kizárásához a MetaQC R könyvtárat alkalmaztuk. Az eltérő génexpressziót mutató géneket a MetaDE könyvtár segítségével határoztuk meg. Azon géneket tekintettük eltérő expressziójúnak (DEG), ahol a FDR 0.001-nél kevesebb volt és legalább másfélszeres vagy mínusz másfélszeres változás történt két állapot között.

Fehérje-fehérje, fehérje-DNS és kémiai anyag-DNS hálózatok létrehozása

A fehérje-fehérje interakciókra (protein-protein interakció – PPI) vonatkozó adatokat a STRING 9.0 adatbázisából nyertük. Irányított és nem irányított hálózatokat alkottunk a léziós és nem léziós minták között eltérő expressziót mutató gének (DEG) által kódolt fehérjékből. Csak azokat az interakciókat használtuk fel, melyek „megbízhatósági” pontszáma 900 felett volt a nem irányított és 800 felett volt az irányított interakciók esetében. A kémiai anyag-fehérje kölcsönhatásokat a STITCH 3.1. adatbázisból nyertük. A megfelelő interakciókat a STRING adatbázisnál használtuk szerint választottuk ki. A fehérje-DNS interakciós (protein-DNS interakciós – PDI) hálózatok építéséhez a DEG-ek által kódolt transzkripciós faktorokat (TF)

és az általuk regulált DEG-eket használtuk. Az interakciók forrása a CisRED adatbázis volt. Egy egyesített hálózatot is létrehoztunk, amely fehérje-fehérje és fehérje-DNS kölcsönhatásokat is tartalmazott. Kontrollként olyan hálózatokat alkottunk, melyek nemcsak a DEG-ek-et és/vagy az általuk kódolt fehérjéket tartalmazzák.

A hálózatok analízise, központi csomópontok és hálózati motívumok azonosítása

A hálózatok analízisét és a csomópontok centralitásainak meghatározását a Cytoscape NetworkAnalyzer alkalmazásával végeztük. Ismert, hogy a centralitások értéke hatványfüggvény-eloszlást mutat. Az eloszlásra jellemző első és második momentumot (átlag és variancia) használtuk a kiugró értékek meghatározásához, ha az eloszlás γ exponense 3-nál nagyobb volt. Csak az eloszlás első momentumát (átlag) használtuk abban az esetben, amikor az exponens 2 és 3 között volt, mivel ilyen esetben a második momentum értéke (variancia) végtelent vesz fel. Egy előfordulási valószínűséggel súlyozott átlag értéket használtuk 2 alatti exponens értékeknél, mivel ekkor az első és második momentum is végtelen értéket vesz fel. A hálózati motívumok statisztikai analíziséhez a NetMODE alkalmazást használtuk. Az alkalmazásban kapott p érték megadja azon véletlenszerűen generált hálózatok arányát, amelyekben az adott motívum gyakrabban szerepel, mint a vizsgált hálózatban. $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak a motívum megjelenését. Az egyes motívumokat a Cytoscape NetMatch alkalmazásával szűrtük ki a hálózatokból.

Eredmények I

A VECL - C. albicans tenyészet, mint in vitro VVC modell

Ahhoz, hogy a *C. albicans* az epitélsejteket megfertőzze, a sarjadzó forma epitélsejtekhez tapadása szükséges. Vizsgálataink során PK E6/E7 VECL sejteket fertőztünk sarjadzó *C. albicans* SC5314 gombával. A fertőzött kultúrát 3 óra elteltével megvizsgáltuk. Ekkor a gombák az epitélsejtek felszínéhez tapadtak és hifásan növekedtek. Nagyjából a gombafonalak 5 százaléka a humán sejtekbe penetrált. Az egyszerűség kedvéért ezt az állapotot a továbbiakban „modell hifa”-ként említjük. Kontrollként sarjadzó gombával kezeltünk csak CKM táptalajt tartalmazó mintákat és 3 óra elteltével vizsgáltuk őket. Ezekben a mintákban ekkorra a gombák jelentős része a plate-ek aljához tapadt és hifásan növekedett. A továbbiakban ezt a mintát „kontroll hifa”-ként említjük.

A transzkriptóma elsődleges analízise

Annak érdekében, hogy a sarj-hifa átalakulás kezdeti lépéseit vizsgáljuk, transzkriptóma analízist végeztünk RNS szekvenálással. A minták páronkénti összehasonlítása eredményeként a kontroll hifa és a sarjadzó forma között 1283 eltérő expressziót mutató gént (DEG) kaptunk. Érdekes módon a kapott DEG-ek száma majdnem kétszeres, mintegy 2537 a modell hifa és a sarjadzó forma között. A két hifa között 1574 DEG-et azonosítottunk, valamint 384 olyan gént, amely mindkét hifában eltérő expressziót mutat a sarjadzó formához képest, de a két hifa között nincs különbség. Az utóbbiakat tekintettük azon effektor géneknek, melyek aktiválódnak vagy inaktiválódnak a megváltozott tenyésztési körülmények hatására. 376 olyan DEG-et találtunk, melyek mindkét hifában upregulálódtak, de eltérő expressziót mutatnak a két forma között, valamint 1205 gén kizárólag a modell hifában mutatott eltérő expressziót a sarjadzó formához képest. Ezek a gének potenciálisan a virulenciához kötöttek. QRT-PCR analízist végeztünk eredményeink validálásához. Kiválasztottunk 22 gént, melyek reprezentálták az előbb említett gén-csoportokat. A QRT-PCR analízisünk eredménye teljesen megegyezett az RNS szekvenálás során kapott eredményeinkkel.

A transzkriptóma funkcionális analízise

A kísérleteink során használt körülmények a gomba hifás növekedését indukálják humán sejtek jelenlétében és anélkül is. Megvizsgáltuk, hogy a hifázást reguláló szignáltranszdukciós útvonalak hogyan reagálnak a megváltozott körülményekre. Eredményeink azt mutatták, hogy az útvonalakat aktiváló és gátló transzkripciós faktorok expressziója egyaránt növekedett, mely arra utal, hogy ezek aránya kulcsfontosságú a hifás növekedés során. Az N-acetilglükózamin (GlcNAc) a hifás növekedés jól ismert induktora. Érdekes módon azt találtuk, hogy az GlcNAc transzporter NGT1 kizárólag humán sejtek jelenlétében upregulálódott.

Ismert, hogy a GlcNAc a *C. albicans* hifás növekedését indukálja. In vitro modellünkben megvizsgáltuk a GlcNAc katabolizmusában szerepet játszó további gének expresszióját is. Mivel az RNS szekvenálás nem szolgáltatott elegendő adatot ezen gének expressziójáról, QRT-PCR-t használtunk. A GlcNAc katabolizmusában szerepet játszó GlcNAc-deacetiláz (DAC1), hexokináz-1 (HXK1), GlcNAc-deamináz (NAG1) expresszióját vizsgáltuk a következő mintákban: kontroll hifa, modell hifa és kontroll hifa + 10 mM GlcNAc. Mindhárom gén expressziója csökkent a kontroll hifában a sarjadzó mintához képest, ugyanakkor a modell hifában és a GlcNAc-vel kezelt kontroll mintában egyaránt

upregulálódtak. Az utóbbi mintában bekövetkezett upreguláció valószínűleg a magas GlcNAc szint következménye volt.

Ezt követően a GlcNAc-metabolizmus virulenciában betöltött szerepét vizsgáltuk. Annak ismeretében, hogy a *nag1Δ* és *dac1Δ* mutánsok glükóz jelenlétében nem nőnek, egy *hvk1Δ* mutáns törzset választottunk kísérleteinkhez. Ún. RTCA vizsgálatot végeztünk, mely elektródokkal detektált impedancia értékek alapján valós idejű, kvantitatív adatokat szolgáltat az élő sejtek számáról. VECL sejteket eltérő mennyiségű *C. albicans* vad (DIC185) vagy *hvk1Δ* mutáns gombával fertőztünk és az impedanciát 24 órán keresztül regisztráltuk. A regisztrált értékek alapján sejtindexet számoltunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a mutáns gomba által okozott cytotoxicitás alacsony gomba sejttség (2000 és 5000) mellett alacsonyabb, mint a vad típusnál. Magasabb gomba sejtstégmóknál (10000 és 20000) ez a különbség eltűnik.

Számos publikált adat igazolja a GlcNAc szerepét a sejtfa felépítésében. Feltételeztük, hogy mivel a sejtfaának és a sejtfaa glikozilált fehérjéinek fontos szerepe van az adhézióban, a *hvk1Δ* mutáns törzs csökkent virulenciáját a csökkent adhéziós képesség okozza. Az adhézió vizsgálatát végeztük, melynek során konfluens VECL tenyészeteket kezeltünk *C. albicans* vad típusú (DIC185) és *hvk1Δ* mutáns törzsekkel. Másfél óra elteltével a nem tapadó sejteket lemostuk és a humán sejtekhez tapadó gombasejteket megszámtoltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy sokkal kevesebb *hvk1Δ* mutáns sejt tapadt a humán sejtekhez, mint a vad típus esetében, mely arra utal, hogy a csökkent virulenciát a csökkent adhéziós képesség okozza. Megemlítendő, hogy velünk párhuzamosan publikálták a GlcNAc adhézióban betöltött szerepét a *Staphylococcus aureus* esetében.

Eredmények II

Eltérő expressziót mutató gének detektálása miroarray meta-analízissel

Annak érdekében, hogy adatokat nyerjünk a léziós és nem léziós pikkelysömörös bőrminták közötti génextpressziós eltérésekről, microarray meta-analízist végeztünk. A Johnson-Huang és mtsai. által végzett vizsgálatot az analízis elején kizártuk az arrayQualityMetrics egyéni mintákra vonatkozó eredményei alapján. A megmaradt vizsgálatok minőségét megvizsgáltuk a MetaQC R könyvtárral és mindet megfelelő minőségűnek találtuk az analízishez. A DEG-eket a MetaDE könyvtár segítségével azonosítottuk: 2307 upregulálódott és 3056 downregulálódott gént találtunk a léziós mintákban a nem léziós mintákhoz képest. A DEG-eket használtuk a hálózatok megalkotásához. A DEG-ek magas

száma meglepő lehet, de ezt magyarázhatja a génexpresszió-változás alacsonyabb küszöbértéke (2 és -2 helyett 1.5 és -1.5), valamint a vizsgálatok mintáinak előzetes szűrése.

A hálózatok általános jellemzői

Irányított és nem irányított PPI, irányított PDI és egyesített (PPI-eket és PDI-eket egyaránt tartalmazó) hálózatokat alkottunk a DEG-ekből és/vagy az általuk kódolt fehérjékből. A DEG-ek alapján alkotott hálózatok átmérője nagyobb, míg „átlagos legrövidebb útvonal” értéke kisebb volt a kontrollként használt, nemcsak DEG-eket tartalmazó hálózatok esetében kapott értékeknél. Ezt a csomópontok fokozata és a kódoló gének expresszió-változása közötti általános negatív korreláció okozhatja. Mivel a 1.5-szeres abszolút expresszióváltozásnál kisebb értékeket mutató géneket kiszűrtük, a maradék csomópontok átlagos fokozata alacsonyabb, mivel nagyobb expresszióváltozást mutatnak. Emiatt a hálózaton belüli kapcsolatok mennyisége kisebb, mely magasabb átmérőt és kisebb „átlagos legrövidebb útvonal” értékeket eredményez.

A legfontosabb csomópontok azonosítása

A DEG-eredetű hálózatokban a legfontosabb csomópontokat a fokozat és a stressz centralitások alapján azonosítottuk. Számos olyan fehérjét találtunk, melyeket a pikkelysömörrel már kapcsolatba hoztak, de az általunk azonosított CCNA2, FYN és PIK3R1 fehérje új és eddig a betegséggel nem hozták összefüggésbe őket. A PDI hálózatok analízise során ugyancsak azonosítottunk új, a betegség kialakulásában potenciálisan fontos transzkripciós faktorokat, mint például az androgén receptor (AR), TFDP1, MECOM és MEF2A fehérjék.

A hálózati motívumok vizsgálata

Megvizsgáltuk a 3 és 4 csomópontból álló hálózati motívumokat a DEG-eredetű és kontroll hálózatokban. Találtunk olyan motívumokat, amelyek csak a DEG-eredetű vagy csak a kontroll hálózatokban dúsultak fel szignifikánsan. Számos ilyen motívumot már vizsgáltak és jellemeztek korábban biológiai hálózatokban. Ilyen például a divergencia, konvergencia és a „bifan” motívum. Egy érdekes eredmény a visszacsatolási körök feldúsulása az egyesített hálózatokban a különálló PPI és PDI hálózatokhoz képest. Ugyancsak említésre méltó egy olyan motívum feldúsulása, mely egy különálló csomópont által vezérelt pozitív visszacsatolási körből áll.

Központi alhálózat azonosítása

A pikkelysömörös betegeknek egy időben léziós és nem léziós bőrterületeik is vannak. Célunk volt azon csomópontok azonosítása, melyek a betegség „mindent vagy semmit” típusú megjelenését okozzák és fenntartják a betegséget. Ehhez a következőket vettük figyelembe: ismert, hogy az autoimmun és autoinflammatoros betegségek kialakulásában alapvető szerepe van a pozitív visszacsatolási köröknek; ismert, hogy a fő csomópontok sokkal több pozitív visszacsatolási kör tagjai, mint negatívé; ugyancsak publikálták, hogy az egymással kapcsolatban lévő gyorsan és lassan reagáló pozitív visszacsatolási körök képesek sok, apró, a hálózatot ért behatásra (pl. a pikkelysömörös beteg bőrét érő különböző endogén és exogén faktorok) egy ún „mindent vagy semmit” típusú változást létrehozni. A visszacsatolási körök már említett feldúsulása ugyancsak a pozitív visszacsatolási körök potenciális szerepére utal a pikkelysömörös léziós bőrben.

Annak érdekében, hogy a legfontosabb pozitív visszacsatolási köröket azonosítsuk, egy olyan hálózatot hoztunk létre, mely tartalmazta azokat a fehérjéket és DEG-eket, melyeket a korábban azonosított magas centralitás értékekkel rendelkező csomópontok alkotnak. Ebben a hálózatban az összes visszacsatolási kört azonosítottuk, melyek egy nagy alhálózatot alkottak. Ebben a hálózatban minden csomópont expressziójának változása olyan irányban változott, hogy a hálózat aktuális aktivitását (tehát a léziós fenotípust) fenntartsa. Ezt boolean analízissel is igazoltuk.

Kémiai anyag-fehérje hálózatok analízise

A STITCH adatbázis adatai alapján irányított és nem irányított kémiai anyag-fehérje hálózatokat hoztunk létre. A kémiai anyagok közül kiszűrtük a gyógyszereket és a potenciálisan gyógyszerként használható anyagokat és fokozat, valamint stressz centralitás alapján rangsoroltuk őket. A legmagasabb értékekkel rendelkező anyagokat a gyógyszerek ATC csoportosítása alapján osztályoztuk. A legmagasabb értékekkel a retinolsav, cholecalciferol, kortikoszteroidok, methotrexát, sirolimus és tacrolimus rendelkeztek. Ezeket a gyógyszereket rendszeresen használjuk a pikkelysömör terápiájában. Számos eredményül kapott anyag hatékonyságát klinikai vizsgálatok bizonyítják. Ilyenek az antidiabetikumok, azon belül is a thiazolidindionok. A HMG-Koenzim-A gátló simvastatin egy előzetes vizsgálat alapján hatékonynak bizonyult, habár az azonos csoportba tartozó atorvastatin esetében nem volt szignifikáns javulás. A tumorelles methotrexát egy jól ismert gyógyszer a pikkelysömör terápiájában. Számos egyéb tumorelles gyógyszer azonosításra sor került analízisünkben. A

berberint tartalmazó Mahonia aquafolium kivonat ATC csoportokba nem klasszifikálható, de 3 klinikai vizsgálatban a pikkelysömör javulását eredményezte.

Az azonosított gyógyszerek közül többnek a hatékonyságát pikkelysömörben in vitro kísérletek alapján valószínűsítik. Ilyen például a lipidszint-csökkentő clofibrát, fluvastatin és pravastatin, az újabb COX2 gátlók, az N-acetilcisztein, a hiszton-deacetiláz gátló trichostatin A, különböző arzéntartalmú vegyületek, a foszfodiészteráz-gátló rolipram és a polifenol szerkezetű rottlerin. Esetriportok állnak rendelkezésre a clonidin, captopril, losartan, imatinib, diclofenac, olanzapin, fluoxetin és chloroquin pikkelysömört indukáló hatásáról. Ugyancsak esetriportok vetik fel a cytarabin, doxorubicin, cisplatin, gefitinib, colchicin, lidokain és nikotin betegséget javító hatását.

Összegzésül elmondható, hogy az azonosított anyagokból 34-ről áll rendelkezésre klinikai vizsgálati eredmény, kísérletes eredmények vetik fel 24 gyógyszer hatékonyságát, míg a betegséget indukáló vagy javító hatás 21 gyógyszer esetében merült fel esetriportok alapján. Emellett 98 olyan anyagot azonosítottunk, melyeket pikkelysömörrel még nem hoztak összefüggésbe, de potenciálisan hatékonyak lehetnek.

A hatékony gyógyszerek főként a központi hálózat fehérjéin hatnak

Ezt követően megvizsgáltuk annak a 32 gyógyszernek a támadáspontjait, melyeknek hatékonyságát klinikai vizsgálatok támasztják alá. A támadáspontokat a rájuk ható hatékony gyógyszerek számával jellemeztünk, majd összehasonlítottuk a központi hálózat fehérjéinek értékét a többi fehérjével. Eredményeink alapján a központi hálózaton szignifikánsan több hatékony gyógyszer fejt ki hatását.

Következtetések

In vitro modellezés vs. biopsziás minták használata

A *C. albicans*-szal végzett vizsgálatainkban in vitro modellt használtunk. Feltételeztük, hogy habár a hifás átalakulás elengedhetetlen a fertőzés során, számos egyéb tényező szükséges a gomba virulenciájához, emiatt a humán sejtek jelenlétében növekvő gomba lényegesen különbözik attól, melyre csak a megváltozott fizikai környezet hat. Az egyik legnagyobb kihívás kísérleteinkben a VVC megbízható in vitro modellezése volt.

A hüvelyváladék pH-ja nagyjából 4.5. Ezen a pH-n a *C. albicans* fonalas növekedése gátolt, emiatt a kísérleteinkben 8.0 pH-jú körülményeket alkalmaztunk. A tenyésztéshez

használt táptalaj 5.6 mM glükózt tartalmazott, mely hasonlít a vagina váladékában lévő koncentrációhoz (5.2 mM – 0.1%). Megjegyzendő, hogy ismert az alacsony (0.1%) glükózkoncentráció hifás növekedést indukáló hatása, mely feltételezhetően egy fontos aktivátora volt a fonalas növekedésnek in vitro modellünkben is. Emellett a tenyésztéshez használt, a humán körülményekkel megegyező környezeti hőmérséklet (37 °C) ugyancsak hifás növekedést indukál. Habár a kísérleteink tervezése során próbáltunk minden tényezőt figyelembe venni, néhányat nem tudtunk a modellbe illeszteni: a gomba hifás növekedését in vivo a microbiom többi tagjának a jelenléte is befolyásolja; emellett a gomba in vivo koncentrációja sem ismert, emiatt empirikusan meghatározott számú gombával fertőztük a humán sejteket; végül, kísérleteinkben csak egyféle sejtípust használtunk, míg in vivo számos egyéb sejtípus is jelen van. Az említett hátrányok ellenére úgy gondoltuk, hogy megfelelő kontrollokat használva modellünkkel a humán-gomba interakcióban lényeges faktorokat tudunk azonosítani.

Több microarray vizsgálat áll rendelkezésre a pikkelysömörrel kapcsolatban. Ezek a vizsgálatok biopsziás mintákat használtak a génexpresszió meghatározásához. A biopsziás minták alkalmasak komplex betegségek vizsgálatára, de vannak olyan tényezők, melyekre külön gondot kell fordítani. Míg az in vitro modellezés esetében a kísérleti körülmények standardizálása relatíve könnyű, ez a biopsziás minták esetében problémás. Standardizálhatjuk a betegek életkorát, nemét, a betegségük súlyosságát vagy az alkalmazott terápiát, de vannak olyan egyéni tényezők, melyeket nem tudunk befolyásolni. A microarray meta-analízis egyik fontos feladata egy olyan általános kép alkotása a génexpresszióról, melyet nem befolyásolnak külső tényezők. A komplex szövetek analízisében nehézséget jelent továbbá, hogy a sejt-szintű analízis még nem megoldott. Léteznek in silico módszerek, melyek segítségével sejt-specifikus exoresszióra következtethetünk, de ezek alacsony felbontásúak és pontatlanok. Egyetlen sejt RNS szekvenálására is van lehetőség, de a sejtek megfelelő szétválasztása egyelőre problematikus és az egész eljárás nagyon magas költségekkel jár.

Az adatok szűrése és a fontos gének azonosítása

A két bemutatott vizsgálatunkból is látható volt, hogy a transzkriptóma analízisének kulcsfontosságú része az adatok szűrése, normalizálása és a biostatistika megfelelő alkalmazása. Habár az RNS szekvenálás költsége folyamatosan csökken, még most is gyakran nagyon sokba kerül legalább három biológiai párhuzamos adatait külön-külön feldolgozni. Mivel a mi célunk olyan folyamatok és fehérjék azonosítása volt, melyek potenciálisan szerepet játszanak a *C. albicans* virulenciájában, három biológiai párhuzamos minta RNS-ét együtt

szekvenáltuk. A kapott eredmények alkalmasak voltak arra, hogy a legfontosabb fehérjéket és folyamatokat azonosítsuk, és további in vitro vizsgálatokkal igazoltuk azok szerepét a gomba virulenciájában. Mivel a biológiai párhuzamosainkat egyesítettük, a fontosabb eredményeket QRT-PCR segítségével validálnunk kellett. Számos eltérő expressziót mutató gént és folyamatot azonosítottunk, de mi a GlcNAc metabolizmusára koncentráltunk.

Egy meta-analízis célja, hogy általános következtetéseket vonjon le anélkül, hogy földrajzi, etnikai, életkorbeli és a vizsgálatok kivitelezéséből eredő különbségek azt befolyásolnák. Vizsgálatunk során az összes rendelkezésre álló microarray vizsgálatot szigorú szűrésnek vetettük alá. Mindegyik vizsgálatot ugyanazon a chipen végezték és mindegyik megfelelt a MIAME követelményeinek. A szűrés és normalizálás folyamata is ugyanúgy történt minden vizsgálat esetében. A vizsgálatok mindegyik mintájának minőségét az ArrayQualityMetrics R könyvtárral megvizsgáltuk és az alacsony minőségű mintákat kizártuk az analízisből. A teljes vizsgálatot kizártuk a további analízisből, amennyiben azt a MetaQC R könyvtár eredményei szükségessé tették. Komplet hálózatokat szerettünk volna alkotni DEG-ek felhasználásával, így az expresszióváltozás küszöbértékének megválasztása kulcsfontosságú volt, mely általában empirikus módon történik. Minden génre azonos küszöbértéket használunk annak ellenére, hogy a kódolt fehérje funkciója és a hálózatban betöltött szerepe egyaránt befolyásolja az expresszió változásának mértékét. Esetünkben a másfélszeres változást tekintettük küszöbértéknek a szokásos kétszeres helyett azért, hogy potenciálisan fontos fehérjék analízisből történő kizárását elkerüljük. Megjegyzendő, hogy számos magas centralitás értékekkel rendelkező csomópont expresszióváltozása 2 alatt volt, melyet megmagyarázhat a csomópontok fokozata és expressziójuk változása közötti negatív korreláció. A génexpresszióváltozás küszöbértékének meghatározásához egy olyan módszer lenne ideális, mely génekre specifikusan, azok jellemző expressziós mintázatait vizsgálva hoz statisztikai alapokon nyugvó döntést.

PPI hálózatainkat a legnagyobb interakciós adatbázis (STRING) adatai alapján alkottuk meg, mely nem csupán kísérletesen bizonyított, hanem nagy pontosságú algoritmusokkal prediktált interakciókat is tartalmaz. A PDI hálózatunkhoz ugyancsak felhasználtunk számítógépekkel prediktált, de megbízható interakciókat. A centralitások esetében használt küszöbérték meghatározása speciális módszereket igényelt, mivel ezek hatványfüggvény eloszlást mutatnak. Az alkalmazott módszereinkkel a pikkelysömör kialakulásában potenciálisan szerepet játszó fehérjék és folyamatok azonosítása vált lehetővé.

A gének kontextusba helyezése

In vitro modellünkben a *C. albicans* mikrokozonyzetének változása számos szignáltranszdukciós útvonal indukcióját eredményezte, melynek eredményeként a gomba hifásan növekedett a modell és a kontroll körülmények között egyaránt. A GlcNAc-transzporter NGT1 viszont csak a modell hifában indukálódott. A *hvk1Δ* mutáns gomba csökkent virulenciát mutatott a vad típushoz képest, melyet csökkent adhéziós képessége okozhatott. A humán extracelluláris mátrix jelentős mennyiségű GlcNAc-t tartalmaz. Egy korábbi közlemény alapján az extracelluláris mátrixból jelentős mennyiségű GlcNAc szabadul fel annak remodelációja során, mely a GlcNAc katabolizmusában szerepet játszó NGT1, HXK1, NAG1 és DAC1 géneket indukálhatja.

A *C. albicans* pathogenesis során fontos lépés a gombsejtek epitél és endotélsejtekhez tapadása és a sejtekbe történő penetrálása. Ismert, hogy a GlcNAc szintézise elengedhetetlen a kitin szintéziséhez. A sejtfa belső rétege kitinből épül fel (β -(1,3)-glukán, β -(1,6)-glukán és GlcNAc polimere). Ez a réteg rögzít glikozilfoksztatidilinozitol (GPI) horonyon keresztül számos olyan fehérjét, melyek fontos szerepet játszanak az adhézióban. Ezeket figyelembe véve hogy a *hvk1Δ* mutáns csökkent adhéziós képessége a csökkent kitin szintézisen keresztül valósulhat meg. Ezt egy korábbi vizsgálat is alátámasztja, melyben a Nikkomycin Z, a kitin szintézis gátlószere a *C. albicans* csökkent adhéziós képességét okozta.

A pikkelysömör kialakulásában fontos szerepet játszik a keratinocyták fokozott proliferációja, mellyel számos fehérjét összefüggésbe hoztak. Ezek közül a legtöbb megtalálható volt a legmagasabb centralitás értékekkel rendelkező fehérjék között, de azonosítottunk olyanokat is melyek szerepét eddig a betegségben még nem vizsgálták (CCNA2, TFDP1 és MECOM). A pikkelysömör egy immun-eredetű betegség. Számos olyan immunrendszeri fehérjét találtunk, melyet már leírtak a pikkelysömörrel kapcsolatban. Az src kináz FYN downregulációja a léziós bőrben egy kompenzáló mechanizmus lehet, mivel ennek a fehérjének fontos szerepe van az IFN gamma hatásában és a TNF-indukálta COX2 expresszióban, mely folyamatok fontosak a pikkelysömör patogenezisében. A központi hálózatunk fontos elemei voltak az IL8, CCL2 és az IRF1 fehérjék, melyek szerepe pikkelysömör kialakulásában bizonyított, de gátlószereikkel még nem végeztek klinikai vizsgálatokat.

A pikkelysömör és a metabolikus szindróma kapcsolata jól ismert. A két betegség bonyolult összefüggésben áll egymással, melyet többek között citokinek befolyásolnak.

Számos DEG által kódolt fehérjét kapcsolatba hoztak mindkét betegséggel. Ilyen fehérjék például a PPARG, INS-IGF2, LEP stb. Emellett több olyan fehérjét azonosítottunk, melyeknek szerepe lehet a pikkelysömörös betegek inzulin rezisztenciájának kialakulásában.

A rendszerbiológia célja nagy mennyiségű adat alapján modellek alkotása, melyhez megbízható, pontos adatok szükségesek. Pikkelysömörös vizsgálatunkban génexpressziós adatokat használtunk, a proteinek mennyiségét és minőségét nem ismertük. Emellett csak egy adott időpont adatai álltak rendelkezésre, a génexpresszió fluktuációját nem tudtuk vizsgálni. Így egy pontos differenciálegyenletekkel leírt modellt nem tudtunk alkotni. Viszont a hálózat-alapú analízissel képesek voltunk egy olyan alhálózat azonosítására, melynek potenciális szerepe lehet a pikkelysömör kialakulásában és fenntartásában.

Terápiás aspektusok

A STITCH adatbázis alapján kémiai anyag-fehérje hálózatokat hoztunk létre, melyek segítségével a betegséget befolyásoló gyógyszerek azonosítására törekedtünk. Számos olyan gyógyszer szerepelt fontos csomópontként, melyet már széles körben használnak a pikkelysömör kezelésére. Az eredményeink arra utalnak, hogy különböző intracelluláris hálózatok egyesítése kémiai anyag-fehérje hálózatokkal hatékony módszer lehet potenciálisan hatékony gyógyszerek azonosításában. Megjegyzendő, hogy eredményeink publikálása óta az általunk hatékonyként prediktált gyógyszerek egy részének hatékonyságát bizonyították pikkelysömörben.

A rendszerbiológia helye a bőrgyógyászati kutatásban

Az utóbbi évtizedekben a technológia fejlődésével hatalmas mennyiségű „omics”-jellegű adat vált elérhetővé. Mint azt a *C. albicans*-szal kapcsolatban végzett vizsgálatunk is mutatta, in vitro modell és transzkriptóma analízis alkalmazása alkalmas virulencia faktorok azonosítására. Ugyanakkor már publikált adatok analízisével is jelentős eredményeket kaphatunk, hiszen amellett, hogy a pikkelysömör patogenezisében fontos új fehérjéket tudtunk azonosítani, új potenciális terápiás lehetőségeket is találtunk. A modern kutatásban elengedhetlenné vált nagy mennyiségű adat elemzése, mellyel könnyebben megérthetünk komplex betegségeket és így hatékonyabban kezelhetjük azokat.

Köszönetnyilvánítás

Először szeretném hálámat kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Kemény Lajosnak és Dr. Lakatos Lórántnak, akik kutatómunkám során végig támogattak, motiváltak és akiktől sokat tanultam.

Ugyancsak köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Kondorosi Évának és Dr. Nagy Istvánnak, akik lehetőséget adtak arra, hogy *C.albicans*-szal kapcsolatos kísérleteimet a legmodernebb laboratóriumi körülmények között, a Szegedi Biológiai Központban végezzem. A támogatásuk nélkül a kutatás nem jöhetett volna létre.

Ezen kívül szeretném megköszönni minden laborban dolgozó kollégámnak a sok inspiráló beszélgetést és azt, hogy segítettek átvészelni az eredménytelen időszakokat a kutatás során. Nagyon hálás vagyok Dr. Pál Csabának az utóbbi egy évben a kutatómunkámhoz nyújtott segítségéért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak és különösen menyasszonyomnak, Melindának, hogy támogatnak, segítenek és velem vannak.

A tézis témájához közvetlenül kapcsolódó publikációk:

- I. **Manczinger M**, Bocsik A, Kocsis GF, Voros A, Hegedus Z, et al. (2015) The Absence of N-Acetyl-D-glucosamine Causes Attenuation of Virulence of *Candida albicans* upon Interaction with Vaginal Epithelial Cells In Vitro. *Biomed Res Int* 2015: 398045. **IF: 1.579**
- II. **Manczinger M**, Kemeny L (2013) Novel factors in the pathogenesis of psoriasis and potential drug candidates are found with systems biology approach. *PLoS One* 8: e80751. **IF: 3.23**

Egyéb publikációk

- I. Guban B, Vas K, Balog Z, **Manczinger M**, Bebes A, et al. (2015) Abnormal regulation of fibronectin production by fibroblasts in psoriasis. *Br J Dermatol*. **IF: 4.225**
- II. Palotai M, Bagosi Z, Jaszberenyi M, Csabafi K, Dochnal R, **Manczinger M**, et al. (2013) Ghrelin and nicotine stimulate equally the dopamine release in the rat amygdala. *Neurochem Res* 38: 1989-1995. **IF: 2.551**
- III. Palotai M, Bagosi Z, Jaszberenyi M, Csabafi K, Dochnal R, **Manczinger M**, et al. (2013) Ghrelin amplifies the nicotine-induced dopamine release in the rat striatum. *Neurochem Int* 63: 239-243. **IF: 2.650**
- IV. Heinzlmann A, Kiss G, Toth ZE, Dochnal R, Pal A, Sipos I, **Manczinger M**, et al. (2012) Intranasal application of secretin, similarly to intracerebroventricular administration, influences the motor behavior of mice probably through specific receptors. *J Mol Neurosci* 48: 558-564. **IF: 2.891**
- V. **Manczinger M**, Szabo EZ, Goblos A, Kemeny L, Lakatos L (2012) Switching on RNA silencing suppressor activity by restoring argonaute binding to a viral protein. *J Virol* 86: 8324-8327. **IF: 5.076**
- VI. Koves K, Kiss G, Heinzlmann A, Dochnal R, **Manczinger M**, et al. (2011) Secretin attenuates the hereditary repetitive hyperactive movements in a mouse model. *J Mol Neurosci* 43: 109-114. **IF: 2.504**