**Összefoglaló**

(150 szavas összefoglaló magyarul és angolul)

**A lizofoszfatidsav és egyes jelátviteli fehérjedomének kölcsönhatásainak azonosítása, a kötődés kvantitatív és szerkezeti jellemzése**

Kimutattuk az Nck1 fehérje SH2 doménjének szelektív, nagy affinitású kötődését LPA-tartalmú felületekhez, in vitro LPA micellákhoz. ITC mérések alapján két kötőhelyet feltételezünk (KD1=480 nM, n1=50, KD2=2000 nM, n2=150). A nagyobb affinitású kötőhely megfeleltethető a domén LPA felülethez történő kötésének, míg a kisebb affinitású kötődés az LPA micella - fehérje komplex szerkezeti átrendeződését jellemezheti. Megmutattuk, hogy az LPA a plazmamembrán belső felének összetételét mimikáló liposzómákba helyezve is kiváltja a domén kötődését. Ebben a liposzómás modellben a domén kötődött a PIP-5-P, PIP-3,5-P2 és PIP-4,5-P2 inozitol-lipideket tartalmazó vezikulákhoz is. Az SH2-domén infravörös spektruma -helikális és -lemezes szerkezetek jelenlétét mutatja az ismert térszerkezetnek megfelelően. LPA micellák jelenlétében a legjellemzőbb változások a domén Tyr-oldalláncait, míg a liposzómás modellekben a helikális elemeket érinti. Az SH2 domén ismert foszfopeptidjével a kötés specifikusságát igazoltuk. Monomer LPA jelenlétében a kötés erőssége csökkent, míg az asszociált LPA megszüntette a kötést, ami az LPA és a foszfopeptid kötődések kompetíciójára utal.

**Szinergia összegző űrlap**

(a pályázók közösen ezt az űrlapot töltik ki)

**MEDinPROT Szinergia Program VI**

**A lizofoszfatidsav és egyes jelátviteli fehérjedomének kölcsönhatásainak azonosítása, a kötődés kvantitatív és szerkezeti jellemzése**

**Mihály Judith Ilona**, PhD, tudományos főmunkatárs,

MTA TTK, Anyag- és Környezetkémiai Intézet, Biológiai Nanokémia Kutatócsoport

mihaly.judith@ttk.mta.hu

**Liliom Károly**, PhD, tudományos főmunkatárs

Semmelweis Egyetem, ÁOK, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

liliom.karoly@med.semmelweis-univ.hu

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

A tervezett kutatás a "Jelátviteli fehérjék szerepe gyulladásos és daganatos megbetegedésekben" fókuszponthoz kapcsolódik.

*Az LPA - lizofoszfatidsav - a természetben előforduló legegyszerűbb szerkezetű foszfolipid. Az összetettebb foszfolipidek katabolizmusának prekurzora, valamint az újabb kutatások fényében jelátvitel-indukálta anabolikus folyamatokban keletkező lipid mediátor. Fiziológiás összetevője a vérplazmának, emelkedett koncentrációja indikatív emlő, prosztata és egyéb daganatok jelenlétére és korrelál azok áttétképző hajlamával. Praktikusan anti-apoptotikus faktornak tekinthető, mert aktiválja a sejtek túlélési folyamatait. A rákos sejtek az LPA-t a vérben termelő enzimet választanak ki, amely autokrin/parakrin módon fokozza a rákos sejtek motilitását, migrációját. Oxidatív stressz körülmények között az LPA acillánc-összetétele megváltozik, miáltal gyulladási faktorként viselkedik, pozitív visszacsatolási folyamatokon keresztül elősegítve saját maga és egyéb gyulladásfokozó citokinek termelődését. A folyamat érfali makrofágokra hatva kiválthatja, de bizonyítottan súlyosbítja az artériák meszesedését. Egészen a legutóbbi évekig úgy gondoltuk, hogy ezeket a hatásokat az LPA-ra szelektív G-fehérjékkel kapcsolt receptorok (GPCR) közvetítik. Két kisebb receptor-klaszterbe sorolt három-három GPCR (LPA1-3 és LPA4-6) felelős valóban a fiziológiás és patológiás működések jelentős részéért, azonban az is világossá vált, hogy az LPA képes a magi elhelyezkedésű PPAR receptorok direkt aktiválására, kötésére, amely folyamat az érelmeszesedésre való kedvezőtlen hatás részét képezi. Tudjuk azt is, hogy sejtfelszíni receptorok fiziológiás vagy patológiás működésének hatására LPA keletkezik a sejtmembrán belső, intracelluláris rétegében membrán-görbületi stresszt indukálva. A megváltozott lipid-pakolás és görbületi stressz redisztribúciója segíti a vezikulák lefűződését és a sejtosztódást. Azt a munkahipotézist dolgoztuk ki részben saját korábbi kísérletek eredményei, részben a gyér irodalmi adatok áttanulmányozása hatására, hogy a belső membránfélben keletkező és időlegesen felgyülemlő LPA az indukált lipid-pakolási defektus és membrán-görbületi stressz révén új, eddig még nem azonosított kötőfelületeket alakíthat ki, amelyekhez szelektíven kapcsolódhatnak a jelátviteli folyamatokban szereplő fehérjék egyes doménjei. Ezek a dinamikus karakterű kötőhelyek módosíthatják a fiziológiás vagy patológiás fehérje-fehérje kölcsönhatásokat.*

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

A lizofoszfatidsav (LPA) plazmamembrán receptorokon hatva szabályozza a sejtélettani folyamatokat. Feltételeztük azonban, hogy közvetlenül is képes jelátviteli fehérjékhez kötődni és így is hatni. Munkánk során megmutattuk az idegsejtek kommunkációjában részvevő Nck1 fehérje SH2 doménjének szelektív, nagy affinitású kötődését LPA-felületekhez, in vitro LPA micellákhoz. ITC mérések alapján két kötőhelyet kell feltételeznünk (KD1=480 nM, n1=50, KD2=2000 nM, n2=150). A nagyobb affinitású kötőhely megfeleltethető a domén LPA felülethez történő kötődésének, míg a kisebb affinitású kötődés természete még nem tisztázott, az LPA micella - domén komplex szerkezeti átrendeződését jellemezheti. Megmutattuk, hogy az LPA a plazmamembrán belső felének összetételét mimikáló liposzómákba helyezve is kiváltja az SH2 domén kötődését. Ebben a liposzómás modellben a domén kötődött a PIP-5-P, PIP-3,5-P2 és PIP-4,5-P2 inozitol-lipideket tartalmazó vezikulákhoz is. Az SH2-domén infravörös spektruma -helikális és -lemezes szerkezetek jelenlétét mutatja az ismert térszerkezetnek megfelelően. LPA micellák jelenlétében a legjellemzőbb változások a domén Tyr-oldalláncait, míg a liposzómás modellekben a helikális elemeket érinti. A komplex térszerkezetének meghatározása NMR technikával nem járt sikerrel, mert az ehhez szükséges magas koncentrációban a domén instabil. Az SH2 domén foszfotirozin csoportokhoz kötődve vesz részt a jelátviteli szabályozásban. Igazoltuk a domén specifikus kötődését ismert foszfopeptidjéhez, majd kompetíciós kísérleteket végeztünk. Monomer LPA jelenlétében a kötés erőssége csökkent, míg az asszociált LPA koncentráció-függő módon tovább gyengítette, majd megszüntette a kötődést. Az általunk megfigyelt alternatív kötődés / vetélkedés az LPA és a foszfopeptid között egy új szabályozási mechanizmus létezését támasztja alá, amelyet további közös munkánk során tervezünk részleteiben jellemezni. Eredményeinket az MBFT XXVI. kongresszusán (Szeged, 2017) és a 48. Membrán-Transzport Konferencián (Sümeg, 2018) bemutattuk, eredményeink publikációja szerkesztés alatt van.

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

Munkánk során beigazolódott a pályázatunkban vázolt szinergia-hipotézis, hiszen a Liliom-csoport affinitási méréseit jól kiegészítették a Mihály-csoport szerkezeti mérései az igen korszerű ATR-FTIR technikával. Különösen fontos lett ez annak fényében, hogy a lipid-fehérje komplex NMR-szerkezet meghatározása egyelőre sikertelen maradt, elsősorban a domén magas koncentrációban mutatott szerkezeti instabilitása miatt. Véleményünk szerint a MedInProt program együttműködést serkentő hatása a mi munkánkban megvalósult. A jövőbeli programokban javasoljuk, hogy a szinergia-program tipikusan két vezetője mellett egy-egy beosztott kutató javadalmazása is befoglalható legyen a pályázatba-programba. Egy ilyen gesztus méltányosabbá teszi az együtt végzett munka erkölcsi megítélését.

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

A MedInProt Szinergia programját egy olyan lehetőségnek éreztük, amely egy tipikusan kisebb volumenű, de szakmailag érdekes probléma megoldásához nyújt segítséget. Az aktuális, főként gazdasági megvalósíthatóságot célzó pályázati rendszerben erre közvetlenül nincs lehetőség. Szintén pozitívum, hogy minősített kutatók pályázhatnak, hiszen 45 éves kor felett leszűkül a szakmai pályázási lehetőség. Az így megalapozott szakmai kapcsolatok általában nem csak a pályázati futamidő, illetve a közös publikációk idejére korlátozódnak, hanem a létrejött szoros szakmai együttműködések hosszabb távon is megmaradnak.

1. 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.

– Az első féléves eredményeink, valamint a témához kapcsolódó korábbi fehérjedomén - jelátviteli lipid kölcsönhatási méréseink alapján bemutatkozó előadást tartottunk a Magyar Biofizikai Társaság XXVI. konferenciáján (2017. 08. 22-25. Szeged). Az előadás absztraktja:

**A lizofoszfatidsav mint másodlagos hírvivő kölcsönhatása jelátviteli fehérje-doménekkel**

A lizofoszfatidsav (LPA) a természetben előforduló legegyszerűbb szerkezetű foszfolipid. A lipid metabolizmusban az összetettebb foszfolipidek felépítésének prekurzora. Az elmúlt közel három évtizedben világossá vált, hogy fiziológiás összetevője a vérplazmának, emelkedett koncentrációja indikatív emlő, prosztata és egyéb daganatok jelenlétére és korrelál azok áttétképző hajlamával. Jelátvivő, anti-apoptotikus faktornak tekinthető, mert aktiválja a sejtek túlélési folyamatait. A rákos sejtek az LPA-t termelő enzimet választanak ki, amely autokrin/parakrin módon fokozza a rákos sejtek motilitását, migrációját. Oxidatív stressz körülmények között az LPA acillánc-összetétele megváltozik, miáltal gyulladási faktorként viselkedik, pozitív visszacsatolási folyamatokon keresztül elősegítve saját maga és egyéb gyulladásfokozó citokinek termelődését. Egészen a legutóbbi évekig úgy gondoltuk, hogy ezeket a hatásokat kizárólag az LPA-ra szelektív G-fehérjékkel kapcsolt receptorok közvetítik. A hat azonosított receptor felelős valóban a fiziológiás és patológiás működések jelentős részéért, azonban az is világossá vált, hogy az LPA képes a magi elhelyezkedésű PPAR receptorok direkt aktiválására, ezáltal az érelmeszesedésre súlyosbítására. Tudjuk azt is, hogy sejtfelszíni receptorok fiziológiás vagy patológiás működésének hatására LPA keletkezik a sejtmembrán belső, intracelluláris rétegében membrán-görbületi stresszt indukálva. A belső membránfélben keletkező és időlegesen felgyülemlő LPA az indukált membrán-görbület révén új kötőfelületeket alakít ki, amelyekhez szelektíven kapcsolódhatnak a jelátviteli folyamatokban szereplő fehérjék egyes doménjei. Ezek a dinamikus karakterű kötőhelyek módosíthatják a fiziológiás vagy patológiás fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. Kísérleteinkben megvizsgáltuk a Caskin-1 állványfehérje SH3 doménjének, az Nck-1 SH2 doménjének, valamint a Grp-1 PH doménjének a kötődését LPA-t tartalmazó liposzómákhoz, illetve a görbült felületet mimikáló micellákhoz fluoreszcencia spektroszkópia, kvarckristály mikromérleg, izotermális titrációs kalorimetria, termoforézis, ATR-FTIR és NMR technikákkal. Jellemeztük a kötődés szelektivitását szerkezetileg és funkcionálisan rokon lipidekkel összehasonlítva, valamint az LPA-kötés affinitását és sztöchiometriáját. Eredményeink alátámasztják az elképzelésünket, hogy az intracelluláris membránfélben keletkező LPA a fehérjedoménekhez kötődve befolyásolhatja a jelátviteli folyamatok dinamikáját.

MedInProt projektünk eredményeit szintén bemutattuk a 48. Membrán-Transzport Konferencián (2018. 05. 15-18. Sümeg) poszter-előadás formában. A posztert csatoljuk.

Az Nck1 SH2 domén - LPA kölcsönhatásról készülő cikkünk fejlécét mellékeljük. A cikket idén ősszel tervezzük beküldeni a J Lipid Res (IF~5) vagy a Cellular Signalling (IF~4) folyóiratba:

Lysophosphatidic acid binds to the SH2 domain of human Nck1 and antagonizes with the domains binding to its phosphotyrosine peptide

*Balázs Besztercei, Kitti Koprivanacz,* ***Judith Mihály****, Tünde Juhász, Orsolya Tőke, Balázs Merő, László Buday,* ***Károly Liliom***

