**[In vivo and in vitro characterization of discretion mutations](http://medinprot.chem.elte.hu/applicants/in-vivo-and-in-vitro-characterization-of-discretion-mutations%22%20%5Co%20%22In%20vivo%20and%20in%20vitro%20characterization%20of%20discretion%20mutations)**

"During the past six month using targeted mutagenesis,we have created null-mutant and hypomorphic *dkc1* alleles in zebrafish, and we have started the phenotypic characterisation of these novel fish strains. We have also performed pressure perturbation experiments on some hypomorphic dyskerin mutants, which resulted in the surprising result that these mutated proteins show increased binding affinity to their partners. Finally, using a quantum chemical approach we have identified the most likely reaction mechanism for the enzyme. These calculations also shed light on the phenotypes observed for the hypomorphic alleles."

**Szinergia féléves összegző űrlap**

(a pályázók közösen ezt az űrlapot töltik ki)

* Adják meg a támogatott szinergia programjuk címét és szakmai fókuszpontját:
	+ cím: **Diszkerin mutációk *in vivo* és *in vitro* jellemzése**.
	+ szakmai fókuszpont: *Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben*
* Adják meg a szinergia program keretében együttműködő partnerek nevét, tudományos fokozatát, tudományos besorolását, e-mail címét.
	+ **Dr. Schay Gusztáv, PhD.**
		- tudományos munkatárs, SE Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet
	+ **Ferenczy György, DSc.**
		- tudományos tanácsadó, MTA Természettudományi Kutatóközpont
	+ **Varga Máté, Ph.D.**
		- egyetemi adjunktus (ELTE Biológiai Intézet, Genetikai Tanszék)
* 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.
	+ Medinprot konferencia poszter - csatolva
1. Fejtsék ki pontosan, hogy a kutatási együttműködésük hogyan kapcsolódik az alább megadott MedinProt **fókuszpontok** legalább egyikéhez *(max. 300 szó)****.***

Jelenlegi ismereteink szerint a vad típusú diszkerin az egyik legfontosabb RNS modifikációt, a pszeudouridilációt katalizálja, melynek pontos szerepe a sejt működésében nem teljesen tisztázott. Irodalmi adatok sejtetik, hogy a riboszomális RNS-ek pszeudouridilációja a riboszóma működésében lehet elengedhetetlen, így elégtelen pszeudouridiláció a riboszomális komplex működésének zavarát okozhatja, ami klasszikus riboszomopátiás kórtünet formájában jelentkezhet. Riboszomopátiák (pl. Diamond-Blackfan anémia, Scwachman-Diamond szindróma, 5q-mielodiszplázia) korábbi vizsgálata megnövekedett rákkockázatot tárt fel ezekben a betegségekben, ami alapján a feltételezhetjük, hogy a diszkerinnek is szerepe lehet a folyamatban. A riboszomopátiák patogenezise viszonylag ismeretlen terület, így a diszkerin működésének feltárásával fontos ismereteket szerezhetünk ezen a téren. Munkánk során meghatározzuk a fehérjét tartalmazó box H/ACA pszeudouridin szintáz komplex által katalizált reakció paramétereit, illetve az *in vivo* (zebradánióban) előállított diszkerin mutánsok fenotipikus jellemzése mellett, vizsgálni fogjuk, hogy az egyes mutációk miként hathatnak a fehérjeszerkezetre, és hogyan befolyásolhatják a box H/ACA pszeudouridin szintáz felépítésében részt vevő molekulák interakcióit. Ezek fényében munkánk a kiemelt témák közül az elsőhöz kapcsolható.

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

Targetált genomszerkesztéssel zebradánióban létrehoztunk egy frameshift-alapú nullmutációt (c.566\_567insTCATGGT), valamint egy inszerciós hipomorf allélt (c.567\_568insGTG ) a *dkc1* génben. Előbbinek elkezdtük részletes molekuláris és fenotipikus jellemzését. Ezen munka során bizonyítottuk, hogy a mutáció a dkc1 fehérje deplécióját okozza a lárvákban, illetve nagyon jellegzetes fenotípust okoz: ) az egyedfejlődés ötödik napján számos fejlődési rendellenességet tapasztalunk: kisebb és görbültebb test, kisebb szem, szív-ödéma, deformált belsőfül. A nullmutáns lárvák kisebb feje számos rendellenességet mutat: például, diszkerin hiányában nem jön létre a lárvális állkapcsokat kialakító porc. Különösen meglepő eredmény, hogy ezekben a *dkc1* mutánshalakban a retina és tectum opticum (TO) területén a sejtek képtelenek kilépni a sejtciklusból és elkezdeni a differenciálódást. Szövettani vizsgálatok is mutatják, hogy ezen a két területen megnyúlt, epithelialis jellegű, differenciálatlan progenitorokra emlékeztető sejtek találhatók.

A molekula-komplexek *in-vitro* nyomásperturbációs fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a *dkc1* egy hipomorf mutációja révén – meglepő módon – erősebb komplexeket alakít ki a partner fehérjékkel, (pl. a NOP10-el) mint a vad típus. A kísérleti adatok analízise majdnem egy nagyságrendi csökkenést mutat a Kd (disszociációs állandó) értékében jelezve ezzel a kötés erősödését, míg ezzel párhuzamosan a kötőfelszín nagysága csökken. Ebből arra tudunk következtetni, hogy az eddig vizsgált mutációk mindegyike jelentősen átrendezi a komplex összetartásáért felelős kölcsönható felszíneket. Ez az átrendeződés kevesebb, de erősebb kötés kialakítását jelenti, ez egyrészt az interakciók szabályozhatóságát befolyásolja negatívan, másrészt a teljes komplex szerkezetében, és ezáltal a funkciójában okozhat torzulást.

A diszkerint tartalmazó box H/ACA pszeudouridin szintáz komplex által katalizált uridin-pszeudo uridin átalakulás reakciómechanizmusának tisztázásra kvantum kémiai számításokat végeztünk modellrendszerekre, amelyek alapján néhány lehetséges mechanizmust azonosítottunk. Ezeknek pontosabb számítását kezdtük el vegyes kvantum mechanikai/molekulamechanikai módszerrel. A vizsgálatok jelentősen építenek a mutációk okozta változásoknak a jelen együttműködés keretében észlelt kísérleti eredményeire, így a komplex elemei közötti kötődési állandók megváltozására és a pszeudo uridin képződés katalízisének hatására.

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

A közös munka egyértelműen stimulálóan hatott minden résztvevő kutatására, hiszen egy sokkal átfogóbb képet kapunk a vizsgált fehérje, a diszkerin működéséről: a reakciómechanizmus kvantummechanikai leírásától az intermolekuláris kötődési állandókon keresztül egészen egy gerinces élőlény fenotípusáig követni tudjuk az egyes mutációk hatását. Ezáltal olyan ok-okozati összefüggés-vizsgálatra nyílik lehetőségünk, amire korábbi munkák során nem volt alkalmunk. A MedInProt stimulálta megközelítés így egyértelműen a kutatási téma sokkal mélyebb megértését teszi lehetővé mindhármunk számára.

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

***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.*