**Diszkerin mutációk in vivo és in vitro jellezése**

A pályázat egy éve alatt három szinten is sikerült fontos eredményekent elérnünk a diszkerin molekula működésének feltárásában. Egyrészt egy *in vivo* létrehozott allélikus széria segítségével igazoltuk az enzim fontosságát a fejlődés során, illetve a fehérjeszintézisben betöltött kiemelt szerepét, a riboszóma biogenezis szabályozás által. Az így létrehozott, illetve korábban is ismert mutációk segítségével *in vitro* igazoltuk, hogy bizonyos mutációs típusok nem is annyira a komplex összetételét befolyásolják, hanem szerkezeti átrendeződések révén az enzim aktív komplexét befolyásolják. Végül vegyes kvantummechanikai/molekulamechanikai számításokra támaszkodva megvizsgáltuk az enzim aktív centrumának működésére eddig felvetett hipotéziseket és egy új reakciómechanizmust javasolunk a katalizált izomerizációs reakció magyarázatára.

**Szinergia összegző űrlap**

(a pályázók közösen ezt az űrlapot töltik ki)

* Adják meg a támogatott szinergia programjuk címét és szakmai fókuszpontját
* Adják meg a szinergia program keretében együttműködő partnerek nevét, tudományos fokozatát, tudományos besorolását, e-mail címét.
* 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 kapcsolódott 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 fontos lépéseket tettünk a fehérjét tartalmazó box H/ACA pszeudouridin szintáz komplex által katalizált reakció paramétereinek meghatározására, illetve *in vitro* nyomásperturbációs kísérletek, valamint *in vivo* (zebradánióban) előállított diszkerin mutánsok fenotipikus jellemzésének segítségével belefogtunk annak a vizsgálatába, 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 eredményeit (max. 300 szó).*

A diszkerin molekula az eukarióta sejtek egyik legfontosabb RNS modifikációját, 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. A riboszomopátiák patogenezise viszonylag ismeretlen terület, így a diszkerin működésének feltárásával fontos ismereteket szerezhetünk ezen a téren.

Munkánk során targetált genomszerkesztéssel zebradánióban létrehoztunk több nullmutációt, illetve hipomorf allélt a *dkc1* génben és elkezdtük ezek részletes molekuláris és fenotipikus jellemzését. Ezen munka során bizonyítottuk, hogy a dkc1 hiánya nagyon jellegzetes fejlődési rendellenességeket okoz, amelyek közül számos a sejtek differenciációjának elmaradásával hozható összefüggésbe.

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, amit egyrészt a fluoreszcencia intenztás változásának csökkenése, valamint az aktivációs térfogat csökkenése együttesen mutat. 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 számításokkal vizsgáltunk releváns modellrendszereket. Az így azonosított lehetséges mechanizmusokra pontosabb, vegyes kvantummechanikai/molekulamechanikai számításokat kezdtünk. A mechanizmus azonosítását támogatják a mutációknak a jelen együttműködés keretében végzett kísérleti vizsgálatai.

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

A pályázat megvalósulása során egyre erősödő meggyőződésünk lett, hogy az a hollisztikus szemlélet, amit a közös erőfeszítésnek köszönhetően kapunk az enzim működéséről, egy olyan mélységű megértését teszi lehetővé a diszkerin által befolyásolt biológiai folyamat(ok)nak, amelyre az egyes tudományterületek kizárólagos figyelembevételével nem lett volna lehetőségünk. Az együttműködés elején természetesen rövidebb ideig gondot okozott annak felmérése, hogy a más tudományterületekről érkező csapattagok, mennyire vannak tisztában a szinergiában résztvevő további területek fogalomrendszerével, de a rendszeres egyeztetések és találkozások biztosították, hogy ezeken a kezdeti nehézségeken hamar túllépjünk. Eddigi eredményeink egy része konferencia poszteren, illetve MTA munkabizottsági ülésen jelent meg, és fontos lépéseket tettünk egy vagy több közös közlemény megjelenése, valamint a téma apropóján közös pályázati forrás(ok) potenciális elnyerése felé.

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

Saját, rendkívül pozitív tapasztalataink kizárólagosan a kezdeményezés támogatását teszik lehetővé. Azt gondoljuk, hogy a gyors elbírálási rendszer segíti, hogy ad hoc ismerettségekből nagyon is komoly szakmai együttműködés alakuljon ki.

***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.*