**Összefoglaló**

**Fehérje-fehérje kölcsönhatást gátló peptid *in vivo* hatásának tanulmányozása sejtpenetráló konjugátumok alkalmazásával**

1. Előállítottunk három különböző sejtpenetráló peptidet – oktaargin, penetratin, Dabcyl-Arg6Lys - tartalmazó konjugátumot. Valamennyi konjugátumból elkészítettük a fluoreszcensen jelölt és jelöletlen formát is. A szilárd fázisú peptidszintézissel előállított peptideket oldatfázisban tioéter-kötés kialakításával konjugáltuk.

2. Valamennyi konjugátum hatékony sejtbejutásra volt képes, melyet HEK293T sejteken vizsgáltunk. A konjugátumok sejtbejutása idő és koncentráció függést mutatott. Megállapítottuk, hogy a konjugátumok már 1-2h inkubálás és 5 µM koncentráció esetén is bejutnak a sejtekbe, és nem toxikusak a sejt számára.

3. Mindhárom konjugátum esetén vizsgáltuk a jelpálya aktiválódására kifejtett hatását. Ezt az Erk2 fehérje foszforilációs szintje jelzi, amit anti-foszfo-Erk2 Western blottal követtünk. A konjugátumok közül csak az oktaargin-RHDF konjugátummal kezelt sejtekben mértünk csökkent foszfo-Erk2 szintet, ami a jelpálya gátlását jelenti.

4. Izolált enzimen vizsgálva a szabad peptidhez képest az oktaarginin-RHDF konjugátum jobban kötődött a kinázhoz. A szabad peptid Kd= 3 μM, míg a konjugátum Kd=0,6 μM kötődést mutatott. Azaz a konjugálás fokozta a peptid kötődését a kinázhoz.

**Szinergia összegző űrlap**

(a pályázók közösen ezt az űrlapot töltik ki)

**Fehérje-fehérje kölcsönhatást gátló peptid *in vivo* hatásának tanulmányozása sejtpenetráló konjugátumok alkalmazásával**

**Dr. Alexa Anita**, **MTA TTK, PhD, tud. munkatárs**,

**Dr. Bánóczi Zoltán, ELTE Szerves Kémiai Tanszék, Ph.D, egyetemi adjunktus**

* 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.

*Egyelőre még nem készült publikáció.*

1. Kutatási együttműködésünk kapcsolódása a megadott MedinProt **fókuszpontok** legalább egyikéhez ***.***

A jelátvitelben szerepet játszó fehérjék mutációi, nem megfelelő kölcsönhatásai más fehérjékkel jelentősen megváltoztathatják az adott jelpálya működését, a sejt sorsát és így a szervezet fiziológiai folyamatait, ami patológiás elváltozásokhoz vezet. A mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) az eukarióta sejtek és szervezetek egyik legősibb és legáltalánosabb szabályozó rendszerei. Három egymást foszforilációval aktiváló kináz kaszkádba szerveződnek (MAPK kináz kináz (MAPKKK) → MAPK kináz (MAPKK) → MAPK), melyek működését számos kölcsönható fehérje (állvány fehérje, foszfatáz) szabályozza. Csoportosításuk a kaszkád alján lévő effektor MAPK alapján történik. Ezek a csoportok más-más környezeti ingerre aktiválódnak, többnyire más MAPK-ok vesznek részt benne, és más sejten belüli folyamatokat szabályoznak, így külön jelátviteli útvonalakba szerveződnek. A ERK-út mitogén szignálokra, növekedési faktorokra aktiválódik, és sejtosztódást, sejtnövekedést íidít el, illetve a sejtek differenciálódását szabályozza. Számos daganatos megbetegedésben, rákos transzformációban az ERK-jelpálya valamelyik fehérjéjének mutációja, hibás működése áll a háttérben. A JNK és p38 utat általában citokinek és káros környezeti hatások (pl. hő vagy ozmotikus sokk, UV sugárzás) aktiválják, és ennek hatására a válasz a sejt apoptózisa vagy adaptációja lesz a környezeti hatásokra, illetve gyulladási folyamatokat indít el. Az ERK5 útvonalnak az érképzésben van óriási jelentősége. Ezen jelátviteli utak fehérjéinek gátlására jelentős kutató és fejlesztő aktivitás történik a fejlett világban, hisz pl. a daganatos betegségek miatti elhalálozás a 2. vezető halál ok. Ráadásul óriási problémát jelent a kezelés során kialakult rezisztencia és a káros mellékhatások, így állandóan újabb és újabb gátlószerek kifejlesztése válik szükségessé. Ezen gátlószerek nagy csoportja a kinázok ATP-kötőzsebéhez kötődik, és gátolja az enzim ATP-áz aktivitását. Ezen kis molekulás ATP-kompetitív inhibitorok kevésbé specifikusak, a sejt homeosztázisát fenntartó enzimek működését is gátolják. A célunk ennél specifikusabb, azaz az adott MAPK jelpályára, az adott MAPK fehérje kölcsönhatásaira specifikus gátlószer fejlesztése és tesztelése.

1. Szinergia programunk, és közös munkánk eredményei *(max. 300 szó).*

Aktiválódásuk után a MAPK-ok foszforilációval aktiválják és szabályozzák a sejt számos fehérjéinek a működését. Ezen kinázok rendelkeznek egy a szubsztrát kötőzsebtől viszonylag távol eső ún. dokkoló árokkal, amely a szubsztrátjaik és az őket aktiváló MAPKK-ok specifikus felismerésére és megkötésére szolgál. A Reményi labor egyik legfontosabb kutatási területe ezen dokkoló árkon keresztül történő interakciók vizsgálata. Szisztematikus bioinformatikai, biokémiai, sejtes és szerkezeti vizsgálatokkal (lsd. 5 év publikációi) feltártuk a különböző MAPK (ERK2, p38 és JNK) kölcsönható partnerekben lévő szakaszokat, amelyek a MAPK dokkoló árkával specifikus és viszonylag erős interakciót tud kialakítani. Ezek a 12-20 aminosavból álló peptidszakaszok-azaz lineáris motívumok- alkalmasak kompetíció révén a MAPK-szubsztrát/aktiváló fehérje kölcsönhatás leszorítására, így a kináz működésének gátlására. Ezen lineáris motívumok gátlóhatásának tesztelése már tisztított rekombináns fehérjékkel megtörtént. Együttműködésünk során egy ilyen lineáris motívumot (RDHF peptid; SLQRKKPPWLKLDIPS) tartalmazó sejtpenetráló konjugátumokat állítottunk elő oktaarginin, penetratin és Dabcyl-Arg6-Lys peptidhez történő konjugációval. A konjugátumok sejtbejutási képességét fluoreszcensen jelölt konjugátumokkal történő kezelést követően fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Mindhárom konjugátum hatékony sejtbejutást mutatott, melynek mértéke idő és koncentráció függő volt. HEK293T sejtekben vizsgáltuk a konjugátumok fehérje-fehérje kölcsönhatás gátló képességét. A konjugátumokkal kezelt sejtekben mértük az Erk2 kináz MAPK2 általi foszforilációjának mértékét Western-blot technikával. A három konjugátum közül egyedül az oktaarginintartalmú csökkentette a foszforilált Erk-2 szintjét, azaz volt képes gátolni a fehérje-fehérje kölcsönhatást. Eme konjugátum kötődési képességét is meghatároztuk. Izolált enzimmel végzett kötődési vizsgálataink azt mutatták, hogy az oktaarginin jelenléte növelte az RHDF peptid kötődését a kinázhoz. A szabad peptid Kd= 3 μM, míg a konjugátum Kd=0,6 μM kötődést mutatott.

1. Közös munkánk értékelése és véleményezése

Eredményes együtt dolgozni, hisz a másik fél rendelkezik azzal a tudással, tapasztalattal, módszerekkel és infrastruktúrával, ami nélkülözhetetlen a kívánt cél eléréséhez. Másrészt a közös gondolkodás is nagyon hasznos, hisz más a nézőpont és a megközelítés, ami új távlatokat nyit.

1. A MedInProt kapcsán felmerült támogató és/vagy kritikus észrevételeink

Kevés az egy év, épp csak felépítjük és teszteljük a kísérleti rendszert, módszereket. Nem marad idő a szisztematikus vizsgálatokra, illetve elmélyülni az eredményekben, ami további vizsgálatokat, majd következtetéseket és eredményeket jelent.