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

"Az elmúlt félév során egyrészt targetált mutagenezis segítségével létrehoztunk *dkc1* null-mutáns és hipomorf zebradánió törzseket és elkezdtük ezeknek fenotipikus vizsgálatát. E mellett nyomásperturbációs vizsgálatok segítségével bizonyítottuk, hogy meglepő és váratlan módon a diszkerin hipomorf mutációi bizonyos esetekben erősítik a fehréjepartenereivel való kölcsönhatást. Végül kvatumkémiai számításokkal sikerült közelebb kerülni az enzim reakciómechanizmusának tisztázásához, amely segít jobban megérteni a hipomorf mutációk okozta fenotípusos elváltozásokat."

**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.*