**Protein interactions of NAD(P)H-cytochrome b5 oxidoreductase in the endoplasmic reticulum: its role in prevention of lipotoxicity-induced inflammation**

Based on its domain structure, NAD(P)H-cytochrome b5 oxidoreductase (Ncb5or) likely plays a role in the function of the microsomal fatty acid desaturating enzyme (SCD1) as a substitute for cytochrome b5 (b5), and this is supported by the phenotype of Ncb5or-deficient mice. Since certain cytochrome P450 (CYP) monooxygenases are also able to receive electrons from b5, we hypothesize that Ncb5or might participate in xenobiotic biotransformation too. The aim of our work is to elucidate the putative interactions between Ncb5or and SCD1 or CYP isozymes, i.e. the contribution of Ncb5or in fatty acid desaturation and/or biotransformation in cellular and in vitro enzyme activity measurements. In the first semester of the cooperation, we have created the expression constructs for the investigated proteins, and we have started measuring CYP activities in the transfected cells. Preparation of purified Ncb5or enzyme and setting up the analytical background for planned investigations on fatty acid desaturation are in progress.

**Szinergia féléves összegző űrlap**

(a pályázók közösen ezt az űrlapot töltik ki)

Adják meg a támogatott szinergia programjuk címét és szakmai fókuszpontját

* A NAD(P)H-citokróm b5 oxidoreduktáz fehérje-interakciói az endoplazmás retikulumban: szerepe a lipotoxicitás által kiváltott gyulladásos folyamatok kivédésében
* Az Ncb5or interakciója az endoplazmás retikulum membránfehérjéivel (citokróm P450 izoenzimek és sztearil-KoA-deszaturáz: CYP izoenzimek és SCD1), feltételezett szerepe a biotranszformációban és a zsírsav-deszaturációban

Adják meg a szinergia program keretében együttműködő partnerek nevét, tudományos fokozatát, tudományos besorolását, e-mail címét.

* **Csala Miklós**, MD, PhD, egyetemi docens, kutatócsoport-vezető

Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

e-mail: csala.miklos@med.semmelweis-univ.hu

* **Monostory Katalin**, PhD, tudományos főmunkatárs, kutatócsoport-vezető

MTA Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Metabolikus Gyógyszer-kölcsönhatások Kutatócsoport

e-mail: monostory.katalin@ttk.mta.hu

Csatolják a MedInProt programnak köszönhetően elkészült tudományos közleményeik**,** szakmai megjelenésükbibliográfiai adatait, valamint e dokumentum pdf-ét**.** Minden publikáció esetében fejtsék ki max. 2 mondatban a MedInProt relevanciáját.

1. Fejtsék ki pontosan, hogy a kutatási együttműködésük hogyan kapcsolódik az alább megadott MedinProt **fókuszpontok** legalább egyikéhez *(max. 300 szó)****.***

A kutatási együttműködés az 1-es fókuszponthoz csatlakozik, ugyanis a zsírsavak által kiváltott gyulladásos jelátviteli folyamatokat befolyásoló, egyik fehérje funkciójának tisztázására irányul. A lipotoxicitás, vagyis a sejtműködés szabad zsírsavak által okozott zavara egyre intenzívebb kutatás tárgya. A zsírsavak (elsősorban a telített zsírsavak) túlkínálata számos mechanizmus révén károsítja a sejteket. Ezek közül kiemelendő, hogy citokin-receptorokon (pl. TNFα-R, IL-1β-R), illetve toll-like receptorokon keresztül aktiválják az NF-kappa-B-inhibitor-kinázokat (IKK), valamint a c-Jun N-terminális kinázt (JNK), vagyis gyulladásos jelátviteli folyamatokat indítanak el. Ráadásul a sejtbe jutó zsírsavak metabolikus hatásokat is kifejtenek – a mitokondriumban fokozzák a ROS-termelést, az endoplazmás retikulumban (ER) akadályozzák a fehérjeérést, és a di-, illetve trigliceridek felhalmozódását okozzák. A következmény oxidatív stressz és ER-stressz, ami az IKK és a JNK mellett egyéb stresszfüggő kinázok (pl. p38MAPK, PKCφ/ε stb.) aktiválódása, a gyulladás felerősödése és gyakran apoptózis. A lipotoxicitás e molekuláris folyamatai fontos láncszemeket képeznek a tápanyag-túlkínálat, az elhízás, a zsírszövet gyulladása és a diabétesz kialakulása között. A nemrégiben felfedezett – és még tisztázatlan funkciójú – Ncb5or enzim valamilyen módon részt vesz a sejtek lipotoxicitás elleni védelmében. Hiánya ugyanis („knock-out” egérmodellben) az inzulintermelő β-sejtek zsírsavak iránti fokozott érzékenységéhez, majd pusztulásához és ezáltal diabétesz kialakulásához vezet. Az Ncb5or működésének minél alaposabb megismerése tehát mind alapkutatási, mind a klinikumban alkalmazható preventív és terápiás célpontok megismerése és hatóanyagok kifejlesztése szempontjából rendkívül fontos. A fehérje doménszerkezete alapján feltételezik, hogy közreműködhet a zsírsav-deszaturációhoz kapcsolódó elektrontranszferben, vagyis hogy helyettesítheti, illetve tehermentesítheti az ER-membránban elhelyezkedő citokróm b5 és b5-reduktáz enzimeket. Ebben az esetben azonban valószínűsíthető, hogy a citoszolikus enzim alternatív redukáló forrásként a biotranszformáció előkészítő fázisának kulcsenzimeivel, a CYP enzimekkel is interakcióba lép. A közös munka célja e hipotézis tesztelése, vagyis a kérdéses fehérje-fehérje kölcsönhatások feltérképezése, amely az Ncb5or lipotoxicitással szembeni védő hatásához molekuláris szintű magyarázattal szolgálhat.

1. Foglalják össze **közérthetően** szinergia programjuk, és közös munkájuk eddigi eredményeit *(max. 300 szó).*

Az Ncb5or fehérje CYP izoenzimekkel, illetve SCD1-el való feltételezett kölcsönhatásának tanulmányozásához különböző modellrendszereket állítunk elő és optimalizálunk. A vizsgált fehérjéket HEK293T sejtekben (humán embrionális vese sejtvonal) termeltetjük, és mérjük a biotranszformációs, valamint deszaturációs aktivitásokat; májból preparált mikroszóma-frakcióban a CYP és SCD1 aktivitásokat, illetve szelektíven egyféle CYP izoenzimet tartalmazó szuperszómák enzimaktivitását hasonlítjuk össze tisztított Ncb5or fehérje jelenlétében és hiányában. A HEK293T sejtek saját endogén SCD1 és Ncb5or fehérjetartalma gyengén detektálható. Létrehoztuk a fehérjék termeltetéséhez szükséges expressziós plazmidokat, valamint a termelés csökkentésére alkalmas különböző típusú és mennyiségű csendesítő (siRNS) konstruktokat. Az expressziós plazmiddal transzfektált sejtekben az enzimek jelentős mennyiségben kimutathatók voltak, és a fehérjeszintek az siRNS-ekkel koncentrációfüggően szabályozhatók voltak. E rendszer alkalmas tehát a fehérjéket a kívánt szinten termelő sejtek működésének összehasonlítására. Irodalmi adatok alapján kiválasztottunk egy citokróm b5-függő (CYP3A4) és egy citokróm b5-független CYP izoenzimet (CYP2C9), majd ellenőriztük ezek jelenlétét a HEK293T sejtekben, és azt találtuk, hogy mindkettő az aktivitásmérésekhez szükséges mennyiségben megtalálható a sejtekben. Megbizonyosodtunk továbbá arról is, hogy e két CYP izoenzim mennyiségét az Ncb5or termeltetése nem befolyásolja jelentős mértékben. Az in vitro kísérletekhez használandó, tisztított Ncb5or előállításához – a bakteriális termeltetés sikere után – az affinitáson alapuló tisztítás és hemkötés biztosítása van folyamatban. Hozzáfogtunk a transzfektált, illetve vad típusú HEK293T sejtek kétféle CYP izoenzim aktivitásának méréséhez (tolbutamid 4’-hidroxiláz, midazolam 1’- és 4-hidroxiláz), aminek HPLC-s analitikai háttere már be van állítva.

1. Értékeljék és véleményezzék eddigi közös munkájukat (sikereiket, nehézségeiket, illetve azon ötleteiket, javaslataikat, amelyeknek köszönhetően a következő programok hatékonysága javulhat) *(max. 200 szó).*

Az endogén anyagok (pl. zsírsavak) metabolizmusa, valamint a xenobiotikumok (pl. gyógyszerek, környezetszennyező anyagok, növényvédő szerek) biotranszformációja sok hasonlóságot mutat. A zsírsav-deszaturációt katalizáló enzimek, valamint a gyógyszer-metabolizmusban meghatározó szerepet betöltő citokróm P450 (CYP) enzimek közös sajátossága, hogy 1) az endoplazmás retikulum membránjához rögzített fehérjék, 2) működésükhöz elektronforrásra (NADH vagy NADPH) és elektrontranszfert katalizáló fehérjé(k)re van szükségük, 3) képesek a citokróm b5-től elektront elfogadni. A közös sajátosságok vetették fel a kérdést, hogy a zsírsav-deszaturációban minden jel szerint közreműködő, citoszolikus Ncb5or (NAD(P)H-citokróm b5-oxidoreduktáz) vajon alkalmas lehet-e az elektron közvetítésére a CYP enzimek felé is. Az alap ötlet és a kezdeti lelkesedés után az Ncb5or-rel és a CYP enzimekkel foglalkozó két munkacsoport közös kutatási tervének megvalósítása felé a MedInProt Sinergia III pályázati felhívás adta a döntő lökést. Ez késztetett minket a kérdés megválaszolásához szükséges vizsgálati tervek kidolgozására, a legfrissebb irodalmak áttekintésére és a kezdeti kísérleti feltételek előteremtésére. Az első kísérleti nehézséget a zsírsav-deszaturáció méréséhez alkalmazandó szubsztrát oldatban mutatkozó bomlékonysága jelentette, és ehhez adódott az inkubálási médiumban lévő, az analitikai vizsgálatokat zavaró komponensek jelenléte. Jelenleg készen állunk – a humán máj mikroszóma-frakcióban laboratóriumunkban már rutinszerűen meghatározott – CYP aktivitások mérésére HEK293T sejteken. Ezzel párhuzamosan zajlik a zsírsav-deszaturáció humán máj mikroszóma-frakcióban való vizsgálatához szükséges módszerek beállítása.

1. Szabadon fogalmazzák meg a MedInProt kapcsán támogató és/vagy kritikus észrevételeiket. *(max. 200 szó)*

A MedInProt ötletgazdáinak célja, hogy egyrészt platformot teremtsenek a medicina és a fehérjekutatások (szerkezet-kutatás, kölcsönhatás-vizsgálatok) területén dolgozó szakemberek számára, másrészt hogy az anyagi források előteremtésével a programban résztvevő együttműködő partnereket anyagilag is támogassák, rendkívül hasznos kezdeményezés. Az ötlet életképességét mutatja, hogy a program második éve sikeresen működik és fejlődik. A szinergia kiépítése tartós kooperációk alapjául szolgál, és hozzájárul hosszabb távú közös kutatási pályázatok benyújtásához is. A program keretében támogatott munkák a MedInProt konferenciákon történő bemutatása ugyanakkor új együttműködések születését is eredményezi, ahogy azt a legutóbbi rendezvényen tapasztalhattuk.

***A szinergizmus szakmai fókuszpontjai, kiemelt kutatási témák****:*

1. *Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben,*
2. *NMR és MRI adta lehetőségek a fehérjék feltekeredésével kapcsolatos betegségek molekuláris hátterének megértésében,*
3. *Szabályozó fehérjék szerepe az öregedési folyamat(ok)ban,*
4. *Alkalmas nanorendszerek fejlesztése peptid- és fehérjealapú hatóanyagok stabilitásának és felszívódásának fokozása érdekében.*