

Tematikus programban konzorciumi együttműködések eredményei

(BME, MTA TTK, ELTE)

1. S100 fehérje-fehérje kölcsönhatások specificitási térképe

Schlosser Gitta, Turiák Lila, Nyitray László

A S100 fehérjék specificitási térképét egy HTP „holdup” módszerrel és egy foldamer könyvtár segítségével további finomítottuk. Bizonyítottuk, hogy a foldamer könyvtár használata általánosan, más, nehezen „megcélozható” fehérje-fehérje kölcsönhatási felszínek tanulmányozására is igen alkalmas. A S100 komplexek atomi felbontású szerkezetvizsgálat eredményt hozott az S100A4-p53 és az S100A6-p53 komplex esetén. Az új kötőpartnerek keresése „pulldown” módszerekkel és MS analízissel tovább folyik.

2. A sérült DNS replikációjának vizsgálata sejtliázumokban

Szüts Dávid, Kovács Mihály

Kísérleteink során ultraibolya fototermékeket tartalmazó DNS plazmidok replikációját vizsgáltuk különféle sejtliázumokban. Az esszé a nukleotidkivágó hibajavítás vizsgálatára is alkalmas. Megmutattuk, hogy humán citoszol képes a ciklobutil pirimidin dimer fototerméken transzléziós szintézist végezni, melyhez az élő sejtekhez hasonlóan a PCNA fehérje ubikvitilációja szükséges. Különböző interferencia kísérletekkel módosítani tudtuk a replikáció hatékonyságát. Eredményeinket a FEBS Open Bio folyóiratban publikáltuk.

3. Terápia-rezisztenciához vezető farmakokinetikai változások a daganatokban

Monostory Katalin, Szakács Gergely

Tüdő adenocarcinomával diagnosztizált betegek (N=17) paclitaxel terápiájának kimenetele és a tumorban azonosított funkció-fokozó CYP2C8 és CYP3A4 multiplikáció között összefüggést találtunk. A teljes remissziót mutató betegeknél 1 esetben mutattunk ki CYP3A4 duplikációt, míg a progrediáló/exit csoportban 5 mintában azonosítottunk CYP2C8 és/vagy CYP3A4 multiplikációt. A parentális EKVX, EKVX-Vctrl és EKVX-2C8 PTX érzékenységet vizsgálva kimutattuk az EKVX-2C8 sejtek fokozott mértékű túlélését hosszútávú citotoxicitási esszében.

4. Különböző Wnt-paralógokra specifikus WIF1 fehérjék előállítás

Patthy László, Perczel András

A sikeresen előállított és refoldált WIF-domén HEK 293 sejtekben végzett TCF/LEF reporter assay vizsgálatokban aktívnak bizonyult. Kidolgoztuk és optimalizáltuk az egér L-sejtekben előállított rekombináns Wnt3a fehérje tisztítására szolgáló módszert, hogy NMR spektroszkópiával vizsgálhassuk a WIF domén-Wnt kölcsönhatást.

A Wnt5a feltételezett WIF-kötőhelyeit hordozó fragmentumok előállítására is tettünk kísérleteket: egy nagyobb, N-terminális oldali fragmentumot, illetve egy kisebb, C-terminális oldali peptidet expresszáltattunk bakteriális rendszerben.

5. Új megközelítés a multidrog rezisztens tumorok hatékony kezelésére

Mező Gábor, Varga Zoltán, Szakács Gergely

- Vízoldékony Q4 analógokat állítottunk elő; jellemeztük a ligandok és különböző fémkomplexeik in vitro toxicitását és oldatkémiaiáját (kézirat előkészületben).
- Aminooxiacetilezett SREKA peptide állítottunk elő, amely oxim-kötéssel kapcsolható az aldehid csoportot tartalmazó DSPE-PEG liposzóma képző vegyülethez.

- Gyógyszerhordozó liposzómák célzott tumorterápiában való felhasználását biztosító további célzó peptid lipid-konjugátumokat állítottunk elő (DSPE-PEG2000-SREKA és DSPE-PEG2000-CREKA), optimalizáltuk a szintézis körülményeit és elvégeztük azok analitikai jellemzését.
- Az előállított célzó peptid lipid-konjugátumok felhasználásával különböző összetételű, daunorubicint, mint aktív hatóanyagot tartalmazó liposzómás formulációkat állítottunk elő és jellemeztünk.
- Az előzetes in vivo kísérletek igazolták, hogy az irányító peptidet tartalmazó liposzómák tumor specifikitása nagyobb a célzó molekulát nem tartalmazókhoz képest. Jelenleg a CREKA és SREKA módosított liposzómák összehasonlítása zajlik állatkísérletekben.

6. Teljeshosszúságú humán komplement proteázok szerkezet-funkció vizsgálata

Gál Péter, Pál Gábor

A projekt célja az első teljes hosszúságú komplement proteáz röntgenszerkezet meghatározása. Mivel a MASP-2 előállítás alacsony hatékonysággal ment, C1s proteázra váltottunk. Ezt nagy mennyiségben, tiszta és aktív formában izoláltuk. Az ecotin M84R mutánsa egyaránt 100 nanomólos körüli egyensúlyi állandóval gátolta a teljes hosszúságú dimer C1s-t és annak katalitikusan aktív monomer fragmentumát. A teljes hosszúságú C1s és az ecotin komplexek tulajdonságainak vizsgálata folyamatban van.

7. MIO-enzimek szerkezeti vizsgálata

Poppe László, Bóta Attila, Vértessy Beáta

A projekt keretében új fenilalanin ammónia-liázt izoláltunk *Pseudozyma antarctica*-ból, mely alkalmasnak bizonyult számos nem természetes aminosav előállítására kiváló enantiomerszelektivitással. A fehérjéből már olyan egykristályokat is elő tudunk állítani, amelyek röntgendiffrakciós mérésekre alkalmasak. Ezen felül egy (*R*)-szelektív fenilalanin aminomutáz konzervált szubsztrátútvonalainak célzott mutációival sikerült az enzimből fordított enantiomerszelektivitású β -fenilalanin ammónia-liázt előállítani.

8. A ferroptózisban lejátsszódó fehérjemódosulások és szerepük vizsgálata

Szarka András, Schlosser Gitta

A farmakológiai aszkorbáttal kapcsolatos legújabb kutatási eredmények megerősítik a rákterápiában való alkalmazhatóságát: eredményeink két kaszpáz-független útvonalat vetnek fel a közepes dózis esetén: a nekroptózist és az autofágiát. Továbbá kimutattuk, hogy az aszkorbát gátolni tudta a vas-függő, oxidatív stressz mediált programozott sejthalál folyamatot, a ferroptózist.

A ciklofoszfamid egy régóta, széleskörben alkalmazott immunszuppresszív és kemoterápiás szer. Munkánk során kimutattuk, hogy azok az autoimmun betegség miatt ciklofoszfamid terápiában részesülő páciensek, akik legalább egy példányban hordozzák a GSTP1 I105V variáns allélt, szignifikánsan nagyobb arányban reagálnak a ciklofoszfamid kezelésre, mint a vad típusú homozigóta társaik.

9. Tks4 állványfehérje molekulán belüli interakcióinak és szabályozásuknak felderítése

Buday László, Geiszt Miklós

SAXS vizsgálataink megerősítették az előzetes eredményeinket, miszerint a Tks4-nek létezik egy zárt, konformációja, aminek fontos szerepe lehet a sejten belüli lokalizáció szabályozásában. A Tks4-en belüli interakciók vizsgálatát kiterjesztettük és fluorescence-based titrations, MST és ITC módszereket is alkalmaztunk. Kimutattuk, hogy a Tks4-en belül a tandem SH3 domén interakcióba lép a prolin-gazdag régióval, továbbá a PX domén is kapcsolatba kerülhet a harmadik SH3 doménnal. Így a kétféle interakció képes létrehozni a Tks4 zárt konformációját.

10. Piwi fehérjék szerepe a nem öregedő (csírvonal és tumor) sejtekben

Vellai Tibor, Orbán Tamás

A humán PIWIL4 fehérje szerepét elsősorban placenta sejtekben vizsgáltuk. A transzkripció szabályozáshoz kapcsolódóan feltártuk az RNS interferencia egy másik kulcsfehérjéjének, a Drosha-nak a szerepét miRNS klaszterek transzkripció regulációjában. Megvizsgáltuk a PIWI deficiencia hatását egy *Drosophila* tumormodellben; a fehérje hiánya szuppresszálta az *UAS-yki^{CA}* overexpresszáló állatok pusztulását. *C. elegans*-ban igazoltuk a Piwi szomatikus expressziójának élettartam növelő hatását.

11. Antimikrobiális potenciállal rendelkező önszerveződő oligopeptidok

Horváti Kata, Mándity István, Beke-Somfai Tamás

Együtműködésünk célja olyan új, kationos antimikrobiális peptidek (AMPk) és származékok tervezése és előállítása, melyek hatékonyságát, szelektivitását és stabilitását különböző foldamerek beépítésével kívánjuk növelni. A foldamer elemek helyét molekuladinamikai szimulációk segítségével határoztuk meg. Az ezek alapján előállított peptidek citotoxicitásának és antimikrobiális hatásának vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy az *S,S*-Acpc és *S,S*-Ahc foldamerek beépítésével növelni tudtuk a peptidek szelektivitását.

Új kutatási irányvonalként fényel aktiválható azo-származékok, illetve spiro-pirán származékok beépítést terveztük antimikrobiális peptidekbe. Az ún. "fotokapcsolók" segítségével olyan peptidekhez juthatunk, melyek szerepet kaphatnak a foto-farmakológiában.