

**ASSZEMBLISZÓMÁK VALAMINT A FEHÉRJEAGGREGÁCIÓ ÉS A
TERÁPIAREZISZTENCIA ÖSSZEFÜGGÉSEINEK VIZSGÁLATA
EMLŐTUMORBAN**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS
NAGY-MIKÓ BENCE**

**TÉMAVEZETŐK:
DR. VILLÁNYI ZOLTÁN
DR. VÖRÖS ANDRÁS**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI TANSZÉK**

SZEGED

2025

Tartalomjegyzék

1.	Tartalmi összefoglaló	3
2.	Rövidítésjegyzék.....	6
3.	Irodalmi áttekintés	8
3.1.	Az emlőtumorok jellemzése	8
3.1.1.	Rizikótényezők és prevenció	8
3.1.2.	Diagnózis	9
3.1.3.	Terápia.....	11
3.2.	A transzláció és a tumorigenezis kapcsolata	13
3.3.	A folyadék-folyadék fázisszeparáció	17
3.3.1.	A membrán nélküli organellek	18
3.3.2.	Az mRNS lokalizáció és a folyadék-folyadék fázisszeparáció szerepe a transzláció szabályozásban	20
3.3.3.	A folyadék-folyadék fázisszeparáció szerepe a tumorigenezisben	23
3.3.4.	A folyadék-folyadék fázisszeparáció vizsgálata	24
3.4.	Az asszembliszómák jellemzése	25
3.5.	Az RNS-polimeráz II és a Ccr4-Not komplex kapcsolata	27
3.5.1.	Az RNS-polimeráz II felépítése, biogenezise és működése	27
3.5.2.	A Ccr4-Not komplex szerepe a génkifejeződés folyamatában	31
3.5.3.	A Ccr4-NOT komplex szerepe az RNS-polimeráz II biogenezisében.....	33
4.	Célkitűzés.....	35
5.	Anyagok és módszerek	37
6.	Eredmények	44
6.1.	Az emlőtumor-biopsziaminták fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálata	44
6.1.1.	Az RPB1 aggregációs és a HSP90 eloszlási mintázatának vizsgálata ismert fenotípusú mintákon.....	44
6.1.2.	Ismeretlen regressziós fenotípusú minták vizsgálata.....	54
6.2.	Asszembliszómák vizsgálata MCF7 emlőtumorsejtvonalban	57
6.2.1.	Asszembliszómák jelenlétének kimutatása fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatokkal	57

6.3. A fázisszeparáció kemoterápia-rezisztenciában betöltött szerepének vizsgálata	58
6.3.1. 1,6-hexándiol kezelés hatásának vizsgálata az epirubicin hatékonyságára	59
6.3.2. Az asszembliszómákban felhalmozódó géntermékekben, epirubicin kezelés hatására bekövetkező változások vizsgálata.....	62
7. Diszkusszió	73
8. Irodalomjegyzék	78
9. Angol nyelvű összefoglaló.....	90
10. Publikációs lista	92
11. Köszönetnyilvánítás.....	93
12. Függelékek.....	94

1. Tartalmi összefoglaló

A dolgozatomban bemutatott kutatás során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a fehérjeaggregációnak, valamint a folyadék-folyadék fázisszeparációnak és az így kialakuló asszembliszómáknak milyen szerepük lehet a tumoros betegségek kemoterápiával szembeni rezisztenciájának kialakításában.

Első kérdésként megvizsgáltuk, hogy az emlőtumorkok kezelésében széles körben alkalmazott neoadjuváns kemoterápiára adott válasz összefüggésbe hozható-e a sejtekben a kezelés előtt megfigyelhető – a transzkripciós mechanizmus gerincét adó – RPB1 fehérje aggregációjának mértékével. Eredményeink alapján a nem regrediáló esetekhez tartozó mintákban nagyobb számban fordultak elő nagy méretű ($> 1\mu\text{m}$ átmérő) RPB1 fókuszok a citoplazmában, mint a parciálisan regrediáló és a teljesen regrediáló esetekhez tartozó mintákban.

Ezt követően azt vizsgáltuk meg, hogy a korábbiakban azonosított RPB1 aggregátumok jelenléte alkalmas lehet-e a kemoterápia hatékonyságának előrejelzésére. Az elmélet teszteléséhez ismeretlen fenotípusú mintákon végeztünk immunfestést, majd ezeket a mintákat az RPB1 mintázatuk alapján besoroltuk a lehetséges fenotípusokba. Ezt követően összehasonlítottuk a minták feltételezett és valós fenotípusát, majd kiszámítottuk a besorolás pontosságát. A teszt során 13 mintából 10 esetben megfelelő fenotípust prediktáltunk, a regressziót nem mutató eseteket 92%, a parciálisan regrediálókat 76%, a teljesen regrediáló eseteket pedig 84%-os valószínűséggel azonosítottuk.

Ezen eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a nagy méretű citoplazmatikus RPB1 fókuszok száma, amelyek feltételezésünk szerint aggregátumok, potenciálisan megfelelő prediktív markere a neoadjuváns kemoterápia sikerességének, emlőtumorkok esetében.

Amennyiben a tumorsejtek nagyobb hatékonysággal állnak ellen a transzkripciót és replikációt célzó kemoterápiának – abban az esetben, ha bennük a transzkripcióért felelős komplex központi fehérjéje aggregálódik – az arra utal, hogy ezek a sejtek képesek a génexpresszió egy másik lépésével vagy lépéseivel kompenzálni a kiesett transzkripciót. Ismeretes például, hogy a transzkripció és az mRNS degradáció szorosan kapcsolt folyamatok¹. Dori-Bachash és munkatársai élesztőkön kísérletezve tisztázták továbbá, hogy a transzkripcióban és az RNS bomlásban szerepet játszó fehérjék együtt evolválódtak, ami a két génexpressziós lépés szoros együttműködésére utal². Tehát a kompenzáció lehetséges korábban megszüntetizált mRNS-ek felhasználásával. Erre a jelenségre magyarázatul szolgálhat az RNS degradáció változásán kívül a nemrégiben felfedezett asszembliszómák jelenléte is. Az

asszembliszómák RNS raktárként is funkcionálnak, bennük az RNS-ek stabilak, sőt transzlációkompetens formában vannak jelen. A szövetmintákon végzett kísérletek eredményeinek további vizsgálatára olyan megközelítést választottunk, amellyel közvetlenebbül vizsgálhattuk mind az asszembliszómák jelenlétét, mind szerepüket a kemorezisztenciában. A további kísérletek során MCF7 emlőtumor eredetű sejt kultúrákat használtunk fel ebből a célból.

Első lépésként immunfestés segítségével vizsgáltuk, hogy megfigyelhetőek-e NOT1 tartalmú (a NOT1 az asszembliszómák legmegbízhatóbb markerfehérjéje) citoplazmatikus fókuszok a tumorsejtekben, amelyek az asszembliszómák jelenlétére utalnak. Kimutattuk, hogy várakozásainknak megfelelően az MCF7 sejtekben nagy számban fordulnak elő NOT1 tartalmú citoplazmatikus fókuszok.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az emlőtumorsejtek esetében is gyakran alkalmazott epirubicin hatékonyságát befolyásolja-e a folyadék-folyadék fázisszeperáció, mivel tudjuk, hogy az asszembliszómák folyadék-folyadék fázisszeperációval jönnek léte. Ehhez 1,6-hexándiol (HEX) kezelést alkalmaztunk, mivel a HEX megbontja a makromolekulák közötti gyenge, másodlagos kölcsönhatásokat, gátolva ezáltal a fázisszeperációt. Először megállapítottuk azt a HEX koncentrációt, amely önmagában nem okoz életképesség változást, de feltételezhetően már képes a fázisszeperáció gátlására. Ez kísérleteink alapján 1 m/v%. Ezt követően egy olyan epirubicin koncentrációt kerestünk, amely már kimutathatóan csökkenti a sejtek életképességét, de csak olyan mértékben, hogy a kombinált kezelés esetén fellépő szinergikus hatás detektálható legyen. Kísérleteink eredményei alapján ez a koncentráció 20 µg/mL volt az MCF7 sejtek esetében. Ez a kezelés 89%-os túlélési arányt eredményezett. Majd megvizsgáltuk, hogy az epirubicin és a HEX kombinációban történő alkalmazása felerősíti-e az anti-proliferatív hatást. 20 µg/mL-es epirubicin 1 m/v% HEX-el kombinációban 65,7%-os túlélést eredményezett. Ez alapján a HEX kezelés növeli az epirubicin hatékonyságát, abban az esetben is, ha olyan HEX koncentrációt alkalmazunk, ami önmagában nem toxikus a sejtek számára. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a folyadék-folyadék fázisszeperációnak fontos szerepe van az epirubicinnel szemben kialakuló rezisztenciában. Mindezek után ultracentrifugával történő ülepítés segítségével asszembliszómákat és poliszómákat dúsítottunk epirubicinnel kezelt és kontroll MCF7 sejtekből. Majd proteomikai és RNS szekvenálási kísérleteket végeztünk a frakciókban megtalálható géntermékek jellemzése céljából. Meghatároztuk az asszembliszómákban és a poliszómákban jelenlevő fehérjéket és RNS-eket, valamint megvizsgáltuk, melyek azok a géntermékek, amelyek mindkét vizsgált formában jelen vannak a frakciókban. Az így azonosított géneken

génontológiai vizsgálatot végeztünk, hogy megállapítsuk, milyen fehérje családok transzlációs állapota mutat változást az epirubicinkezelés hatására. Megállapítottuk, hogy elsősorban a sejt metabolikus folyamataiban résztvevő enzimek, a transzlációban szerepet játszó fehérjék és a transzporterfehérjék érintettek a transzlációs változásokban, ami illeszkedik a szakirodalomban jelenleg ismert jelenségek közé, és potenciális magyarázattal szolgál az epirubicin ellen kialakuló rezisztenciára.

2. Rövidítésjegyzék

Arg	Arginin
BRCA1/2	BRCA1/2 tumor szupresszor gének
BSA	Marhaszérum-albumin (Bovine serum albumin)
Ccr4-Not	Carbon catabolite repression 4 –negative on TATA-less
CTD	Karboxi-terminális régió
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DNS	Dezoxiribonukleinsav
DP	Prolin-Aszpartát
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
ER	Ösztrogén receptor
FDR	Hibás találati arány (false discovery rate)
FRAP	Fluoreszcencia visszanyerés túlgerjesztés után (fluorescent recovery after photobleaching)
Gln	Glutamin
HCD	Magas komplexitású régió (High complexity domain)
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HEX	1,6-hexándiol
HSP90	Hőshock fehérje (Heat shock protein) 90
ID/LC	Rendezetlen/alacsony komplexitású régió (intrinsically disordered/low complexity domain)
Ki-67	Proliferációs marker fehérje
LC-MS/MS	Folyadék kromatográfia utáni tandem Tömegspektrometria
LLPS	Folyadék-folyadék fázisszeparáció (Liquid-Liquid Phase Separation)
lncRNS	hosszú nem kódoló RNS
MCF7	Emlőtumor-eredetű sejtvonal (Michigan Cancer Foundation-7)
metiltio-Cys	Metil-Tio-Cisztein
MCC	Matthews korrelációs koefficiens
MMTS	Metil-metántio-szulfonát
mRNS	messenger (hírvivő) RNS
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrogén
NOT1	Negative on TATA-less
NR	nyirokcsomó áttétek
NST	Nem specifikus típusú emlőtumor
PBS	Phosphate-buffered saline
PBSTX	PBS + Tween20 + Triton X100
Pol II	RNS-polimeráz II
PR	Progeszteron receptor
PTEN	Tumor szupresszor gén

RNS	Ribonukleinsav
RPB1-12	DNS-függő RNS-polimeráz II alegység 1-12
RPL	Nagy riboszóma alegység fehérje
rRNS	riboszómális RNS
Ser	Szerin
SG	Stressz granulum
Spt-Ada-Gcn5	Acetil transzferáz fehérje komplex
STK11	Tumor szupresszor gén
TNM	Tumorstátusz: T – a tumor mérete, N – nyirokcsomó áttétek, M – távoli metasztázisok
TR	Primer tumor
tRNS	transzfer RNS
TEAB	Trietilammónium-bikarbonát

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az emlőtumorok jellemzése

A tumoros jellegű megbetegedések világszerte a vezető halálozási okok közé tartoznak. Hazánkban a daganatos megbetegedések eredményezik az össz-halálozás mintegy 25%-át. Ezzel a második leggyakoribb haláloknak számítanak a szív- és érrendszeri megbetegedések után. A daganatokat a génállományt érintő olyan hibák okozzák, amelyek a sejtek szabályozatlan proliferációját eredményezik, ezáltal az ilyen abnormális sejtek a normál sejtekhez képest szaporodási előnyre tesznek szert³.

Az emlőrák az emlő duktális vagy acinaris hámsejtjeinek rendellenes, szabályozatlan osztódása nyomán kialakuló betegség, amely a melanóma mellett a nők világszerte leggyakrabban diagnosztizált malignus daganatos megbetegedése. 2022-ben 2,3 millió új esetet diagnosztizáltak világszinten, és megközelítőleg 666 ezer halálozásért volt felelős⁴⁻⁶. Az elmúlt évtizedekben a diagnosztikai eljárások jelentős fejlődésen mentek keresztül, ennek köszönhetően egyre korábbi stádiumban és egyre pontosabban diagnosztizálható. A terápiás megközelítések hasonló mértékű fejlődése következtében a betegség mortalitása viszont csökkenő tendenciát mutat. Ez a trend jelentős eredménynek számít az orvostudomány számára.

Magyarországon az emlőrák a harmadik leggyakoribb daganatos megbetegedés. A nemzetközi statisztikákkal összhangban az összes tumoros eset 11,6%-át teszi ki. A nők körében Magyarországon szintén az emlőrák a leggyakoribb daganatos megbetegedés, az egyik leggyakoribb daganatos halálok⁴.

3.1.1. Rizikótényezők és prevenció

Az emlőtumor kialakulásában számos külső eredetű (exogén) és belső eredetű (endogén) tényező játszhat szerepet.

Az exogén rizikófaktorok például az életmódhoz köthető tényezők, mint például az egészségtelen étrend és ennek következtében kialakuló obezitás⁷, a dohányzás, illetve akár a kis mennyiségben történő alkoholfogyasztás is. A különböző kémiai és fizikai eredetű karcinogén hatásoknak való kitettség, mint például az ionizáló sugárzás, légszennyezés, tisztítószeres, peszticidek, ugyancsak növelik a betegség kialakulásának kockázatát⁸. Az exogén rizikófaktorok egy másik fontos csoportja az ösztrogéntartalmú gyógyszerek alkalmazása. Az orális fogamzásgátló szerek jelentősége az emlőrák kialakulásában nem tisztázott, ellenben a menopauza utáni hormonpótló terápia és a betegség kialakulása közötti összefüggés már bizonyított⁷.

Endogén kockázati tényezők körébe tartoznak a genetikai sajátosságok, a nem, az életkor, a földrajzi elhelyezkedés és származás, a hormonháztartási zavarok és az emlőben jelentkező egyéb proliferatív léziók. Az emlőrákos esetek 5-10%-a genetikai eredetű⁹. A leggyakoribb genetikai eredetű ok a BRCA1 és/vagy BRCA2 gének mutációja, de egyéb, genetikai kórképekben jellemző tumor szupresszor gének, például a p53 (Li-Fraumeni szindróma), STK11 (Peutz-Jeghers szindróma) vagy PTEN (Cowden szindróma) mutációja következtében is kialakulhat a betegség¹⁰. A genetikai háttér alátámasztja a családi anamnézisben előforduló, korai életkorban jelentkező emlőrákos megbetegedések halmozódása, amely különösképpen az egyenes ági nőrokonok esetében jellemző¹¹.

Sok egyéb tumoros betegséghez hasonlóan az emlőrák kezelése is annál hatékonyabb, minél korábbi stádiumban történik a diagnózis. A lehető legkorábbi észleléshez nélkülözhetetlen a szűrőprogramok biztosítása, amely minden korosztályban ajánlott a nők számára. Továbbá 20 éves kor felett a rendszeres, havonta történő emlőönvizsgálat elvégzése is nagyban hozzájárul a korai észleléshez. Az emlőrák primer prevenciójának egyetlen eszköze az átlag populáció számára az egészséges életmód. Ennek következtében a megelőzésben elsődlegesen a szekunder prevenció szerepe emelhető ki. Az emlőszűrés képalkotó módszerek alkalmazásával végezhető. Magyarországon az emlőszűrés népegészségügyi program keretében valósul meg, 45 és 65 év közötti nők két évente vehetnek részt ingyenes mammográfiás szűrővizsgálaton. Azon nők esetében, akik családjában anyai ágon előfordult emlőrák vagy ismert BRCA mutációt hordoznak, a fokozott kockázat miatt akár az ajánlott korcsoporton túl is javallott a szűrővizsgálaton való részvétel¹².

3.1.2. Diagnózis

Az emlőrákok legjellemzőbb tünetei az emlőben vagy hónaljban megjelenő, tapintható csomó, az emlő bőrének, méretének és/vagy alakjának megváltozása, illetve az emlőbimbó váladékozása. Az emlőszűrő vizsgálatok célja az emlőrák korai, tünetmentes, még nem tapintható stádiumban történő diagnózisa és ezzel a kedvezőbb prognózis elérése¹².

Az emlőrák diagnózisának felállítása multidiszciplináris feladat. Az úgynevezett, „diagnosztikus triász”, azaz hármas vizsgálat (klinikum, radiológia, patológia), a diagnózis alapja. A daganat méretéről, elhelyezkedéséről, környező szövetekhez és szervekhez való viszonyáról, valamint az esetleges metasztázisokról a fizikális és képalkotó vizsgálatok adnak információt. Azonban a megfelelő terápiás megközelítés kiválasztásához ezek mellett minden áttétképző képességre gyanús elváltozás esetén vékonytű aspirációs citológiai vizsgálat vagy core biopsziás minta szövettani vizsgálata szükséges. Ezek segítségével megállapítható a

daganat pontos szöveti típusa, továbbá bizonyos biológiai jellemzői¹³. Így ezek a vizsgálatok a preoperatív diagnosztika létfontosságú részét képezik.

Az emlőtumорок különböző típusait a WHO által kiadott klasszifikáció alapján soroljuk be¹³. A szövettani típus ismerete a tumor egyéb jellemzői mellett információt ad a betegség tulajdonságairól és a várható prognózisról.

A tumor kiterjedésének vizsgálata is elengedhetetlen része a diagnosztikai folyamatnak és a kezelés tervezésének. Az emlőtumорок klinikai (cTNM), illetve patológiai (pTNM) jellemzői alapján a betegség stádiumát tudjuk meghatározni a TNM (T – a tumor mérete, N – nyirokcsomó áttétek, M – távoli metasztázisok) státusz alapján. A TNM státusz megállapítása során nem veszik figyelembe a tumor szöveti típusát¹⁴. A státusz meghatározása a vizsgált paraméterek részletes kritériumok alapján történő osztályozásán alapul. A T, N és M paraméterek alapján megállapíthatjuk a betegség stádiumát, amely a kezelés tervezéséhez nyújt segítséget.

A core biopsziás minták az áttétképző hajlam meghatározása mellett további prognosztikai és prediktív markerek vizsgálatában is szerepet játszanak. A prognosztikai tényezők egy betegség valószínűsíthető kimeneteléről adnak információt, prediktív markereknek pedig azokat a tényezőket nevezzük, amelyekkel egy adott terápiás módszer hatásosságát tudjuk előre jelezni. Egyes biológiai tulajdonságok lehetnek egyszerre prediktív és prognosztikai markerek is¹⁵.

Emlőtumорок esetén a három legfontosabb meghatározandó prognosztikai és prediktív marker a tumor ösztrogén receptor (ER), progeszteron receptor (PR), HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), illetve Ki-67 státusza¹⁶. Ezek a markerek segítenek a megfelelő neoadjuváns terápiás kezelés kiválasztásában¹⁷.

Az emlőrákok megközelítőleg kétharmada hormonreceptor pozitív¹⁸. Ezen tumorok esetében a sejtek proliferációját a hormonreceptorhoz kapcsolódó ösztrogén, illetve progeszteron serkenti. A terápia szempontjából a hormonreceptor pozitivitás egy előnyös tulajdonság, mivel számos hormonterápiás szer is hatásosan alkalmazható az ilyen tumorok kezelésére. Az ilyen esetben hasznosítható gyógyszercsoportok több ponton is képesek semlegesíteni az ösztrogén hatását, majd a tumor műtéti eltávolítását követően csökkentik a recidíva valószínűséget és mortalitást. A hormonreceptor pozitív daganatok kezelésére alkalmazott hormonterápiás szerek két fő csoportja: a szelektív ösztrogén receptor modulátor szerek (pl. tamoxifen), amelyek ösztrogén antagonistaként hatnak az emlőszövetben¹⁹, illetve az aromatázgátlók, amelyek a szervezet ösztrogén termelését gátolják²⁰.

A HER2 egy receptor tirozin-kináz, amely számos emberi sejttípus felszínén előfordul. Feladata, ligandum kötődésének hatására olyan jelátviteli utak aktiválása, amelyek sejtosztódást indukálnak, illetve gátolják az apoptózist. Az emlőrákok 15–20%-ánál a HER2 megnövekedett mértékű expressziója jellemző a tumorsejtekre²¹. A terápia szempontjából a HER2 expresszió a hormonreceptorokhoz hasonlóan úgyszintén előnyt jelenthet, ugyanis rendelkezésre áll a HER2 elleni monoklonális antitest (trastuzumab)²². Ennek következtében nagyon hatékony célzott terápiában részesülhetnek a betegek.

Az ezen három (ER, PR, HER2) prediktív markert nem mutató daganatokat tripla negatív tumoroknak nevezzük. Ez az állapot az emlő tumorok mintegy 10–15%-ára jellemző²³. Ezen tumorok kezelésére a fent említett terápiás opciók nem alkalmazhatók, így gyógyításuk igen nagy kihívást jelent. Jellemző rájuk az agresszív növekedés, prognózisuk a többi emlőtumorhoz viszonyítva szignifikánsan rosszabb²⁴.

Egy további széles körben vizsgált prognosztikai marker a Ki-67 sejtmagi fehérje, amely szoros összefüggésben áll a sejtek proliferációjával, de pontos szerepe még nem ismert²⁵. Festési eljárások segítségével láthatóvá válik, hogy egy tumor sejteinek mekkora hányada Ki-67 pozitív, azaz a sejtek hány százaléka osztódik. A magasabb (20% feletti) Ki-67 érték agresszívabb terjedésű, gyorsabban növekvő, rosszabb prognózisú tumorra utal^{26,27}.

A megfelelő terápiás megközelítés kiválasztásához nagyban hozzájárulnak a vizsgált prediktív markerek, így javítva a betegség kimenetelét. A tripla negatív emlőtumorok kezelése jelentős kihívást jelent az orvosoknak, így a további prediktív markerek felfedezése igen fontos a betegség mortalitásának csökkentése érdekében.

3.1.3. Terápia

Az emlőrák kezelése számos orvosi szakma együttműködésével történik. Sebészi, sugárterápiás és onkológiai kezelések állnak rendelkezésre, az utóbbi kettő általában kombinációban kerül alkalmazásra²⁸.

A műtétek célja a tumor eltávolítása, ezzel a további terjedés és metasztázisok kialakulásának megakadályozása és a recidíva kivédése. Bizonyos korai stádiumban diagnosztizált esetekben választható a masztektómiánál kevésbé radikális, a tumor biztonságos eltávolítása mellett a lehető legtöbb egészséges emlőszövetet megőrző, emlőmegtartó műtét²⁹. Ennek feltétele a klinikailag I., II. stádium, szoliter, kis kiterjedésű tumor (T1-T2), valamint az N0-N1 nyirokcsomó státusz és a távoli metasztázisok hiánya, illetve a posztoperatív sugárkezelés elfogadása²⁶. Más esetekben radikálisabb műtetre lehet szükség³⁰, illetve a tumor bizonyos jellemzői kontraindikálhatják a sebészi kezelést³¹.

Az onkológiai szerekekkel vagy sugárterápiával történő kezelés lehet adjuváns (a műtétet követő), vagy neoadjuváns (a műtét előtti). Az adjuváns kezelés elsődleges célja a műtét után hátramaradó tumorsejtek elpusztítása és ezzel a recidíva valószínűségének minimalizálása. A műtéten átesett betegek többségének adjuváns radioterápia javasolt³². A daganat szövettani típusától, stádiumától, illetve prognosztikai markereitől függően egyéb terápiás módszerek (molekuláris célzott terápia, endokrin terápia, kemoterápia) is alkalmazható²⁸.

A neoadjuváns terápia a lokálisan előrehaladott tumoroknál, cT2 (2 cm-t meghaladó, de 5 cm-nél kisebb tumor) és cN0 (nincs regionális nyirokcsomó áttét), vagy c/pN-pozitív státusz esetében kerülhet alkalmazásra³³. A terápia célja a daganat méretének csökkentése („downstaging”), a műtét lehetővé tétele, illetve a tumor kisebb méretéből adódóan az operáció radikalitásának csökkentése. Egyes esetekben akár teljes regresszió is elérhető neoadjuváns terápiával³⁴. Az adjuvánsan alkalmazott terápiás módszerek neoadjuvánsan is alkalmazhatók.

Az elérhető terápiás megközelítések közül historikusan az endokrin terápia volt az egyik legelterjedtebb. A leggyakrabban alkalmazott szer a tamoxifen, amely egy szelektív ösztrogénreceptor-modulátor. A tamoxifen az 17 β -ösztadiol kompetitív inhibitora az ösztrogénreceptorhoz kapcsolódva megakadályozza a jelátvitelt a növekedést serkentő jelátviteli úton¹⁹. A neoadjuváns kezelések másik gyakran alkalmazott módszere a kemoterápia. A legszélesebb körben elterjedt kemoterápiás szerek az antraciklinek, mint az adrinamycin vagy az epirubicin. Ezek a szerek képesek beépülni a DNS-be és megakadályozni annak replikációját, ami lehetetlenné teszi a sejtek osztódását, továbbá a Topoizomeráz II gátlásán keresztül blokkolják a transzkripciót³⁵. Az antraciklineket számos esetben kombinálják különböző taxol származékokkal, mint a paclitaxel vagy a docetaxel. Ezek az anyagok megakadályozzák a mikrotubulusok depolimerizációját, ami a sejtciklus elakadásához vezet a G2/M fázisban, ezzel sejthalált idézve elő³⁶. További gyakran alkalmazott kiegészítő szerek a ciklofoszfamidek, amelyek tartalmazhatnak fluoropirimidineket is, mint például az 5-dezoxi-fluoro-imidin. Ezek a szerek DNS alkiláló hatásuknak köszönhetően váltanak ki sejthalált³⁷.

Az egyik legújabb neoadjuváns terápiás megközelítés a HER2 receptor célzása, amelyhez a terápiás antitestek megjelenése nyitotta meg a kaput. A HER2-t felimerő antitest például a trastuzumab, amely képes a receptorhoz kapcsolódni és blokkolni a rajta keresztül megvalósuló jelátvitelt²².

A különböző típusú daganatok különböző kemoterápiás szerekre adott válasza eltérő lehet. Egyes szerekre jellemzően a betegek egy adott csoportja reagál jól¹⁵. A kemoterápiás szereknek súlyos mellékhatásaik lehetnek, ezért fontos, hogy a betegek egyénre szabott terápiában részesüljenek, azaz csak olyan kemoterápiás szert kapjanak, amely előreláthatólag

hatásos lesz az esetükben³⁸. Egy szer alkalmazhatóságára egy adott típusú tumor esetében a 3.1.2 fejezetben tárgyalt prediktív markerek státuszából lehet következtetni. A neoadjuváns kemoterápia hatékonyságának előrejelzése kiemelten fontos a kezelés optimalizálása, és ezzel a kedvezőbb prognózis elősegítése céljából.

3.2. A transláció és a tumorigenezis kapcsolata

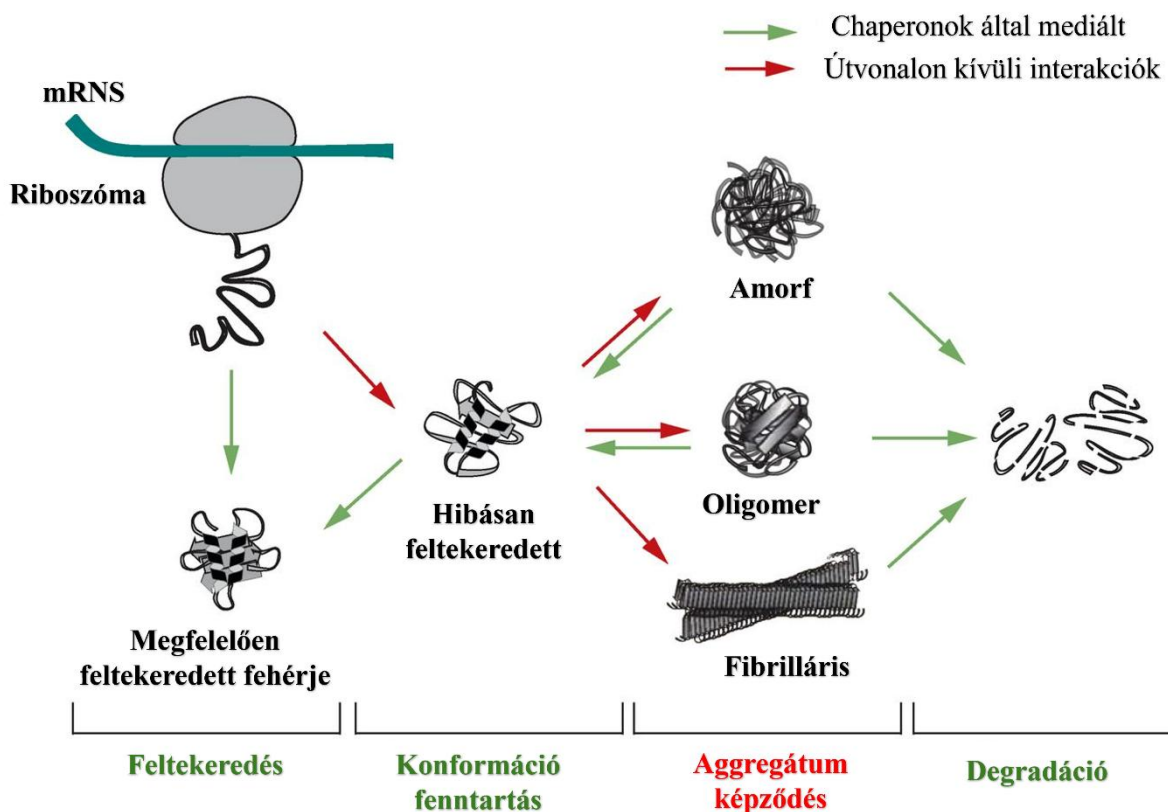
A tumoros megbetegedések hátterében genetikai vagy epigenetikai változások állnak. Ezek spontán bekövetkező mutációk vagy egyéb mutagén hatások (kémiai vegyületek, sugárzás, biológiai ágensek pl. vírusok, transzpozonok) eredményeképpen alakulhatnak ki. Epigenetikai módosulásokról akkor beszélünk, ha a mutáció nem közvetlenül magát a tumor kialakulásában szerepet játszó gént kódoló szekvenciát érinti, hanem a génkifejeződést szabályozó egyéb folyamatokon keresztül érvényesül. Ilyen lehet például a kromatinszerkezetet érintő változás vagy egy szabályozásban szerepet játszó DNS szakaszt érintő hatás (pl. promótert vagy enhanszert), ami ennek a génexpresszióját képes megváltoztatni³.

A génkifejeződés későbbi folyamatai is szerepet játszanak a tumorok kialakulásában. Ezek közül a transláció jelentősége is meghatározó lehet, mivel a nem megfelelő fehérjeszintézis hibás géntermékek képződéséhez vezethet. Ennek oka leggyakrabban a translációs apparátusban –különösképpen a riboszómában – bekövetkező rendellenességekben keresendő. A tumorsejtekben nagy gyakorisággal halmozódnak fel olyan mutációk, amelyek a riboszóma alegységeit felépítő fehérjéket kódoló géneket érintik³⁹. A riboszómális fehérjék mennyiségi vagy minőségi változásai jelentős hatást gyakorolhatnak a képződő polipeptid láncra. Kulcsszerepet játszhat a tumor kialakulásában a riboszómális fehérjéket kódoló gének expressziójának megváltozása is. Riboszómális fehérje mutációra egy példa a T-sejtes akut limfoid leukémiás betegeknél leggyakrabban megfigyelt RPL10 fehérje mutációja a 98-as Arginin aminosavat kódoló pozícióban. Ez a mutáció leronthatja a transláció fidelitását azáltal, hogy a kodon hűséget gyengíti, azaz az mRNS szekvenciáján nem kódolt aminosavak beépülését teszi lehetővé³⁹. Abban az esetben, ha a riboszómába nem a kodonnak megfelelő tRNS lép be, hibás aminosav kerül beépítésre a szintetizálódó peptidláncba. Ennek korrigálása a sejt által a későbbiekben már nem lehetséges. Ebből következően még az aminosav beépítése előtt kell biztosítani a megfelelő ellenőrző folyamatot. Ez elsősorban az mRNS és a tRNS között létrejövő nagy specifitású kodon-antikodon kapcsolaton keresztül valósul meg. Az aminoacil-tRNS-ek képződése éppen ezért kettős ellenőrzés alatt áll⁴⁰. Azok a mutációk, amelyek a riboszómális fehérjéknek azt a régióját érintik, ahol a tRNS-ekkel történő interakció zajlik, hibás fehérjék képződéséhez vezet. Továbbá klinikai megfigyelések alapján a T-sejtes akut

limfoid leukémiában szenvedő gyermekek közül ~10% rendelkezett valamilyen r-fehérjét érintő mutációval. Az RPL10 Arg98Ser missense mutációban a beteg gyermekek 6,5%-a volt érintett^{41,42}. Figyelembe kell vennünk azonban ezen mutációk jelentőségének értékelése során, hogy a mutációk sejtalpopulációkként eltérőek lehetnek⁴³. Ez a nagy mértékű heterogenitás elsősorban a szolid tumorok sejtjeinek sajátossága⁴⁴. Egy mutációval érintett riboszóma által megszintetizált fehérje nem megfelelő térszerkezetéből adódóan a normál funkcióját betölteni képtelen lehet, továbbá fehérje aggregátumok kialakulásához vezethet⁴⁵.

A sejtekben számos mechanizmus biztosítja riboszóma-defektus esetén a sejtciklus szüneteltetését, indokolt esetben a sejthalált. Az egyik ilyen funkcióért felelős a p53 tumorszupresszor gén, amely számos más szituáció mellett a riboszóma defektusai esetén is aktiválódik^{46,47}. Ahhoz, hogy a p53 a sejtciklus megállását előidézzé, szükség van két, a riboszóma felépítésében is esszenciális fehérjére. Ezek az RPL11, illetve az RPL5 fehérjék, amelyek defektusa súlyos következményekkel járhat, mivel kontrollálatlan sejtosztódást idézhetnek elő^{48–50}.

A fehérjék megfelelő térszerkezetének megkérdőjelezhetetlen jelentősége van abban, hogy el tudják-e látni funkcióikat a sejtben és a szervezetben^{51,52}. A sejtek citoplazmája vizes közeg, és a fehérjék a helyes, biológiailag aktív térszerkezetük kialakítása során oly módon rendeződnek, hogy a hidrofób tulajdonságú aminosavak oldalláncai belülre, míg a poláris tulajdonságúak kívülre, a felszínre kerülnek⁵¹. Hibás térszerkezet kialakítása esetén azonban a belül elhelyezkedő hidrofób tulajdonságú aminosavak képesek a fehérje felszínére kikerülni. Rendszerint az ilyen hidrofób felszíneket ismerik fel a dajkafehérjék, vagy más néven chaperonok, amelyek a helyes térszerkezet kialakításáért, továbbá a konformáció újjászervezéséért felelősek. A chaperonok működése biztosítja, hogy a fehérjék visszatérhessenek a funkciójuk ellátásához szükséges natív térszerkezetbe. Amennyiben ez a folyamat nem megy végbe, fehérje aggregátumok alakulhatnak ki (1. ábra). Ha a hibás térszerkezetet felvett fehérjék apoláris oldalláncai nagy koncentrációban vannak jelen a fehérje felszínén, azok a kedvezőbb energetikai állapotra törekedve egymás felé fordulnak, és így hidrofób-hidrofób kölcsönhatások által vezérelve összekapcsolódhatnak, aggregátumokat képezhetnek⁵².



1. ábra – A chaperonok szerepe a fehérjék megfelelő térszerkezetének kialakításában⁵²

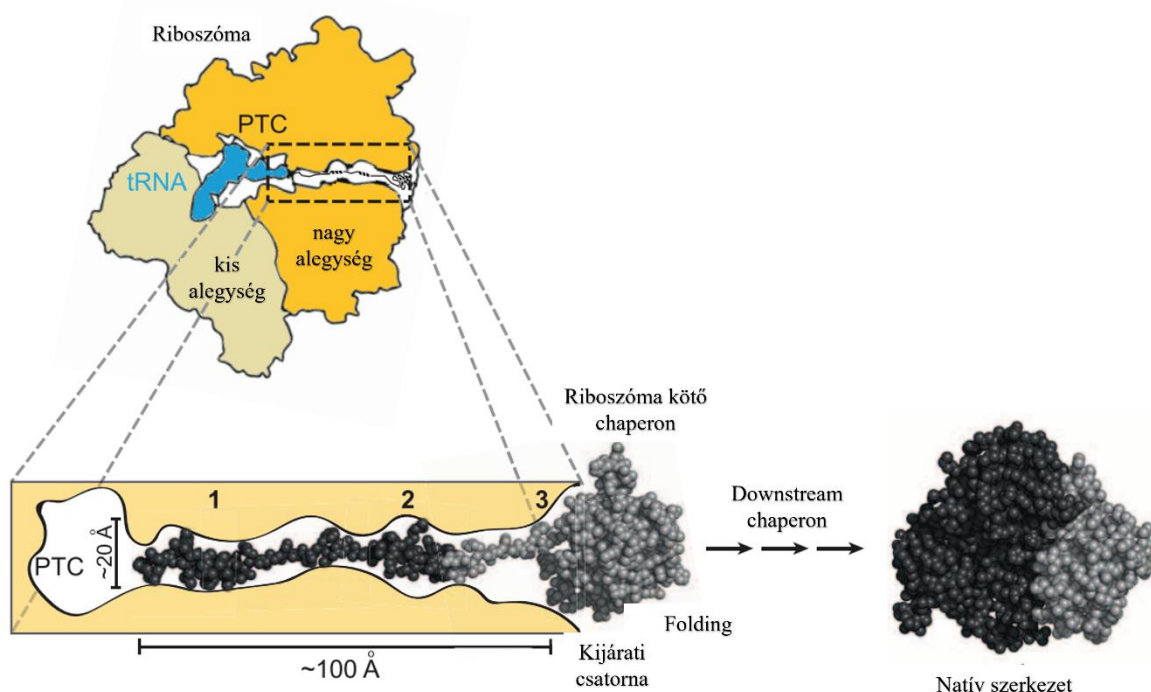
A sejtekben jelenlévő fehérjéket a szintézisüket követően a megfelelő sejt-kompartmentbe kell juttatni, ahol a későbbiekben képesek ellátni a biológiai funkciójukat. A különböző fehérjeláncok más molekulákkal kapcsolódhatnak és további komplexeket alkothatnak. Az ilyen hibás térszerkezettel rendelkező fehérjék nem képesek a megfelelő kompartmentbe jutni, és/vagy a megfelelő módon összeszerelődni más alegységekkel. Az ilyen fehérjéket, szelektíven fel kell ismerni, majd lebontani. Az emberi gének igen kis százaléka kódol olyan fehérjét, amely a megfelelő kompartmentbe történő transzport és más komponensekkel való összeszerelőedés nélkül is felveszi a funkcióképes térszerkezetét.

Elengedhetetlen, hogy a frissen képződött polipeptidláncokat, amelyek esetében még az összeszerelőedés, valamint a transzportfolyamatok nem zajlottak le teljesen, a sejt megkülönböztesse az aberráns fehérjéktől. A hibásnak érzékelt, lebontásra ítélt fehérjéket a fehérjeminőség-ellenőrző rendszer ismeri fel. A detektálást követően poli-ubiquitin szignál kerül a lebontandó fehérjére, amely kijelöli azt a lebontást végző ubikvitináció-függő proteoszóma számára^{53,54}.

Az egyes fehérje alegységeknek a kívánt sztöchiometriai arányban, vagyis megfelelő mennyiségben szükséges jelen lenniük a nagyobb méretű komplexbe történő szerveződés

folyamán. Az ilyen, összetett komplexek összeépülése több szinten, a génexpresszió több lépése által is szabályozott. A génkifejeződés sajátosságai nyomán az egyes komponenseket közel ideális sztöchiometriai arányban termeltetni igen nagy kihívást jelent. Amennyiben ez a finom egyensúly felborul, az hibás fehérjék képződését vonhatja maga után⁵³.

Az olyan, sok alegységből felépülő komplexek esetében, mint például a riboszóma vagy a proteoszóma, az expressziós szintek összeegyeztetése egy nagy jelentőségű és nehéz feladat^{52,53}. A sejtekben található makromolekula-komplexek közül a riboszóma megfelelő összeállítása az egyik legnagyobb kihívás. A közel 80 fehérjéből és rRNS-ből felépülő eukarióta riboszóma biogenezéséhez számos faktor jelenléte és összehangolt működése szükséges. Tovább fokozza a folyamat komplexitását és a szükséges elemek számát az is, hogy a riboszómát alkotó rRNS és fehérje komponensek is számos érési lépésen mennek keresztül⁵⁵. A riboszómális fehérjék más fehérjékhez képest rendkívül hosszú féléletidővel rendelkeznek, stabil szerkezetüknek köszönhetően. Ennek köszönhető, hogy a riboszómafehérjék felhalmozódnak a citoszólban, ha a fehérjék lebontását végző proteoszóma aktivitása lecsökken^{56,57}. Ennek következtében az aberráns fehérjék egy jelentős hányadát a riboszómális komponensek teszik ki. Ezek degradációja a riboszóma által betöltött funkció miatt különösen nagy jelentőséggel bír⁵⁸.



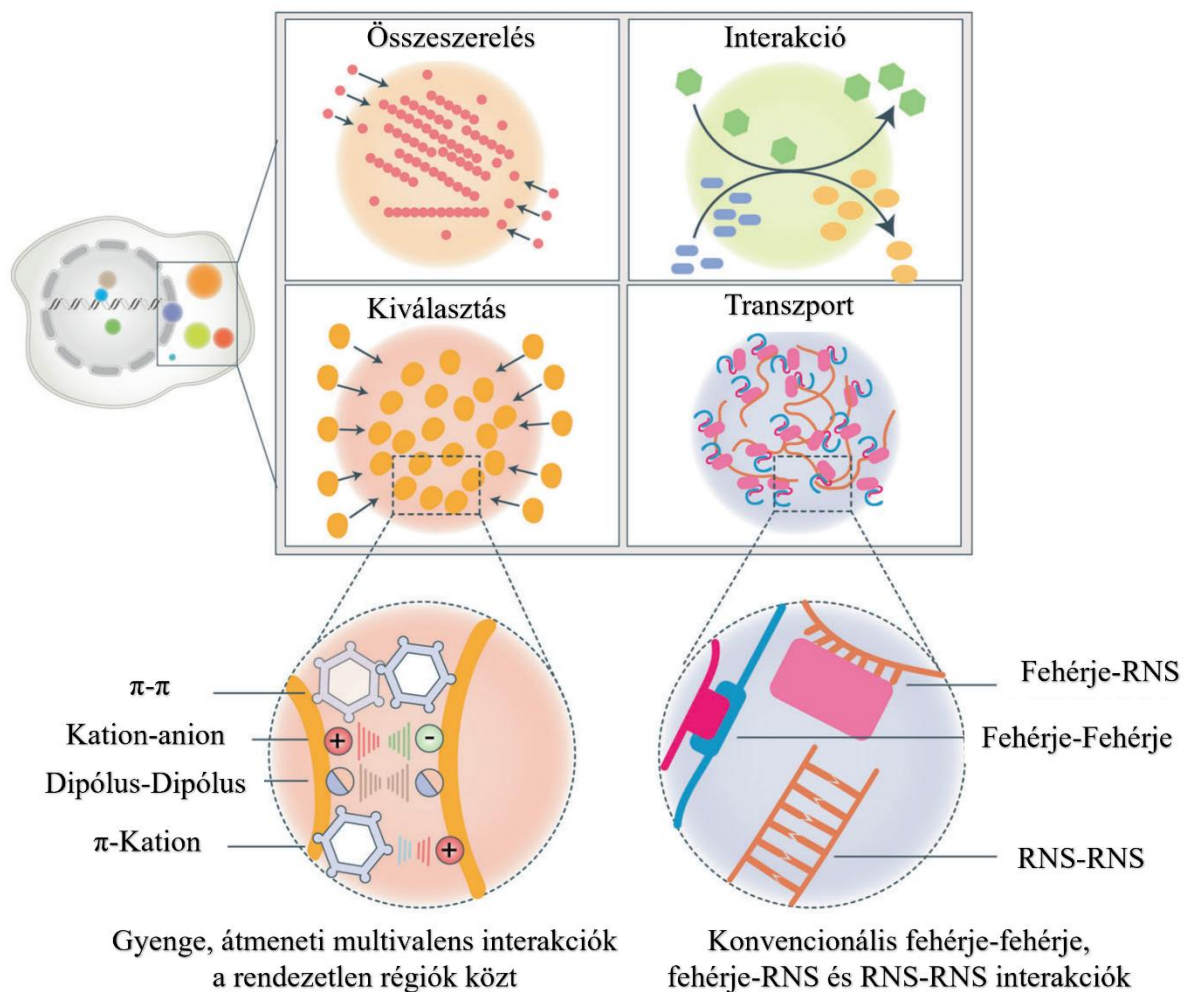
2. ábra - Riboszómán megvalósuló fehérje folding⁵⁸

PTC=peptid transferáz center

A mutációk következtében létrejött aberráns riboszómákon történő fehérjeszintézist követően aggregátumok alakulhatnak ki³⁹. A proteoszóma aktivitás csökkenésének hatására, vagy akkor, ha a komplexet alkotó komponensek valamelyikéből nem áll rendelkezésre megfelelő mennyiség, vagy ha a fehérjék helyes konformációját és összeszerelődését biztosító chaperon hálózat elemeiből hiány áll fenn, szintén aberráns, aggregációra hajlamos fehérjék képződhetnek⁵³.

3.3. A folyadék-folyadék fázisszeparáció

A fehérjék és/vagy nukleinsavak között kialakuló multivalens kölcsönhatások hatására számos esetben olyan makrostruktúrák jelennek meg a sejtek belső terében, amelyek folyadékszerű tulajdonságokat mutatnak^{59,60}. Ezt a jelenséget folyadék-folyadék fázisszeparációnak (angolul: liquid-liquid phase separation (LLPS)) nevezzük. Kémiai értelemben a folyadék-folyadék fázisszeparáció egy kedvező energetikai állapot elérését jelenti, amely folyamat során egy folyadékkoldatban egyes anyagok koncentrációja lokálisan jelentősen magasabb, mint az oldat más részeiben. A folyamat *in vitro* rendszerekben is megfigyelhető, mivel elsődleges hajtóereje különböző kémiai kölcsönhatásokban rejlik. Ilyen kölcsönhatások például a hidrofób-hidrofób interakciók, ionos kötések, dipólus-dipólus kölcsönhatások, gyenge átmeneti multivalens kölcsönhatások (3. ábra). A fázisszeparáció kialakulásában jelentős szerepe lehet továbbá a kölcsönható molekulák egyedi tulajdonságainak, mint például a fehérjeláncok hossza, töltéseloszlása, magasabb rendű szerkezeti tulajdonságaik, vagy akár a rendezetlenségre való hajlamuk⁵⁹⁻⁶¹. A fázisszeparált struktúrák szoros kölcsönhatásban állnak az őket körülvevő közeggel, ez folyamatos energia- és anyagkicserélődést jelent. Ez lehetővé teszi a dinamikus változásukat, amely a sejtek számára kifejezetten hasznos tulajdonság, mivel így az egyes ingerekre adott válaszként változtathatják a fázisszeparált struktúrák tartamát, lehetőséget biztosítva ezáltal stresszválaszra vagy lokális adaptációra is.



3. ábra – A folyadék-folyadék fázisszeperáció kialakításában szerepet játszó különböző erőhatások⁶²

A folyadék-folyadék fázisszeperáció különböző folyamatokban betöltött szerepe (ábra felső része és a fázisszeperációt kialakító molekuláris kölcsönhatások (ábra alsó része).

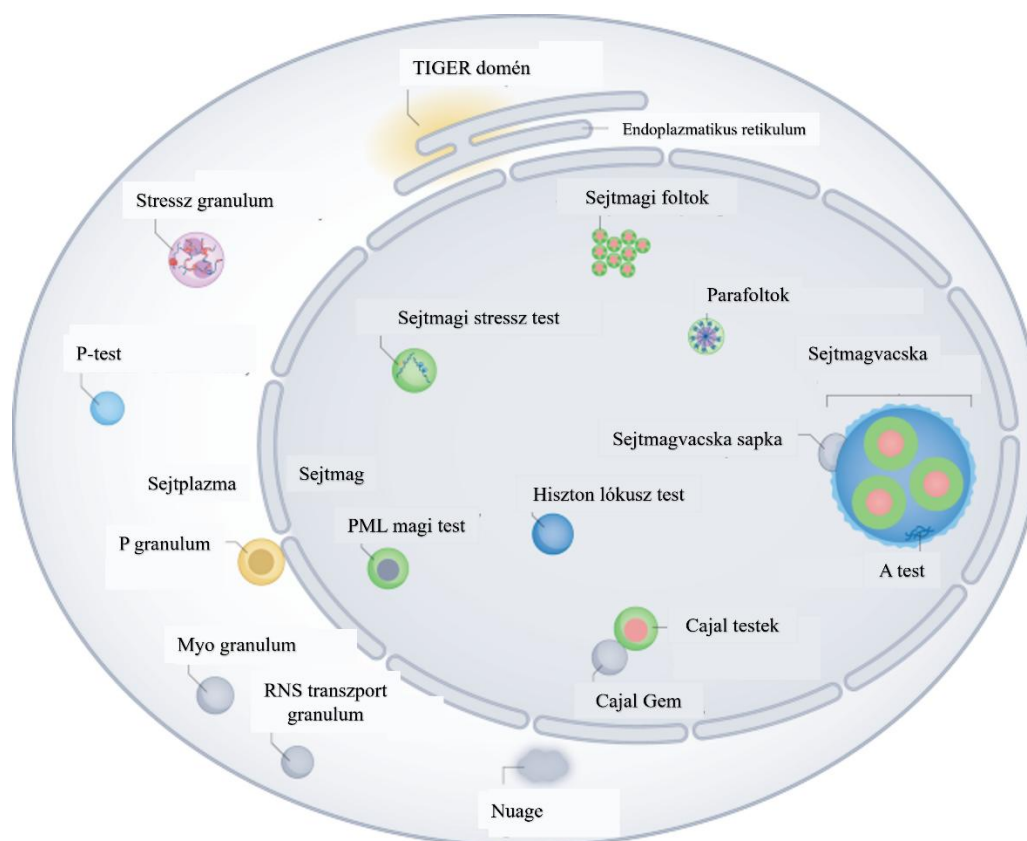
3.3.1. A membrán nélküli organellek

Az evolúció folyamatának egyik igen jelentős hozadéka, hogy a sejtekben különféle kompartmentumok alakultak ki. Erre azért volt szükség, mert az élethez nélkülözhetetlen, hihetetlenül nagy számú, különböző biokémiai reakció, az azokat katalizáló számos enzimfehérje és egyéb velük kölcsönható molekulák (szubsztrátok, ko-szubsztrátok és katalizátorok) különféle reakciókörülmények között tudnak optimálisan kölcsönhatásba lépni egymással⁶³. Az eukarióta sejtek jellemzője, hogy bennük lipid-membránnal körülhatárolt sejtorganellek találhatók (például: sejtmag, mitokondrium, kloroplasztisz, endoplazmatikus retikulum), amelyek belső tere drasztikusan eltérő tulajdonságokkal rendelkezhet a relatíve egységesnek tekinthető citoplazmatikus környezethez viszonyítva⁶⁴. Azonban a citoplazma sem teljesen uniform és számos olyan reakció játszódik le benne, amelyek különféle körülményeket

igényelnek. Ezek a körülmények elsősorban nem drasztikusan eltérő lokális pH-t, ozmotikus potenciált vagy hasonló fizikokémiai környezetet jelentenek, hanem jellemzően a reakció létrejöttéhez szükséges makromolekulák lokálisan magas koncentrációjában nyilvánulnak meg. Ennek következtében jönnek létre a membránnal nem körülhatárolt sejtorganellek, mint például a Cajal-testek is⁶³.

Számos ilyen membrán nélküli organellet írtak már le. Az első, a sejtmagvacska⁶⁵ volt, amelyet Felice Fontana fedezett fel az 1770-es években, ám az első hiteles leírásra további 60 évet kellett várni. Azóta már több tucat membrán nélküli organellet fedeztek fel (4. ábra és 1. táblázat).

A membrán nélküli organellek 0,2–2 μm nagyságú kondenzátumok, amelyek változatos alakúak lehetnek és különféle specifikus fehérjékből és nukleinsavakból épülnek fel, azonban lipideket jellemzően nem tartalmaznak⁶⁶. A kondenzátumokban számos olyan fehérje található meg, amelyek nukleinsavkötő tulajdonsággal rendelkeznek, ami alátámasztja a génkifejeződésben betöltött szerepüket^{67,68}. A membrán nélküli organellek platformként szolgálnak a sejtmagban és a citoplazmában lejátszódó génexpressziós folyamatok során, illetve specifikus kondenzátumok is képződnek, amelyek egy-egy adott sejttípusra jellemzőek vagy a sejtet érő stressz hatására alakulnak ki.



4. ábra - Az eukarióta sejtek jellemző legjelentősebb membrán nélküli organelleim⁶⁶

1. táblázat - A legismertebb citoplazmatikus és sejtmagi membrán nélküli organelumok és funkcióik

Lokalizáció	Membrán nélküli organelum	Biológiai funkció
Citoplazma	Stresszgranulumok	mRNS raktározás, transzláció szabályozás ^{69,70}
	RNS-transzportgranulumok	mRNS raktározás, transzport a neuronokban ⁷¹
	U testek	snRNP raktározás és összeszerelés ⁷²
	P-testek	mRNS bontás, csendesítés ⁷⁰
	Balbani-testek	oocitákban megtalálható átmeneti, membránkötött organelum ^{73,74}
	P granulumok	ivarsejt specifikus struktúra ⁷⁵
	cGAS-kondenzátumok	immunfolyamatok jelátvitelével megvalósító struktúra ⁷⁶
	Asszembliszómák	fehérjekomplexek összeszerelése, genotoxikus stressz elleni védelem ^{77,78}
Sejtmag	Cajal-testek	sejtmagi komplexek összeszerelése ^{79,80}
	PML testek	apoptózis, vírusok elleni védelem, transzkripció szabályozás ⁸¹
	Magifoltok	mRNS splicing ⁸²
	Parafoltok	RNS tárolás ⁸³

Számos membrán nélküli organelumra jellemző, hogy folyadékcseppekhez hasonló viselkedést mutatnak⁸⁴. Ennek hátterében az áll, hogy a membrán nélküli organelumok kialakulásában meghatározó szerepet játszik a 3.3 fejezet bevezetésében ismertetett folyadék-folyadék fázisszeparáció jelensége.

3.3.2. Az mRNS lokalizáció és a folyadék-folyadék fázisszeparáció szerepe a transzláció szabályozásban

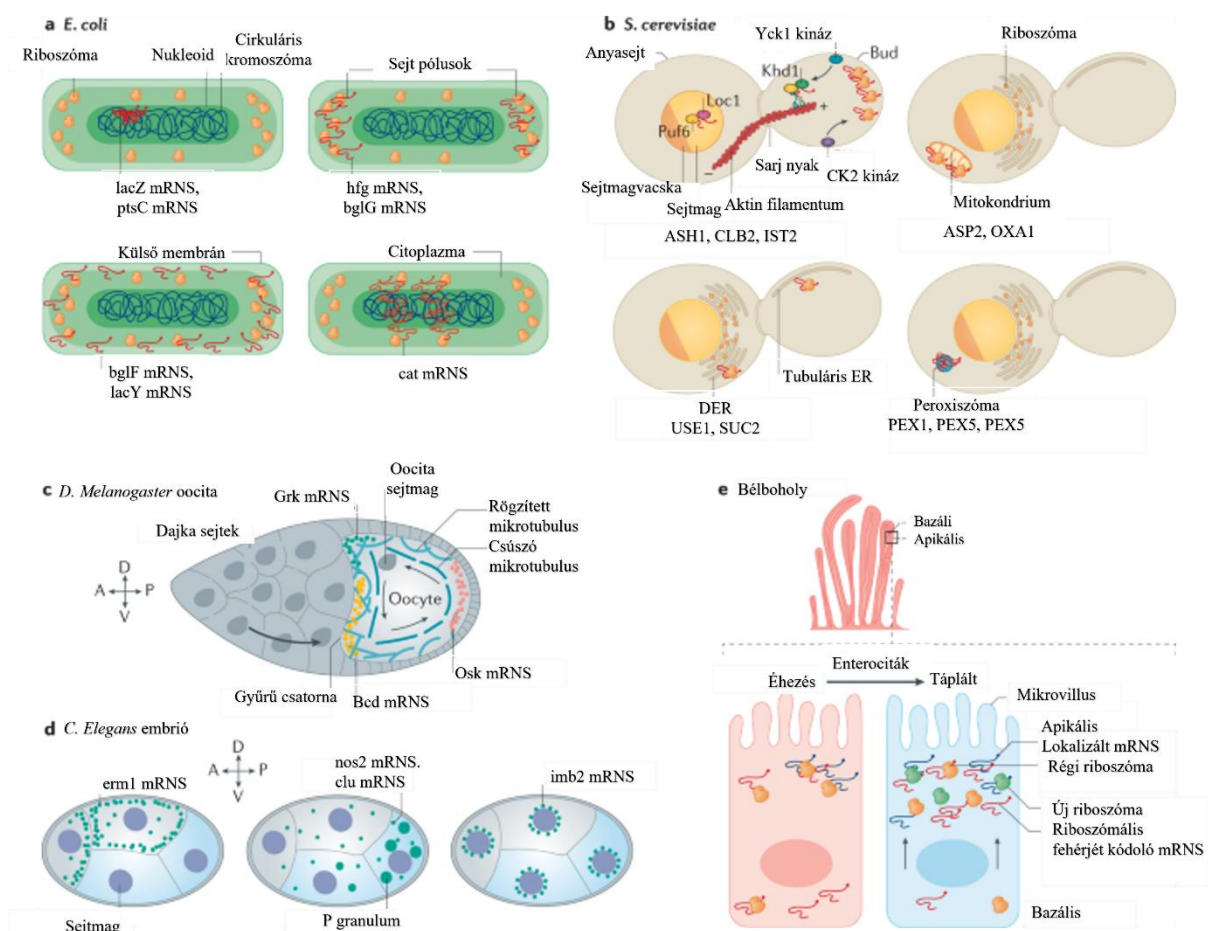
A sejtek egyes környezeti vagy belső ingerekre adott reakciójának finomhangolásához elengedhetetlen, hogy a génkifejeződési választ térben és időben percízen lehessen szabályozni. Ma már tudjuk, hogy egyes mRNS-ek transzlációja sok esetben a sejten belül kitüntetett régiókra korlátozódik. Ez a jelenség mind a prokariótákra, mind az eukariótákra jellemző⁸⁵.

A prokariótákról korábban azt feltételezték, hogy nem jellemző rájuk az mRNS-ek sejten belüli lokalizációjának szabályozása, mivel a sejtméretük kicsi, nem rendelkeznek membránnal körülhatárolt sejtalkotókkal és bennük a transzkripció és a transzláció térben és időben általában nem különülnek el egymástól. Azonban ma már tisztában vagyunk vele, hogy a prokariótákra is jellemző a nukleinsavak sejten belüli transzportja és a transzkripciós és transzlációs folyamatok elválasztása (5. ábra). Ezek az eredmények a modern képalkotó módszereknek köszönhetők, amelyek lehetővé teszik a transzláció valós idejű nyomon

követését⁸⁶⁻⁸⁸. Nagy növekedési rátával rendelkező *Escherichia coli*-ban megfigyelték, hogy a riboszómák nagyfokú térbeli szegregációt mutatnak a genomi DNS-től. Bár a transzkripció nagyrésze a translációhoz kapcsolatosan történik, a transláció jelentős hányada szabad mRNS-eken megy végbe, amelyek térben eltávolodtak a genomi DNS-től és riboszómákban gazdag sejtrégiókban lokalizálódtak⁸⁷. Ez merőben ellentétes a korábbi tudományos vélekedéssel. Ma már tudjuk, hogy a prokariótákban az mRNS lokalizáció lehet transláció-függő⁸⁹ vagy független is⁹⁰. Továbbá azt is megfigyelték, hogy bizonyos mRNS-ek felhalmozódnak azokban a sejtrégiókban, ahol az általuk kódolt fehérjék találhatóak. Például a citoplazmatikus klóramfenikol-acetiltranszferáz enzim⁹⁰, a transzmembrán laktózpermeáz⁹¹ vagy a membránkötött laktózpermeáz⁹⁰ esetében. A lacZ gén által kódolt β -galaktozidáz fehérje esetében a protein közelében megfigyelhető mRNS granulumokat is kimutattak^{92,93} (5. ábra a).

Az eukarióta élőlények közül az élesztőkre jellemző mRNS lokalizációs jelenségekről tudunk a legtöbbet. *Saccharomyces cerevisiae*-ben a She2–She3 fehérjekomplex környezetében több tíz mRNS lokalizálódik⁹⁴. A legjobban karakterizált ilyen jelenséget mutató mRNS az ASH1, amely az anafázis során a keletkező utódsejt csúcsában lokalizálódik és szállítása aktin filamentumok mentén valósul meg⁹⁵. Ez a szállítás translációosan inaktív állapotban valósul meg, különböző RNS kötő fehérjék segítségével^{96,97}. Az mRNS sejt szervecskékhöz történő lokalizációját is leírták. Mind az endoplazmatikus retikulum⁹⁸, mind a mitokondriumok⁹⁹ esetében (5. ábra b).

A soksejtű élőlényekben az mRNS lokalizáció és ez által a transláció szabályozása igen széles körben elterjedt és sokrétű jelenség. Ezt megfigyelhetjük, mind az egyedfejlődés során fellépő aszimmetrikus sejtosztódások, mind a kifejllett élőlényekre jellemző fiziológias válaszreakciók során. Előbbire példa a *Drosophila melanogaster* petesejtek fejlődése, amelynek során a petét körülvevő dajkasejtek látják el mRNS-ekkel a transzkripcióosan inaktív petesejtet^{100,101} (5. ábra c). A *Caenorhabditis elegans* embriogenezise során nélkülözhetetlen anyai mRNS-ek kerülnek átadásra a petesejt felé¹⁰² (5. ábra d). Emlősök esetében pedig a bélrendszerben figyelhető meg az apikális-bazális tengely mentén létrejövő mRNS transzport¹⁰³ (5. ábra e).



5. ábra – mRNS lokalizáció é lokalizált transzláció egysejtű és többsejtű élőlényekben⁸⁵

a: *E. coli* sejtben belüli kompartmentumok és a bennük lokalizálódó specifikus mRNS-ek; b: *S. cerevisiae* osztódása során a különböző sejt-kompartimentekben lokalizálódó mRNS-ek; c: *D. melanogaster* oogenezise során a mikrotubulusok mentén szállított RNS-ek; d: *C. elegans* anyai eredetű mRNS-ek lokalizációja korai embrió különböző sejtjeiben; e: humán vékonybél enterocitasejtek apikális – bazális tengelye mentén eloszló különböző mRNS-ek a tápanyag ellátottság függvényében A=anterior, P=posterior, D=dorzális, V=ventrális

Az eddig ismert RNS tartalmú granulumok közül a P-testekről és a stresszgranulumokról rendelkezünk a legtöbb információval.

A P-testek (angolul P-bodies, Processing bodies) a sejtplazmában megfigyelhető RNS-eket és fehérjéket tartalmazó granulumok, bennük az mRNS-ek transzlációban inaktív állapotban találhatók meg¹⁰⁴. A bennük található fehérjék döntő többsége 5'-3' irányú mRNS bontó funkcióval rendelkezik. Szerepük főként a génkifejeződés poszt-transzkripcionális szabályozásában van, de transzlációs szabályozási és mRNS tárolási folyamatokban is kulcsfontosságúak. A P-test jelenléte evolúciósan konzervált jelenség, amely az eukarióta élőlényekre általánosan jellemző⁶⁰.

A stresszgranulumok (SG), ahogy azt a nevük is sejteti, stresszhatások következtében alakulnak ki a sejtplazmában. Bennük mRNS-ek, transzláció iniciációs faktorok, a riboszóma kis alegysége, egyéb RNS-kötő és számos további funkcióval rendelkező fehérjék találhatók

meg. Megjelenésük fontos a sejt túlélése szempontjából, mivel szerepük van a transláció szabályozásában, mRNS tárolásban és különféle jelátviteli utakban is¹⁰⁵. Egyik fő szerepük abban áll, hogy olyan mRNS-ek translációját gátolják meg, melyek a sejt alapvető funkcióihoz nélkülözhetetlenek, azonban a stresszválaszban nem segítik a sejtet. Nagyfokú dinamizmus jellemző rájuk, vagyis a stresszhatás megjelenésekor rövid időn belül kialakulnak és a stressz - megszűntével gyorsan el is tűnnek⁶⁰.

3.3.3. A folyadék-folyadék fázisszeparáció szerepe a tumorigenezisben

A folyadék-folyadék fázisszeparáción keresztül megvalósuló tér- és időbeli szabályozó folyamatokban fellépő rendellenességek számos módon járulhatnak hozzá a tumoros betegségek kialakulásához¹⁰⁶. Akár a transzkripció¹⁰⁷, a genomintegritás¹⁰⁸, a kromatinszerkezet¹⁰⁹, az RNS érési folyamatok¹¹⁰ vagy a sejten belüli jelátviteli folyamatok diszfunkciója¹¹¹ is adódhat a fázisszeparációhoz köthető eltérésekhez. Ezen folyamatok mind alapvető jelentőséggel bírhatnak a tumorok kialakulásában, mivel kontrollálatlan sejtosztódáshoz, a sejthalállal szembeni ellenállás kialakulásához vagy metabolikus újraprogramozáshoz vezethetnek¹¹².

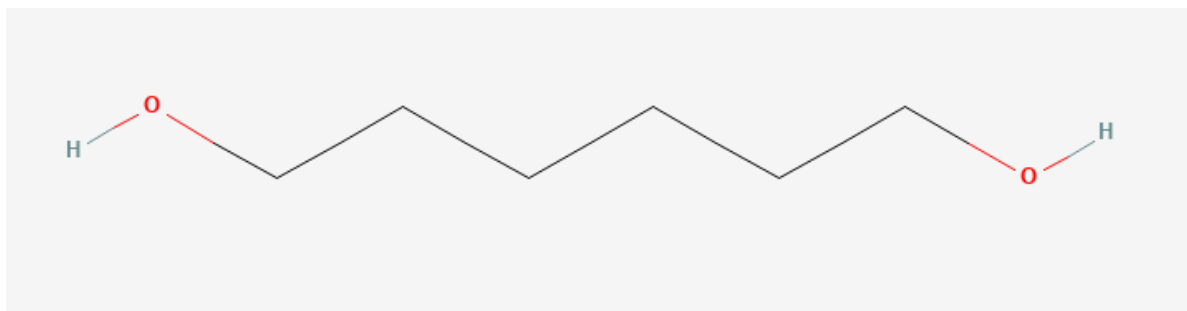
A rákos sejtek olyan genetikai mutációkat halmozhatnak fel, amelyek számos biológiai folyamat szabályozását befolyásolhatják a folyadék-folyadék fázisszeparáción keresztül. A fázisszeparációnak fontos szerepe van a kromatinszerkezet kialakításában, a transzkripció szabályozásában, a DNS hibajavításban és a tumorsuppressziós folyamatokban. Ennek következtében a fázisszeparációs folyamatokat érintő mutációk kontrollálatlan sejtosztódáshoz, a programozott sejthalál elkerüléséhez, angiogenezishez és áttétek képzéséhez vezethetnek^{112,113}.

Tumoros folyamatok hátterében állhat a parafoltok fázisszeparációval történő kialakulása, amely során génaktivációt befolyásoló¹¹⁴ vagy a Hippo útvonalhoz tartozó, YAP-aktivitást szabályozó faktorok koncentrálnak¹¹⁵. Nemrégiben kimutatták, hogy a sejtmagban megfigyelhető RNS és fehérje tartalmú kondenzátumok ligandum-függő superenhanszer aktivációt és transzkripciós aktivációt váltanak ki ER α , enhanszer régiókhoz történő bekötődésének hatására¹¹⁶. A korábban már ismertetett stresszgranulumok is szerepet játszhatnak olyan jelátviteli utakon keresztül, amelyek hozzájárulnak a tumorsejtek túléléshez, mint például a sejthalál elkerülése, az antitumorális immunfolyamatok kivédése vagy a kemoterápiával és radioterápiával szembeni rezisztencia^{117–119}.

3.3.4. A folyadék-folyadék fázisszeparáció vizsgálata

A folyadék-folyadék fázisszeparáció vizsgálatára számos megközelítés és vizsgálati technika áll rendelkezésre. A számítástechnikai módszerek közül kiemelendők a különböző prediktív algoritmusok, mint például a SEG szegmentáló algoritmus, amivel a globuláris, nem globuláris és alacsony komplexitású régiók azonosíthatók¹²⁰. A predikció információt ad arról, hogy a vizsgált fehérje hajlamos-e fázisszeparációra. Az elmélet kísérleti megerősítésére is számos módszer alkalmazható. Legegyszerűbb a kérdéses fehérje viselkedését vizsgálni, egyszerű összetételű oldatokban¹²¹. Az *in vitro* vizsgálatok során különböző vegyületek használhatóak, például a dextrán, a polietilén-glikol vagy a Ficoll¹²². A fázisszeparált struktúrák a mikroszkópos vizsgálatok során gömb alakú cseppekként jelennek meg. Az egyik legelterjedtebb mikroszkópos vizsgálati módszer a FRAP (fluorescent recovery after photobleaching, fluoreszcencia visszanyerés túlgerjesztés után). A FRAP egy nem invazív módszer, ami egyaránt alkalmas a kondenzátumokban fellépő folyamatok dinamikájának *in vitro* és *in vivo* vizsgálatára¹²¹. Egy másik megközelítés a fázisszeparáció jelenségének gátlása különböző kismolekulású anyagok segítségével. A leggyakrabban alkalmazott ilyen molekula az 1,6-hexándiol (HEX).

Az 1,6-hexándiol (vagy hexán-1,6-diol; molekulaképlete: $C_6H_{14}O_2$) egy kétértékű primer alkohol, vízben oldódó, színtelen, szobahőmérsékleten szilárd vegyület (6. ábra).



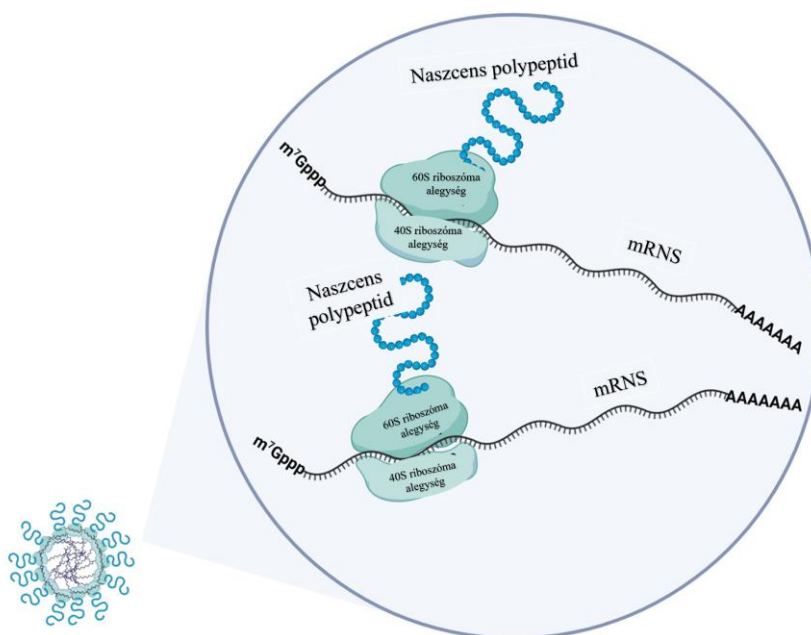
6. ábra – Az 1,6-hexándiol szerkezeti képlete¹²³

Az alacsony koncentrációjú HEX kezelés képes gátolni az *in vitro* fázisszeparációs folyamatokat¹²⁴. A HEX képes a gyenge, hidrofób fehérje-fehérje és fehérje-RNS kölcsönhatások megzavarására, ennek következtében alkalmas a fázisszeparációval létrejövő membrán nélküli organellek tulajdonságainak vizsgálatára¹²⁵. A HEX képes gátolni a stresszgranulák kialakulását¹²⁶. Az alkalmazott HEX kezelést minden esetben optimalizálni kell, mivel a vegyület túl magas koncentráció esetén képes penetrálni a sejtmagba, megzavarva

a kromatin fázisszeparációt. A HEX továbbá hatással van a kinázok és foszfatázok működésére, emellett a sejtek életképességére is negatívan hat^{127,128}. Mindazonáltal a HEX kezelés az egyik leghatékonyabb ismert vizsgálati módszer a folyadék-folyadék fázisszeparációs folyamatok vizsgálatára.

3.4. Az asszembliszómák jellemzése

Az asszembliszómák a közelmúltban felfedezett, RNS és fehérje tartalmú citoplazmatikus granulumok. Bennük transzlációban elakadt riboszóma-mRNS-naszcents fehérjelánc-komplexek találhatók (7. ábra), valamint kimutatható bennük a NOT1 fehérje jelenléte⁷⁸. Szerepük a génexpresszió poszttranszkripció szabályozásában van. Fehérjekomplexek kotranszlációs összeszerelődését teszik lehetővé⁷⁸ és szerepet játszanak a DNS károsodásra adott stresszválaszban^{129,130}. Az asszembliszómák más citoplazmatikus granulumokhoz hasonlóan folyadék-folyadék fázisszeparációval jönnek létre. Az asszembliszómákat először *Saccharomyces cerevisiae*-ben fedezték fel, szerepüket pedig az Rpt1 és Rpt2 proteoszóma alegységek összeszerelődésének folyamatában mutatták ki⁷⁸. Az Rpt1 és Rpt2 fehérjék affinitása egymáshoz gyenge, bakteriális expressziósrendszerben termeltetve nem képesek megfelelően kapcsolódni egymáshoz. A megfelelő interakció kialakulásához szükséges a transzláció megállítása és a képződő fehérjeláncok térbeli közelsége. A stresszgranumokkal ellentétben⁷⁰ az asszembliszómák nem csak a riboszóma kis alegységét, hanem a teljes 80S riboszómát tartalmazzák (7. ábra).



7. ábra – Az asszembliszómák sematikus ábrázolása⁷⁷

Az asszembliszómák EDTA-, RNáz- és cikloheximid-rezisztens granulomok. Ez megkülönbözteti őket a stresszgranulumoktól P-testektől és egyéb membrán nélküli organelumoktól (2. táblázat).

2. táblázat – A stressz granulomok, P-testek és asszembliszómák összehasonlítása⁷⁷

Jellemző	Stresszgranulomok	P-testek	Asszembliszómák
Az LLPS szerepet játszik a kialakulásukban	Igen	Igen	Igen
A bennük tárolt fehérjék ID/LC régiókban gazdagok	Igen	Igen	Igen
Kialakulásukban szerepet játszó tényezők	Stresszhatásra indukálódnak	Konstitutívák bizonyos sejtvonalakban, ám stressz hatására nő a számuk és a méretük	Stresszhatásra indukálódnak
Cikloheximid-kezelésre érzékenyek	Igen	Igen	Nem
RNáz-kezelésre érzékenyek	Nem	Igen	Nem
Riboszóma-alegységek jelenléte	40S	Nem azonosították a riboszómális alegységek jelenlétét	40S és 60S
Ülepítésükhöz használt sebesség	18 000 x g	10 000 x g	163 000 x g

Panasenko és munkatársai az élesztőn végzett riboszómaprofilozási kísérletek eredményeiből arra a következtetésre jutottak, hogy az azonosított mRNS-ek transzlációja riboszómavesztegléssel történik. Ez lehetővé teszi, hogy a riboszóma kivezető csatornájából kilógó naszcens fehérjeláncok kölcsönhatásba lépjenek egymással. A riboszómaveszteglés ebben az esetben az mRNS-ek DP motívumán (prolin és aszpartát) valósul meg. A ritka kodonpárok transzláció lassító/megakasztó szerepét már korábban igazolták¹³¹. Az asszembliszómákban nem történik új transzláció iniciáció, ennek következtében nem történik riboszómaütközés, az mRNS-en elakadó riboszóma-naszcens fehérjelánc-komplex stabilizálódik, elkerülve ezáltal a riboszómaminőség-ellenőrzési rendszert¹³². Ez a stabil állapot lehetőséget biztosít az interakciós partnereknek (riboszóma-naszcens fehérjelánc-komplexek) a kölcsönhatás kialakítására és ez által a ko-transzlációs összeszerelődési folyamatra⁷⁸. Továbbá fény derült arra is, hogy az Rpt1 N-terminálisának rendezetlen doménje nélkülözhetetlen a

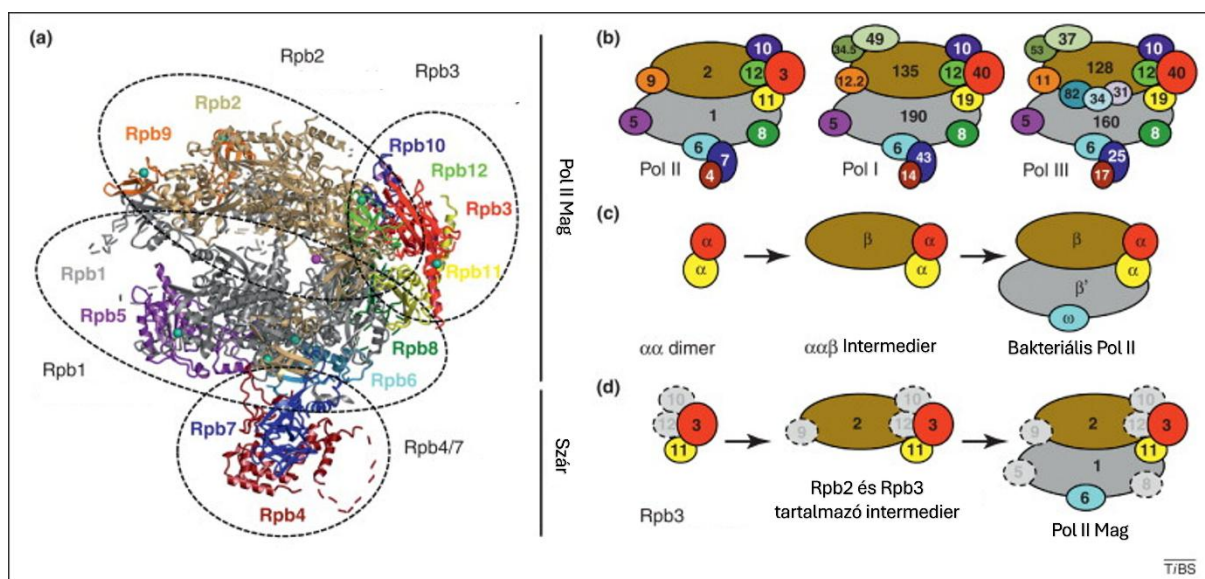
riboszómavesztégléshez⁷⁸. A NOT1 fehérje fontos szerepet tölt be számos ko-transzlációs mechanizmusban például az RNS-polimeráz II legnagyobb alegységének, az RPB1-nek (lásd 3.5 fejezet) vagy az Spt-Ada-Gcn5 hiszton-acetiltransferáz alegységeinek összeszerelésében¹³³.

3.5. Az RNS-polimeráz II és a Ccr4-Not komplex kapcsolata

3.5.1. Az RNS-polimeráz II felépítése, biogenezeise és működése

A DNS átírását RNS-é az eukarióta sejtek sejtmagjában három, egymással rokon – több alegységgel rendelkező – RNS-polimeráz végzi. Az RNS Pol I az rRNS prekursor szintézisét, a Pol II az mRNS és kis nem kódoló RNS-ek átírását, míg a Pol III tRNS és más kis rRNS-ek transzkripcióját végzi¹³⁴.

Az RNS-polimeráz II egy heterokomplex, mely 12 alegységből épül fel. Ezek között találunk kettő nagy, illetve több, kisebb méretű fehérjeláncot. Előbbi kettő, vagyis az RPB1 és az RPB2 az aktív centrum kettő, ellentétes oldalán helyezkedik el. Az eukarióta polimerázok felépítésére általánosan jellemző az, hogy központi részükön, egy az enzim aktivitásáért felelős maggal rendelkeznek, amely 10 alegységből épül fel¹³⁴. Az RNS-polimeráz II felépítését a 8. ábra mutatja.

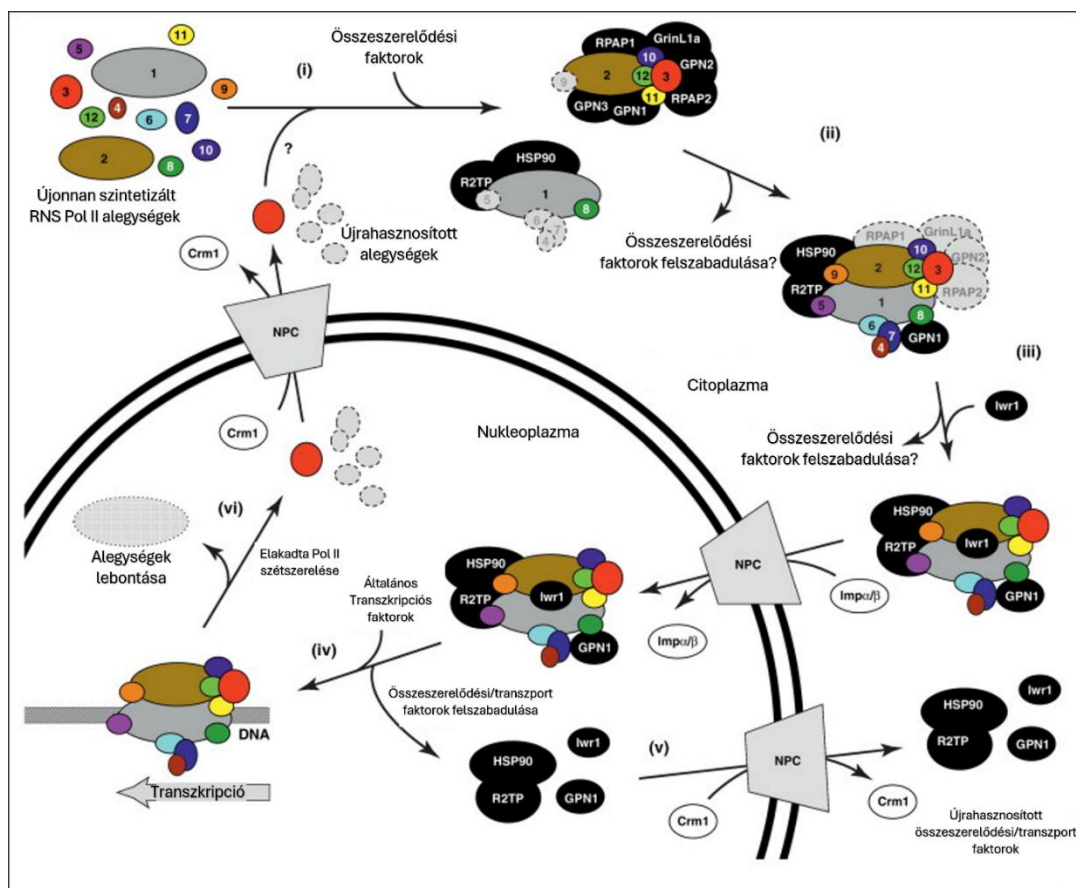


8. ábra - Az RNS-polimeráz II felépítése¹³⁵

Az ábra bal oldalán (a) az eukarióta RNS-polimeráz II felépítése látható a magot alkotó Rpb1, Rpb2, valamint Rpb3 komponensekkel és a perifériálisan elhelyezkedő RPB4-RPB7 alkomplexszel. Az ábra jobb oldalának a felső sorában (b) a három eukarióta RNS-polimeráz típus szerveződésének az összehasonlítása látható. Középen (c) a bakteriális RNS-polimeráz enzim felépülésének szintjei találhatók, míg a legalsó (d) sorban az RNS Pol II szerveződésének lépései figyelhetők meg¹³⁵.

Az RNS-polimeráz biogenezeise¹³⁵ a legtöbb ilyen nagyméretű makromolekuláris komplex létrejöttéhez hasonlóan olyan összeszerelést végző elemeket igényel, amelyek nem

részei a végső komplexnek. Ezek a faktorok a polimeráz élelciklusának egy vagy több szakaszában is fontos szerepet tölthetnek be. Ezek a szakaszok lehetnek: a polimeráz biogenezeise, sejten belül megvalósuló transzportja, a transzkripció vagy az enzim disszociációja, illetve degradációja. Az azonosított faktorok közé tartozik az R2TP komplex is a HSP90 segéd-chaperonjaként. Az R2TP segéd-chaperon szerepe kulcsfontosságú az intakt RNS-polimeráz II létrejöttéhez, hiszen rajta keresztül valósul meg a HSP90 chaperonnak az RPB1 alegységhez történő toborzása, amely HSP90 - a bekötődését követően – az RPB1 összekapcsolódását segíti az összeszerelődő polimerázzal. Mind a HSP90 dajkafehérjét kötő segéd-chaperon hiánya esetén, mind pedig a HSP90 működésének hiányában a Pol II komplex biogenezisének a zavara lép fel. Ez a citoplazmatikusan felhalmozódott RPB1 destabilizációjához vezet. Az RPB1 instabilitása következtében a citoplazmatikus RPB1 könnyen degradálódik, ami csökkent RPB1 szintet eredményez a sejtmagban¹³⁵.

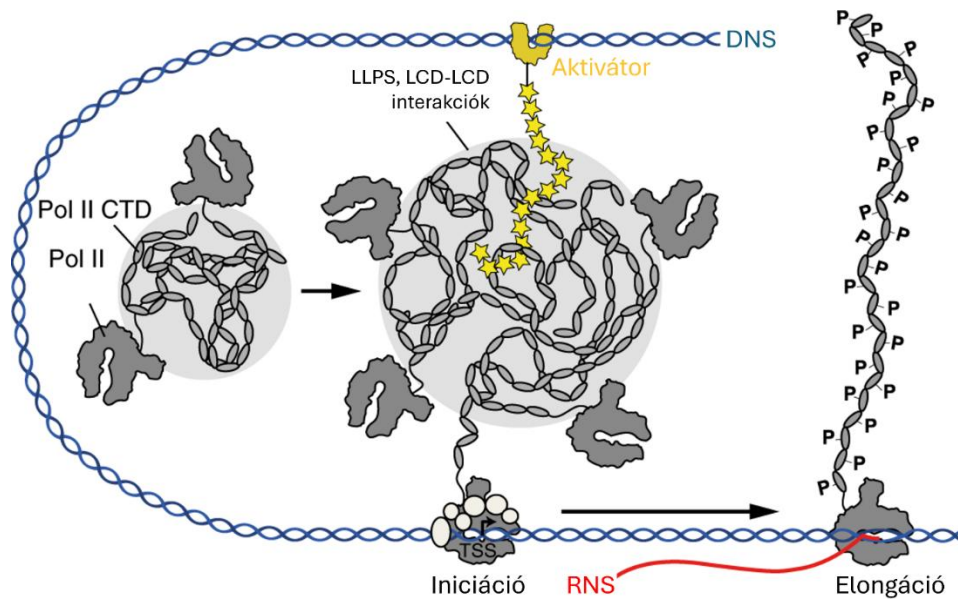


9. ábra - Az RNS-polimeráz II biogenezeise¹³⁵

Az RNS-polimeráz II biogenezisének modellje (i) a két fő intermedier kialakulása a 12 (1-12 jelölve) alegységből; (ii) a két intermedier az összeszerelődési faktorok (fekete) segítségével kapcsolódik egymáshoz; (iii) az összeszerelt polimeráz kapcsolódik az Iwr1 sejtmagi import adaptor fehérjéhez, majd az importin alfa/béta segítségével bejut a sejtmagba; (iv) a transzport és összeszerelődési faktorok leválnak a polimerázzal, mely így bekapcsolódik a transzkripcióba; (v) a szabaddá vált összeszerelődési faktorok kiáramolnak a citoplazmába; (vi) a Pol II elakadása az RPB1 alegység degradációját eredményezi, a többi alegység kiáramlik a citoplazmába

A polimeráz II alegységeinek hiánya az RPB1 alegység citoplazmatikus felhalmozódásához vezet. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az enzimnek teljesen össze kell állnia a citoplazmában mielőtt az a sejtmagba kerülhet, tehát a nukleáris transzport csupán a teljesen összeállított enzimekre korlátozódik. Ez egy olyan ellenőrzési pont, amely biztosítja, hogy csak a megfelelően összeszerelt és működőképes polimeráz II kerüljön a sejtmagba¹³⁶. Az alegységeken túl más, a biogenezisben résztvevő fehérjék hiánya is az RPB1 citoplazmatikus akkumulációjához vezet¹³⁵.

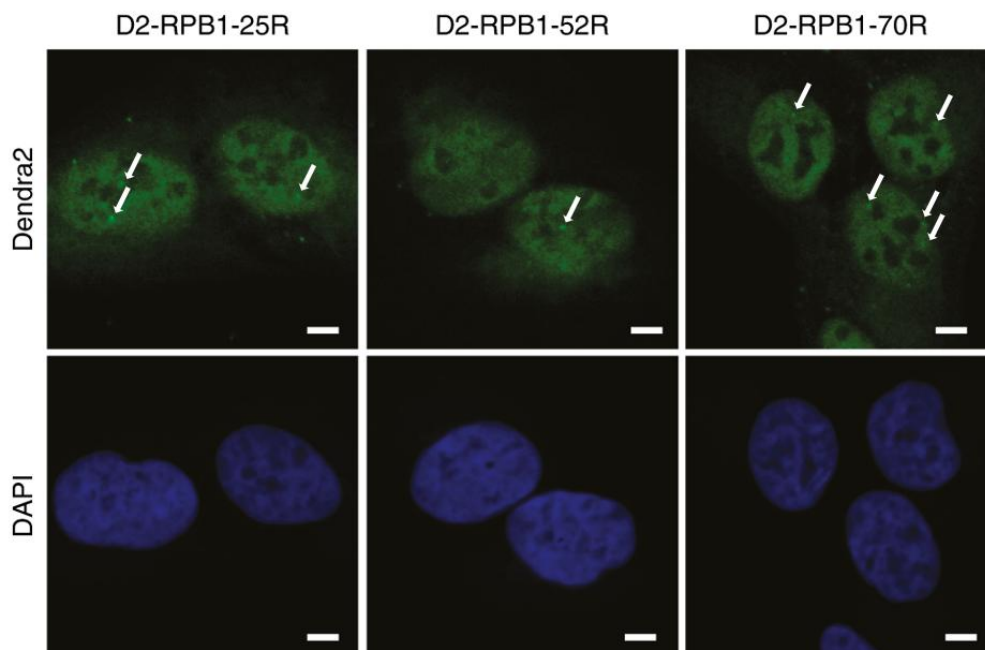
Az RNS-polimeráz II aktivitásához esszenciális a C-terminális domén, amely a legnagyobb alegység meghosszabbításaként alkotja a globuláris enzim külső szegmensét¹³⁷. Az RNS Pol II RPB1 alegységének C-terminális doménje (CTD) alapvetően egy rendezetlen, alacsony komplexitású régió, amely kritikus az mRNS transzkripciója és érése szempontjából. Az RPB1 alegység CTD régiója jellegzetes YSTPSPS aminosavsorrenddel rendelkezik. A régió ezen hét aminosavból álló ismétlődésekből épül fel, amelyek a 2-es, 5-ös, illetve a 7-es pozícióban szerint tartalmaznak. Ezen szerin aminosavak foszforilációs állapota határozza meg, hogy az RNS-polimeráz milyen transzkripciós szakaszban van. Az összes szerin pozícióban defoszforilált Pol II transzkripciósan inaktív. Az ötödik a pozícióban található szerin foszforiláltsága a transzkripció iniciációjában és elongációjában lévő polimerázra jellemző. A termináció során, illetve a transzkripcióban aktívan részt nem vevő RNS-polimeráz esetében ez az aminosav nem foszforilált. Az elongációs szakaszban az 5-ös szerin mellett a 2-es is foszforilált. A termináció során csak a 2-es szerin foszforilált¹³⁸. Ezen kitüntetett szerin aminosavak foszforilációja csak a magban található Pol II-re jellemző. A szerin aminosav, hidroxilcsoportjának köszönhetően rendkívül hidrofíllá teszi ezt a szakaszt, továbbá helyet biztosít a foszforiláció számára is¹³⁴. Az RNS Pol II működése során az RPB1 CTD doménjén keresztül megvalósuló interakciók által polimeráz csoportosulások alakulnak ki az aktív géneket tartalmazó kromoszómaszakaszokon (10. ábra).



10. ábra - A CTD- függő fázisszeparáción keresztül megvalósuló transzkripció aktiváció modellje¹³⁷

A fészforilátatlan RNS Pol II CTD-k fázisszeparációján keresztül kondenzátumokat képeznek a sejtmagban. A kondenzátumok aktivátor fehérjékhez kapcsolódnak. A CTD-k foszforilációja után elindul a transzkripció. TSS: transzkripció start hely

Az enzimek karboxi-terminális doménjei bekötődnek a transzkripciósan aktív gének promótereikhez, majd ezt követően a rendezetlen régióikon keresztül folyadék-folyadék fázisszeparációin mennek keresztül. Az így létrejövő kondenzátumokban Pol II feldúsulások jönnek létre^{134,137}.



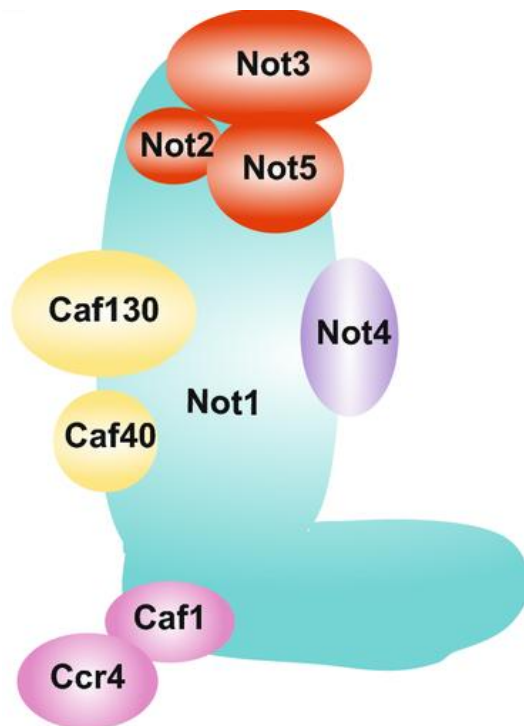
11. ábra - RPB1 kondenzátumok a sejtmagban¹³⁷

A fehér nyilak a sejtmagban megfigyelhető RPB1 fókuszokat jelölik; a különböző számú heptapeptid ismétlődéseket tartalmazó (25R, 52R, 70R) RPB1 fehérje variánsok sejtmagi fókusz létrehozására képesek.

3.5.2. A Ccr4-Not komplex szerepe a génkifejeződés folyamatában

A tradicionális felfogás szerint a transzkripció irányítja a génextpresszió későbbi (downstream) lépéseit, míg a visszafelé ható (upstream feedback) szabályozást sokáig elhanyagolhatónak tartották. Ma már tudjuk, hogy ezen folyamatok áttételesen fizikai kapcsolatban állnak egymással^{139,140}. A citoplazmában zajló transzláció képes visszahatni a sejtmagi transzkripció folyamatára. Ez például az RNS Pol II enzim, illetve a Ccr4-Not komplex kapcsolatán keresztül lehetséges. Eukarióta organizmusokban ugyanis a fehérjeszintézis és az mRNS degradáció folyamatát, a számos funkciót betöltő Ccr4-Not komplex, valamint az RNS-polimeráz köti össze egymással¹⁴¹.

Ccr4-Not az eukarióta élőlényekben megtalálható, evolúciósan konzervált nagy makromolekuláris komplex, melynek pontos összetétele fajspecifikus^{141,142}. Mivel, az egyes fehérjék pontos neve fajonként némileg eltér, az alkotófehérjékre a Ccr4-Not áttekintése során az általános megnevezésekkel hivatkozhatunk. A komplex számos alegysége közül hat (NOT1, NOT2, NOT5, CAF40, CCR4, illetve CAF1) az erősen konzervált core régiót alkotja¹⁴¹. A heterokomplex kettő fő funkcionális egységből – az eukarióták legfőbb deadenilázaként is ismert Ccr4-CAF, illetőleg a Not modulból – épül fel, ezek a NOT1 alegységhez csatlakoznak^{141,143}. A NOT1 vázként szolgál a teljes komplex összeszerelődéséhez. Kiemelt szerepe annak is köszönhető, hogy ez a komponens létesít kapcsolatot komplex alegységei (deadeniláz, ubikvitin ligáz) és azok mRNS szubsztrátjai között. A NOT1 továbbá képes az mRNS-hez kapcsolódni és ezáltal közreműködni annak lebontásában, vagyis a transzláció negatív szabályozásában¹⁴¹.



12. ábra – A CCR4-NOT deadeniláz komplex felépítése¹⁴⁴

A fehérjék az általános (nem fajspecifikus) megnevezésekkel jelölve szerepelnek az ábrán. Az egyes fehérjék neve eltérő lehet a különböző organizmusokban.

A Ccr4-Not komplex megtalálható a sejtmagban és a citoplazmában is¹⁴⁵. Ccr4-Not komplex eltérő eloszlást mutat a különböző sejt-kompartmentekben. A sejteknek folyamatosan és rövid időn belül kell alkalmazkodniuk a változó környezeti viszonyokhoz és stresszhatásokhoz. A Ccr4-Not képes a sejt igényeihez igazítani az expresszióban betöltött szerepét. A komplex által ellátott funkció összefügg annak sejtben belüli elhelyezkedésével, amely a sejtciklus szakaszainak megfelelően alakul¹⁴².

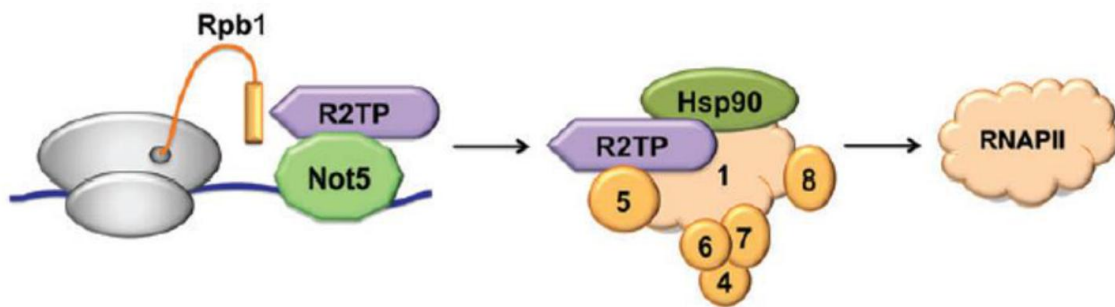
A Ccr4-Not komplex szerepet játszik a transzkripcióban, és az mRNS-ek citoplazmatikus degradációjában is^{141,146}. Az mRNS lebontásához az 5'-sapka, valamint a 3'-poli(A) struktúrájának a hidrolízisével járul hozzá. Ennek köszönhetően az RNS hozzáférhetővé válik a lebontását végző exonukleázok számára¹⁴². Amikor a Ccr4-Not komplex Not modulja a citoplazmában tartózkodik, közvetlenül is megtámogatja a transzláció folyamatát. Ez feltételezhetően egy olyan kör alakba szerveződő mRNS struktúrán keresztül valósul meg, amely szerkezetét az mRNS két végével kölcsönható fehérjék stabilizálják¹⁴⁷. Amikor a riboszóma, a transzláció elongáció folyamata során az mRNS-en mozgásba lendül, az mRNS 5' vége a komplex Not felőli oldalán foglal helyet. Ekkor a NOT4, RNS-felismerő motívumán keresztül az mRNS-t és az azt transzláló riboszómát a NOT5 közvetlen közelébe helyezi. A NOT5 a képződő naszcens fehérjelánc közelébe kerülve, a fehérje interakciókat segít elő. Ezt úgy éri el, hogy az elongáció alatt a naszcens polipeptidlánchoz chaperonokat vagy

egyéb interakciós partnereket toboroz, segítve ezzel a képződő fehérje érését, a helyes konformáció felvételét és az interakciós partnerekkel való kapcsolódását¹⁴¹. Az elongáció során, a transzlált mRNS 5' vége fokozatosan hozzáférhetővé válik a NOT1-asszociált DDX6 decapping enzim számára. Ennek következtében a 3' vége is képes kapcsolatot létesíteni az 5' vég kötődési helyének a közvetlen közelében található – CAF1 illetve CCR4 – deadeniláz enzimekkel. Miután a represszálni kívánt, nukleázokkal határolt mRNS végei térben közel kerülnek egymáshoz, a két vég eltávolítása összehangoltan mehet végbe a Ccr4-Not komplex irányításával. Így a fehérjeszintézis fokozása mellett, annak repressziója is megvalósulhat a transzlációval egy időben^{140,148}.

A Ccr4-Not sejtmagi és citoplazmatikus funkciói egymással összekapcsolódva működnek. Eukariótákban az mRNS végi struktúrák megléte mind a transzkript stabilitására, mind a transzláció hatékonyságára is hat, így a fehérjeszintézis és az mRNS degradáció egymással szorosan kapcsolt folyamatokká válnak^{140,142}. A Ccr4-Not részt vesz az általános, 5'-3' irányultságú mRNS lebontás mechanizmusában, amely a transzláció terminációját követi, de részt vesz a transzláció alatt megvalósuló degradációs eseményekben is. Képes olyan transzkriptek lebontására, amelyeknél a riboszómák tartósan elakadnak a terminációs jelzésen kívül vagy amelyek mutáns STOP kodont hordoznak¹⁴². Nem véletlen tehát, hogy a korábban ismertetett asszembliszómák jellemző fehérjéje a komplex központi egysége, a NOT1⁷⁸.

3.5.3. A Ccr4-NOT komplex szerepe az RNS-polimeráz II biogenezésében

Ccr4-Not „chaperonplatformként” betöltött funkciója nélkülözhetetlen a sejtek megfelelő működéséhez^{146,149}. A komplex képes hozzájárulni a sejtben fellelhető makromolekuláris komplexek összeszerelődéséhez és interakcióihoz a riboszómákon zajló fehérjeszintézis során¹⁴⁶. A komplex által szabályozott az RNS-polimeráz II ko-transzlációs összeszerelődése is. Az RNS Pol II nagy alegységének, az RPB1-nek a szintéziséhez ugyanis citoplazmatikus NOT5 szükséges¹⁴⁵. Ahhoz, hogy az RPB1 az RPB2 alegységgel kapcsolódva komplexet formáljon, mind a HSP90 chaperon mind pedig ennek ko-chaperonja, az R2TP jelenléte nélkülözhetetlen¹⁵⁰. Az R2TP ko-chaperon toborozza az RPB1 alegységhez a HSP90 dajkafehérjét, amely biztosítja annak megfelelő feltekeredését, illetve megvédi azt az aggregációtól (lásd. 3.5.1 fejezet). Az R2TP ko-chaperonnak ehhez az RPB1 fehérjét szintetizáló riboszómákon kell jelen lennie, amely csak NOT5 jelenlétében valósul meg¹⁴².



13. ábra - Az RPB1 kotranszlációs összeszerelődésének modellje¹⁴²

Az Rpb1 fehérje transzkripciója során a Not5 fehérje jelenléte szükséges az R2TP segéd-chaperon Rpb1-hez való kapcsolódásához (ábra bal oldala). A R2TP jelenlétében a HSP90 chaperon is képes kapcsolódni az Rpb1-hez ami így felveheti a megfelelő konformációját és képes kapcsolódni a Pol II többi alegységéhez (1, 4, 5, 6, 7, 8).

Az RPB1 rendkívül hajlamos az aggregációra, így a dajkafehérjék hiányakor RPB1 aggregátumok keletkeznek a citoplazmában. Az RPB1 a sejtben működő chaperonmolekulák kiváló indikátorfehérjéjeként tekinthető¹⁵⁰. Ugyanebből az okból adódóan a NOT5 alacsony koncentrációja a sejt plazmában szintén az RPB1 felhalmozódásához vezet¹⁴⁵.

Ennek következtében, ha azt kívánjuk vizsgálni, hogy a sejt chaperon rendszere milyen kapacitással üzemel, az RPB1 fehérje aggregációjának nyomon követése, egy megfelelő kiindulási alap lehet.

Az asszembliszómák további funkciójának vizsgálata céljából is fontos szerepe lehet az RPB1 aggregációjának, mivel limitált RNS Pol II esetén a transzkripció is csak alacsony szinten működik, így a sejt a fehérjeszintézishez már korábban megszintetizált mRNS-eket kell, hogy felhasználjon. Asszembliszómákban stabilizált, és raktározott mRNS-ekkel elméletben a stresszelt sejtek alternatív úton képesek lehetnek elérni a fehérje homeosztázist, még lassan csordogáló transzkripció mellett is.

4. Célkitűzés

Jelenlegi tudományos ismereteink alapján a tumoros folyamatok elindulásához és az így kialakuló betegségek kezelésére alkalmazott terápia elleni rezisztencia megjelenéséhez számos sejten belüli folyamat járulhat hozzá, amelyek közül nagy szerepe van mind a transláció szabályozásnak, mind a folyadék-folyadék fázisszeparációnak. Az RPB1 fehérje nélkülözhetetlen a transzkripcióhoz, így funkciójának kiesése esetén a sejt arra kényszerül, hogy a génkifejeződés poszttranszkripciós szabályozási elemei segítségével reagáljon a sejtet érő stresszhatásokra. Ez potenciális túlélési mechanizmus lehet a tumorsejtek számára, mivel ilyen esetekben a DNS-t károsító vagy transzkripciót célzó terápiás megközelítések nem bizonyulnak hatékony tumorelles kezelésnek. Az RPB1 aggregációja lecsökkent transzkripciós aktivitásra utal, továbbá a fehérje ko-transzlációs összeszerelődési mechanizmusának ismeretében a sejt általános chaperon kapacitásának és translációs állapotának indikátoraként is értelmezhető. Ezen felül a fehérje aggregációja utalhat arra, hogy a NOT1 fehérje elvonódik az RPB1 összeszerelődésétől és olyan organelumokba összpontosul, mint a SG-ok vagy az asszembliszómák, amelyek védelmet biztosíthatnak a sejteknek a kemoterápiával szemben.

Ezért munkánk során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az RPB1 fehérje aggregációja és a tumorsejtek terápiával szembeni ellenállása között fennálló összefüggés lehetőségét, valamint annak feltárását, hogy a terápiarezisztenciában van-e szerepe a folyadék-folyadék fázisszeparációnak, különösen az asszembliszómáknak.

Kérdéseink megválaszolásához emlőtumorbiopszia-mintákon, valamint MCF7 emlőtumor eredetű sejteken terveztünk vizsgálatokat végezni különböző immunhisztokémiai, immuncitokémiai festések, fluoreszcens mikroszkópia és modern molekuláris biológiai módszerek segítségével.

Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- 1) Az RPB1 fehérje aggregációja és a HSP90 chaperonfehérje eloszlása mutat-e összefüggést a kemoterápia hatékonyságával?
 - Az RPB1 és a HSP90 eloszlását terveztük vizsgálni ismert terápiás kimenetelű esetekhez tartozó invazív NST emlő karcinómából származó biopsziás mintákon.
- 2) Az RPB1 fehérje-aggregáció jelensége alkalmas-e a kemoterápiára adott válasz előrejelzésére?

- Az RPB1 aggregációs mintázatának eloszlását terveztük vizsgálni ismeretlen kimenetelű terápiás esetekhez tartozó invazív NST-mlőkarcinómából származó biopsziás mintákon, majd a minták feltételezett kimeneteli csoportokba történő kategorizálását terveztük elvégezni a. Ezt követően össze terveztük vetni az általunk készített besorolást az esetek valós kimenetelével.
- 3) Az emlőtumorok kezelésére széleskörűen alkalmazott epirubicin elleni rezisztencia kialakulásában szerepet játszhat-e a folyadék-folyadék fázisszeparáció és az asszembliszómák?
- Fluoreszcens mikroszkópia segítségével meg terveztük vizsgálni, hogy az MCF7 sejtekben jelen vannak-e asszembliszómák.
 - MCF7 tumorsejt kultúrákat terveztünk kezelni epirubicinnel, asszembliszómákat feloldó 1,6-hexándiollal külön-külön, majd kombinációban, és meg terveztük vizsgálni a sejtek túlélését.
- 4) Milyen géntermékek mutatnak translációs állapotváltozást epirubicin kezelés hatására?
- Epirubicinnel kezelt MCF7-tumorsejtkultúrákból és kontrollmintákból asszembliszómákat és poliszómákat tervezünk izolálni ultracentrifugálás segítségével, majd az így készített mintákat transzkriptomikai és proteomikai módszerekkel terveztük vizsgálni.

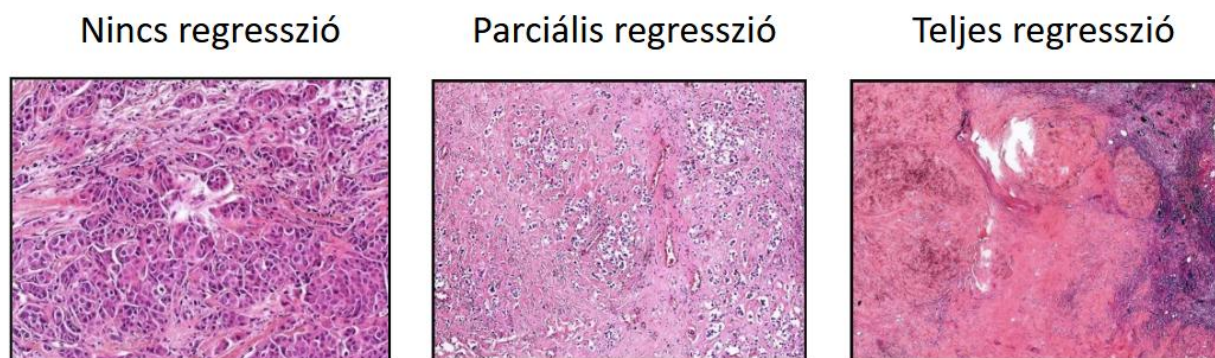
5. Anyagok és módszerek

Etikai engedély:

A humán minták gyűjtése, kezelése és felhasználása a Helsinki Nyilatkozat értelmében és a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével történt. Az engedély száma, a kiadás időpontja és a kérvényező neve: 5181/22-SZTE, 2022.05.16., Dr. Vörös András.

Szövetminták:

Kísérleteink során neoadjuváns kemoterápián átesett emlőtumoros betegek formaldehiddel fixált, parafinba ágyazott, kezelést megelőző core biopsziás mintáit használtuk fel. Kísérleteinkben a TR/NR score-t alapul véve, amely egyrészt a primer tumor (TR), másrészt a nyirokcsomó áttétek (NR) regressziójának mértékét értékeli¹⁵¹, a neoadjuváns terápiát követő regresszió mértéke alapján 3 csoportot (teljes, parciális, illetve nem regrediáló) alkottunk. A besorolásnál az eredeti kórszövettani leletben leírt regressziós fokozatot vettük figyelembe. A mintákhoz tartozó esetek jellemzőit az 1) Függelék tartalmazza.



14. ábra – Különböző TR/NR score regressziós állapotok emlőszövetben hematoxilin-eozin festést követően

Bal oldal: nem regresszáló esethez tartozó szövetmint; Középre: parciálisan regresszáló esethez tartozó szövetmint; Jobb oldal: teljesen regresszáló esethez tartozó szövetmint. Lilás színnel a sejtmagok, rózsaszínnel a citoplazma és a sejt közötti állomány látható. A sűrűn elhelyezkedő, nagy számú sejt a tumor jellemzője.

A minták között megtalálhatók voltak a vizsgálat során már ismert, illetve ismeretlen regressziós besorolású minták is. Az azonosíthatóság elkerülése érdekében a mintákat az azonosító számuk szerint növekvő sorba rendeztük és a továbbiakban a sorszámukkal jelöljük őket. Az azonosítószám a mintavétel sorrendje alapján került kiadásra, a regressziós típusra nem utal. A kísérletek során felhasznált mintákat és hozzájuk tartozó regressziós típusokat az 1) Függelék tartalmazza.

Szövetminták immunfestése:

A mintákat, a paraffin eltávolításának céljából, 10 percig xilolban áztattuk, szobahőmérsékleten. Ezt követően a szövetek nedvességtartalmának helyreállítására leszálló

alkoholsorba helyeztük (100% etanol – 6 perc; 95% etanol – 2 perc; 70% etanol – 2 perc, 50% etanol – 2 perc), majd desztillált vízben öblítettük a mintákat.

A formaldehides fixálás és a paraffinba ágyazás által létrejött, fehérjék közötti keresztkötések feloldása és az antigének szabaddá tétele céljából a mintákat felforralt citrátpufferbe (10 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$; 0,5 v/v% Tween20; pH=6,0) helyeztük 30 percre, majd nedves kamrában 2x5 percig foszfát pufferben (PBS) mostuk őket. A sejtmembrán permeabilizálására, illetve az aspecifikus kötőhelyek blokkolására 200 μl PBSTX-BSA 4% oldatot (1 v/v% Tween20; 3 v/v% TritonX100; 4 m/m% BSA PBS-ben oldva) mértünk a mintákra, majd nedves kamrában, szobahőmérsékleten 60 percen át inkubáltuk őket. Az inkubációs idő leteltével eltávolítottuk a blokkoló reagenst, majd ráértük a mintákra a blokkoló oldatban hígított elsődleges ellenanyagot (3. táblázat), majd egy éjszakán (~16 óra) keresztül 4 °C-on inkubációt végeztünk.

Az inkubációt követően eltávolítottuk a mintákról az elsődleges ellenanyagot, majd 5x5 percig szobahőmérsékleten PBS-ben mostuk, majd szintén PBS-ben öblítettük ezeket. Ezután a mintákra mértük a blokkoló oldatban hígított másodlagos ellenanyagot (3. táblázat), majd fénytől védve, szobahőmérsékleten 2 órán át inkubáltuk őket. Ezt követően eltávolítottuk a mintákról a másodlagos ellenanyagot, 3x5 percig PBS-ben mostuk szobahőmérsékleten, majd PBS-sel történő öblítés után DAPI tartalmú Fluoromount mounting mediummal (ProLong Gold Antifade Reagent - Thermo Fisher Scientific) fedtük a mintákat.

Az immunfestett minták vizsgálatára Olympus Fluoview FV10i konfokális mikroszkópot használtunk. A képek feldolgozása ImageJ szoftver segítségével történt. Mintánként összesen 4-8 felvételt elemeztünk. A felvételek átlagos területe 46,509 μm^2 volt.

Statisztikai elemzés:

Elemzést végeztünk az ismeretlen fenotípusú minták besorolási pontosságának kiszámítására¹⁵². A eredmények statisztikai szignifikanciájának értékelésére kiszámítottuk a hozzájuk rendelhető Matthews korrelációs koefficienseket¹⁵³.

Sejtkultúrák immunfestése:

A kísérletek során MCF7-sejtvonalat használtunk fel (gyártó: ATCC). A sejteket RPMI (Biosera) médiumban tartottuk fenn, amit 10%-os FBS-sel (EuroClone), 2 mM glutaminnal (Sigma-Aldrich), 0,01% sztreptomocinnal és 0,006% penicillinnel (Biowest) egészítettünk ki. A sejteket standard körülmények között tartottuk fenn, 37 °C-os inkubátorban 5%-os CO_2 és 95%-os páratartalom mellett. Az immunfestéshez felhasznált sejteket 6 lyukú szövettenyésztő lemezekben szaporítottuk fel. A lemezek lyukainak aljára 1x1 cm-es steril, üveg fedőlemezt helyeztünk, mielőtt a sejtszuszpenziót a lyukakba pipettáztuk. A lemez egyes lyukaiba 2 – 5 x

10⁵ sejttett transzferáltunk. A sejtszám függvényében 24-48 órát hagytunk a sejteknek, hogy letapadjanak a fedőlemezek felületén. Ezt követően eltávolítottuk a tápoldatot a sejtekről, majd 1 mL PBS oldattal mostuk őket, hogy eltávolítsuk a halott sejteket és a sejttörmelékeket. Ez után a sejteket formaldehiddel fixáltuk (4 m/v% paraformalehid PBS-ben oldva), 10 percig szobahőmérsékleten, a fixláshoz mintánként 1 mL oldatot használtunk. A formaldehid oldat eltávolítása után a mintákat háromszor mostuk 1 mL PBS oldattal 5-5 percen keresztül. Majd permeabilizáló-blokkoló oldatot (PBSTX-BSA) mértünk a mintákra (PBSTX-BSA 4% oldatot = 1 v/v% Tween20; 3 v/v% TritonX100; 4 m/m% BSA PBS-ben oldva). A mintákat ezután blokkoló oldatban oldott elsődleges ellenanyaggal (3. táblázat) inkubáltuk nedves kamrában, 16 órán keresztül 4 °C-on. Mintánként 100 µL oldatot használtunk. Az elsődleges ellenanyag eltávolítása után a mintákat ötször mostuk 1 mL PBS oldattal 5–5 percen keresztül. A mintákat ezután blokkoló oldatban oldott másodlagos ellenanyaggal (3. táblázat) inkubáltuk nedves kamrában, 1 órán keresztül 4 °C-on, fénytől védve. Mintánként 100 µL oldatot használtunk. A másodlagos ellenanyag eltávolítása után a mintákat ötször mostuk 1 mL PBS oldattal 5–5 percen keresztül. Végül DAPI tartalmú Fluoromount mounting médiummal (ProLong Gold Antifade Reagent - Thermo Fisher Scientific) fedtük a mintákat.

Az immunfestett minták vizsgálatára Olympus Fluoview FV10i konfokális mikroszkópot használtunk. A képek feldolgozása ImageJ szoftver segítségével történt.

3. táblázat - Ellenanyagok

Elsődleges ellenanyagok		
Ellenanyag típusa	Gyártó, katalógusszám	Hígítási arány
Anti- RNAPII ¹ (nyúl)	Abcam, ab26721	1:200
Anti-RNAPII CTD4H8 ² (egér)	Santa-Cruz, sc-47701	1:200
Anti-HSP90 (egér)	Santa-Cruz, sc-13119	1:200
Anti-NOT1 (nyúl)	Thermo Fisher, PA5-62024	1:100
Másodlagos ellenanyagok		
Goat Anti-Mouse Alexa 647 (piros)	Abcam, ab150115	1:1000
Goat Anti-Rabbit Alexa 488 (zöld)	Abcam, ab150077	1:1000

¹összes RNAPII CTD foszfrilációs állapot felismerésére alkalmas

²csak a Szerin-5 foszforilált RNAPII CTD felismerésére alkalmas

MTT Assay

A kísérletek során MCF7-sejtvonalat használtunk fel (gyártó: ATCC). A sejteket RPMI (Biosera) médiumban tartottuk fenn, amit 10%-os FBS-sel (EuroClone), 2 mM glutaminnal (Sigma-Aldrich), 0,01 % sztreptomomicinnel és 0,006 % penicillinnel (Biowest) egészítettünk ki. A sejteket standard körülmények között tartottuk fenn, 37 °C-os inkubátorban 5%-os CO₂ és

95%-os páratartalom mellett. Az MTT assay során a sejteket 96 lyukú lemezben növesztettük. A sejteket 100 sejt/lyuk sűrűségben transzferáltuk a 96 lyukú lemezbe, 100 µL tápoldatban, majd 12 órán keresztül inkubáltuk őket, hogy letapadhassanak a lemez aljára. Ezt követően lecseréltük a tápoldatot 100 µL friss tápoldatra, amely tartalmazta a kezeléshez használt anyagot, vagy nem tartalmazott egyéb anyagot (kontroll). A kezeléshez használt anyagok és koncentrációik:

- HEX: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 m/v%
- Epirubicin: 0,2; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 50,0 µg/mL
- Kombinált kezelés: 20,0 µg/mL epirubicin + 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 m/v% HEX

A kezelés időtartama minden esetben 24 óra volt. A kezelési idő letelte után a tápoldatot lecseréltük 100 µL friss tápoldatra, mely 50 µL tápoldatból és 50 µL MTT reagensből állt. A sejteket további 2 órán keresztül inkubáltuk, hogy metabolizálni tudják az MTT reagenst. Ezt követően eltávolítottuk a tápoldatot a sejtekről, és 50 µL DMSO-t pipettáztunk rájuk, majd spektrofotométer segítségével megmértük a minták abszorbanciáját 570 nm-en.

Lizátum preparálás és poliszóma-/asszembliszóma-dúsítás RNS, rRNS és fehérje vizsgálatához:

A kísérletek során MCF7-sejtvonalat használtunk fel (gyártó: ATCC). A sejteket RPMI (Biosera) médiumban tartottuk fenn, amit 10%-os FBS-sel (EuroClone), 2 mM glutaminnal (Sigma-Aldrich), 0,01% sztreptomicinnel és 0.006% penicillinnel (Biowest) egészítettünk ki. A sejteket standard körülmények között tartottuk fenn, 37 °C-os inkubátorban 5%-os CO₂ és 95%-os páratartalom mellett. A kezelések előtt a sejteket 10 cm átmérőjű steril Petri csészébe transzferáltuk 1 x 10⁵ sejt/mL sűrűségben. A sejteket 10 mL tápoldatban inkubáltuk. A sejteket ezután 24–48 órán keresztül inkubáltuk, hogy letapadhassanak a Petri csészék alján és újra induljon az osztódás. Az inkubáció addig tartott, amíg a konfluencia elérte a 70%-ot. Ezt követően a sejteket 24 órán keresztül kezeltük 20 µg/mL epirubicinnel, amelyet friss tápoldatban oldottunk fel, a kontroll sejtekre epirubicin-mentes tápoldatot mértünk.

A kezelési idő letelte után a sejteket steril sejtkaparóval lazítottuk fel a Petri csésze aljáról, majd a sejtet tartalmazó oldatot 50 mL-es Falcon csövekben 3000 rpm sebességgel centrifugáltuk 5 percig 4 °C-on, hogy kiülepítsük a sejteket. A tápoldat eltávolítása után a sejteket 1 mL PBS-ben re-szuszpendáltuk, majd megismételtük a centrifugálást ez alkalommal 1,5 mL-es Eppendorf csövekben. Ezt követően eltávolítottuk a PBS oldatot, a sejtpelleteket pedig folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk.

Riboszómák és a granulumok izolálásához az MCF7-sejteket összegyűjtöttük és 0,5 mL üveggyöngy segítségével 250 µL lízispufferben feltártuk/lizáltuk. A riboszómák és a

granulumok pelletálásához a következő összetételű lízispuffert használtuk: 16,7 mM TRIS-HCl (pH 8); 20 mM KCl; 0,3 mM MgCl₂; 1,5% Igepal; 1 mM DTT; proteázinhibitor-koktél (Roche, a gyártó által javasolt hígításban); RiboLock RNáz-inhibitor-koktél 1:100. Az EDTA-rezisztens granulumok ülepitéséhez a lízispuffert kiegészítettük EDTA-val, 25 mM végkoncentrációban alkalmazva. A mintákat 15 percig 4 °C-on ráztuk.

A frakcionálás első lépéseként egy gyors ülepitéssel (a mikrocentrifugát felpörgettük 1000 x g sebességre) a lizátumot megtisztítottuk az üveggyöngyöktől, majd ezt követően 10 percig 18000 x g fordulatszámmal centrifugáltuk a mintát 4 °C-on, hogy megszabaduljunk a sejttermeléstől, sejtmagtól, az aggregált fehérjéktől, P-testektől és SG-ktől. A felülúszóból 100 µl-t rétegeztünk fel 500 µL 60%-os cukor oszlopra (lízispuffer és 60% szukróz, szükség esetén kiegészítve 25 mM EDTA-val). Az EDTA-kezelt minták esetében a 100 µL felülúszót kiegészítettük EDTA-val, 25 mM végkoncentrációban. Az ultracentrifugálási lépés során a mintákat 4 órán át 50.000 rpm-en, 4 °C-on fugáltuk, a Sorvall MX 120/150 Plus MicroUltracentrifuge (Thermo Fisher Scientific) centrifugában, S55A2 rotort használva. Az ülepitést követően a pelleteket lízispufferbe oldottuk vissza a további RNS- és fehérjevizsgálathoz.

Újgenerációs szekvenálás:

Újgenerációs szekvenálás során az MCF7-sejtek riboszómapelletekből tisztított RNS-koncentrációját és integritását kapilláris gélelektroforézissel határoztuk meg, Agilent RNA 6000 Nano Kit alkalmazásával az Agilent 2100 Bioanalyzer eszközön a gyártó útmutatásait követve. Az indexált RNS-szekvenálási-könyvtárakat (két biológiai replikátum minden kezelési feltételnél) a TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) használatával készítettük el, a gyártó utasításait követve. A tisztított szekvenálási-könyvtárak koncentrációjának ellenőrzését és a fragmentek hosszát az Agilent DNA 1000 Kit segítségével az Agilent 2100 Bioanalyzer eszközön végeztük. A szekvenálási-könyvtárakat hígítottuk, egyesítettük és denaturáltuk. Végül megszekvenáltuk Illumina MiSeq eszközön a MiSeq Reagent Nano Kit v2-500 és a MiSeq Reagent Kit v3-150 (Illumina) használatával, 2 × 75 bp végű szekvenciák generálásával, 3 technikai replikátummal.

A FASTQ szekvencia fájlokat a GenerateFASTQ 1.1.0.64 szoftverrel állítottuk elő az Illumina BaseSpace-en. Az adaptereket és az alacsony minőségű szekvenciákat a TrimGalore segítségével távolítottuk el, majd a leolvasásokat a *Homo sapiens* referencia genomjára (GrCh38) illesztettük a HISAT2 algoritmus segítségével. A génspecifikus leolvasások számát R programban határoztuk meg (Bioconductor summarizeOverlaps) a GrCh38.104 transzkripció annotáció használatával.

Szekvenált adatok elemzése:

A UniProt adatbázisból töltöttünk le minden humán fehérjeszekvenciát. A fehérjék rendezetlenségére vonatkozó adatok megszerzéséhez az AlphaFold adatbázist használtuk. Abban az esetben, ahol nem sikerült az EDTA-pelletekből származó transzkripteknél leolvasásokat azonosítani, mesterséges pontszámot adtunk nekik (0,001), hogy kiszámíthassuk a $\pm$ EDTA leolvasási arányokat a teljes genomra vonatkozóan, minden azonosított riboszómához kapcsolt mRNS esetében.

Proteomikai vizsgálatok:

A mintákat S-trap oszlopon emésztettük a következőképpen. A mintákat (~30 μ L) trietil-ammóniumbikarbonát (TEAB) pufferrel egészítettük ki, majd a fehérjékben található szulfhidrileket MMTS-sel derivatizáltuk. Savanyítást követően metanolos-TEAB-pufferrel csaptuk ki a fehérjéket, amit az S-trap oszlopba belecentrifugáltunk, majd az oszlop mosása után a fehérjéket ammóniumbikarbonát (ABC) pufferben tripszinnel emésztettük 47 °C-on 2,5 órán át. Az emésztett mintákat LC-MS/MS analízisnek vetettük alá Orbitrap Fusion Lumos (Thermo) tömegspektrométeren, HCD fragmentációt alkalmazva. Az adatokat a Proteome Discoverer (v 1.4) programmal dolgoztuk fel, majd a ProteinProspector programmal (v 6.3.1.) kerestük le előbb a teljes SwissProt.2021.06.18 adatbázisban (565254 szekvencia) az esetleges szennyező fehérjék felderítése végett, majd csak humán fehérjékre, figyelembe véve az előzetes SwissProt lekeresés alapján talált szennyezőket (20406 szekvencia). 2 kihagyott hasító helyet engedélyeztünk. 5 ppm pontosságot használtunk a prekursorra és 0,6 Da pontosságot az ioncsapdában mért fragmens ionokra. Állandó módosítás: metiltio-Cys; lehetséges módosítás: Met oxidáció; acetilezett fehérje N-terminus; peptid N-terminus Gln gyűrűzárása piroglutaminná. Elfogadási paraméterek: fehérje, peptid FDR < 1%, minimum 2 peptid/fehérje. Az azonosan kezelt mintákban az egyes fehérjékre kapott (és az adott mintában azonosított összes peptidre) normalizált peptidszámok (normPepCount) átlagát vettük, majd ebből képeztük a kezelt/kezeletlen arányt, illetve *t*-tesztet is végeztünk, hogy a kezelés hatására bekövetkező változás mennyire tekinthető szignifikánsnak. A kísérleteket 2 biológiai-párhuzma mintán végeztük el, a bemutatott elemzést a két minta eredményeinek átlagán végeztük el. Az eredmények szórása alacsony volt (< 5%).

Génontológiai elemzés

Az azonosított találatokat génontológiai elemzésnek vetettük alá. Az elemzéshez a Panther 19.0 verziójú programot használtuk (<https://pantherdb.org/>). A vizsgált találatokat fehérjecsoport (Protein family) szerint csoportosítottuk, azokat a találatokat, amelyekhez nem volt hozzárendelhető ismert funkció a program adatbázisába, kizártuk az elemzésből. A

kísérleteket 2 biológiai-párhuzma mintán végeztük el, a bemutatott elemzést a két minta eredményeinek átlagán végeztük el. Az eredmények szórása alacsony volt ($< 5\%$).

6. Eredmények

6.1. Az emlőtumor-biopsziaminták fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálata

6.1.1. Az RPB1 aggregációs és a HSP90 eloszlási mintázatának vizsgálata ismert fenotípusú mintákon

A kutatás során, valamennyi esetben invazív karcinóma NST-preoperatív diagnózissal rendelkező, neoadjuváns kemoterápiával kezelt betegekből származó core biopsziamintákat vizsgáltunk. A vizsgált esetek jellemzőit az 1) Függelék tartalmazza. A nem specifikus típusú invazív emlőkarcinóma (Invasive breast carcinoma of no special type [NST]), korábbi nevezéktan szerint invazív duktális karcinóma, a leggyakoribb emlőtumor. A core biopszia, a diagnózis felállítását segítő első szövettani minta, amely információt ad a betegség stádiumáról és vizsgálhatók rajta különböző prediktív markerek (ER, PR, HER2, Ki67). A tumor egyedi jellemzőinek figyelembevételével meghatározható az optimális preoperatív, neoadjuváns kemoterápia. Az ilyen terápia akkor alkalmazható nagy hatékonysággal, ha a tumor lokálisan előrehaladott és nagy kiterjedésű (≥ 2 cm). A terápia célja a daganat regressziójának előidézése, azaz méretének csökkentése, ezzel megkönnyítve az operációt. A műtétet megelőző terápia eredménye az alábbiak szerint alakulhat (14. ábra):

- a terápia nem hatásos és a tumor mérete nem csökken vagy akár növekszik a kezelés során (nincs regresszió, azaz nem regrediáló);
- a terápia hatására a tumor mérete csökken, így könnyebben operálhatóvá válik, de nem tűnik el teljesen (parciális regresszió, azaz parciálisan regrediáló);
- egyes esetekben a daganat teljesen eltűnik (teljes regresszió, azaz teljesen regrediáló).

Az alkalmazott terápia minden esetben egyedi kombinációban tartalmaz különböző gyógyszereket. Az adott betegnél használt terápia a rendelkezésre álló információk alapján kerül megállapításra. A koktél tartalmazhat taxolszármazékot (pl. docataxel), monoklonális antitestet (pl. trastuzumab) vagy transzkriptiógátló szereket (pl. doxorubicin, epirubicin)¹⁵⁴. Minél több információ áll rendelkezésre, annál nagyobb a valószínűsége, hogy sikerül olyan kezelést kiválasztani, ami pozitívan befolyásolja majd a betegség kimenetelét. Az is létfontosságú információ lehet, ha az előzetes ismereteink alapján meg tudjuk becsülni, hogy a rendelkezésre álló szerek milyen valószínűséggel eredményeznek majd javulást az adott beteg esetében.

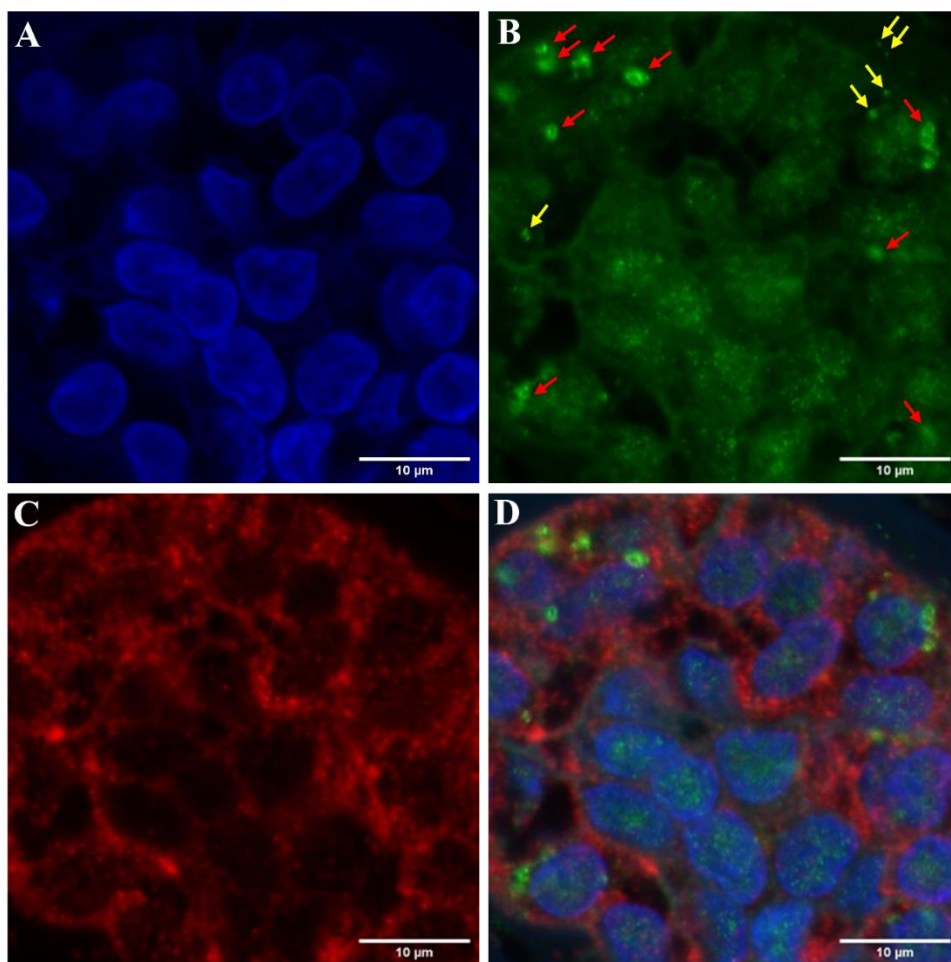
A kutatásunk során először azt vizsgáltuk meg, hogy az egyes ismert regressziós fenotípusú esetekhez tartozó core biopsziamintákban tudunk-e azonosítani olyan tulajdonságokat, amelyek összefüggést mutatnak a kezelés kimenetelével. Ennek érdekében az

RPB1 fehérje és annak biogenezésében fontos szerepet betöltő HSP90 chaperon sejten belüli eloszlását vizsgáltuk. Elméletünk háttérében az állt, hogy az alkalmazott neoadjuváns terápia gerincét jellemzően olyan szerek adják, melyek a transzkripciót blokkolják (doxorubicin, epirubicin), és ezen szerekkel szemben azok a tumorsejtek, amelyek képesek a transzkripció hiányát ellensúlyozni ellenállóak lehetnek. Az RPB1 elengedhetetlen a transzkripció folyamatához, ez a fehérje azonban hajlamos aggregációra^{145,150}. Az RPB1 nagyfokú aggregációja feltehetően megváltozott transzkripciós aktivitásra utal, ami arra enged következtetni, hogy a sejt képes a génkifejeződési folyamat egy vagy több későbbi elemének segítségével egyenlíti ki a megváltozott transzkripciót. A már korábban megszentetizált mRNS-ek satbilizálódása és transzlációban történő újrafelhasználása képes lehet stabil mértékű fehérjeképződést biztosítani. Ilyen kiegyenlítő hatása lehet az asszembliszórnáknak, melyek képesek a stresszválaszban, például DNS-károsodás, szerepet játszó géntermékek tárolására¹²⁹. További magyarázat lehet a citoplazmatikus RPB1 fókuszok jelenlétére, hogy a fehérje túlermelődik és ennek következtében aggregálódik, vagy nem áll rendelkezésre elég olyan faktorokból, amelyek az RPB1 helyes térszerkezetének kialakításához szükségesek. Ilyen faktorok például a HSP90, R2TP és a Ccr4-Not komplex elnei. Ennek tekintetében vizsgáltuk a HSP90 chaperonfehérje eloszlását is, mely nélkülözhetetlen az RPB1 megfelelő térszerkezetének kialakításában¹⁵⁰.

Az RPB1 és a HSP90 fehérjék sejten belüli mintázatat fluoreszcens immunhisztokémiai eljárást követő konfokális mikroszkópiás vizsgálatokkal követtük nyomon.

A regressziót nem mutató minták esetében az RPB1 morfológiai mintázatra jellemző volt, hogy nagy méretű ($>1\ \mu\text{m}$ átmérő) fókuszok voltak megfigyelhetők a citoplazmában. Ezen felül számos esetben fordultak elő kisebb méretű ($<1\ \mu\text{m}$ átmérő) citoplazmatikus fókuszok is (15. ábra). A sejtmagokban megfigyelhető volt az RPB1-re jellemző mintázat¹³⁷, ami apró fókuszokban nyilvánult meg (15. ábra). Ám a fluoreszcens jel intenzitása nem mutatott olyan éles kontrasztot a citoplazmához viszonyítva, mint a többi regressziós fenotípusba tartozó minták esetében (16. ábra, 17. ábra, 18. ábra). Ez arra utal, hogy az RPB1 nem koncentráldódik olyan mértékben a sejtmagban, mint a másik két fenotípusban.

A HSP90 esetében számos apró fókusz volt megfigyelhető a citoplazmában. A HSP90 esetében sejtmagi festődés nem volt megfigyelhető (15. ábra). Az egyes esetekhez tartozó minták jellemzését a 4. táblázat tartalmazza.

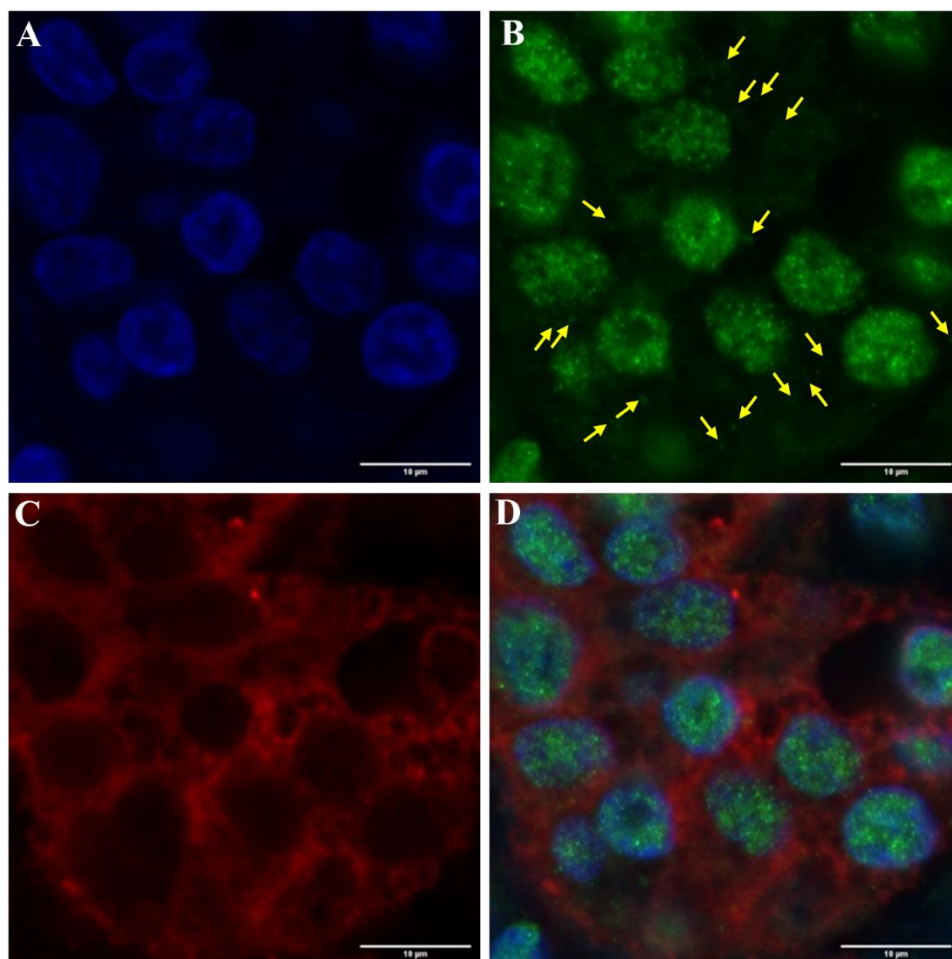


15. ábra – A nem regresszáló minták, RPB1 és HSP90 fehérjemintázatának reprezentatív mikroszkópos felvétele

A – DAPI festéssel a sejtmagok láthatók (kék); B – RPB1 fehérje eloszlása (Alexa488 - zöld), a piros nyilak a nagy méret a sárga nyilak a kis méretű citoplazmatikus fókuszokat mutatják; C – a HSP90 fehérje eloszlása (Alexa647 - piros); D – a három különböző festés egymásra vetített képe; a képek sarkában látható skála $10\ \mu\text{m}$ nagyságú

A parciális regressziót mutató minták esetében nagyszámú, ám kis méretű (<1 μm átmérő) citoplazmatikus RPB1-fókuszt figyelhattunk meg (16. ábra). Egyes esetekben nagyobb méretű fókuszok is láthatók voltak a citoplazmában. A sejtmagokban megfigyelhető volt az RPB1-re jellemző mintázat¹³⁷. A regressziót nem mutató mintákhoz viszonyítva a sejtmagi és a citoplazmatikus régiók között szemmel látható egyértelmű különbség volt megfigyelhető a fluoreszcens jel intenzitásában (18. ábra). Ez arra utal, hogy a parciális regressziót mutató esetekhez tartozó mintákban nagyobb volt a transzkripciós aktivitás mértéke, mint a nem regresszáló mintákban.

A HSP90 esetében egyenletes eloszlás volt megfigyelhető a citoplazmában, bár néhány minta esetében láthatók voltak kisebb citoplazmatikus fókuszok is. A HSP90 esetében sejtmagi festődés nem volt megfigyelhető (16. ábra). Az egyes esetekhez tartozó minták jellemzését a 4. táblázat tartalmazza.

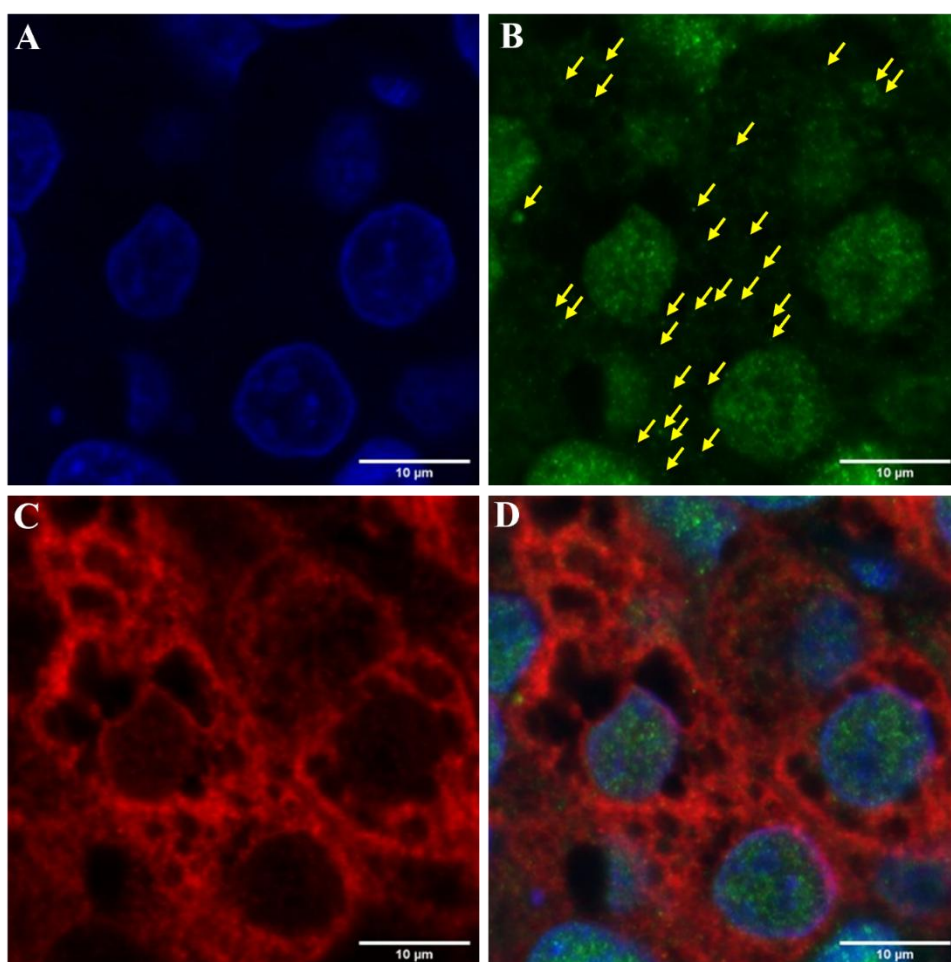


16. ábra - A parcilisan regresszáló minták, RPB1 és HSP90 fehérjemintázatának reprezentatív mikroszkópos felvétele

A – DAPI festéssel a sejtmagok láthatók (kék); B – RPB1 fehérje eloszlása (Alexa488 – zöld), a sárga nyilak a kis méretű citoplazmatikus fókuszokat mutatják; C – a HSP90 fehérje eloszlása (Alexa647 – piros); D – a három különböző festés egymásra vetített képe; a képek sarkában látható skála 10 μm nagyságú

A teljes regressziót mutató esetekben, a parciális regresszióhoz hasonlóan, nagyszámú, ám kis méretű (<1 μm átmérő) citoplazmatikus RPB1-fókuszt figyelhattunk meg (17. ábra). Egyes esetekben nagyobb méretű fókuszok is láthatók voltak a sejtplazmában. A sejtmagokban megfigyelhető volt az RPB1-re jellemző mintázat¹³⁷. A regressziót nem mutató mintákhoz viszonyítva sejtmagi és citoplazmatikus régiók között jelentős különbség volt megfigyelhető a fluoreszcens jel intenzitásában (18. ábra), ami ezen minták esetében is magasabb transzkripciós aktivitásra enged következtetni.

A HSP90 esetében egyenletes eloszlás volt megfigyelhető a citoplazmában, bár néhány minta esetében láthatók voltak kisebb citoplazmatikus fókuszok is. A HSP90 estében sejtmagi festődés nem volt megfigyelhető (17. ábra).

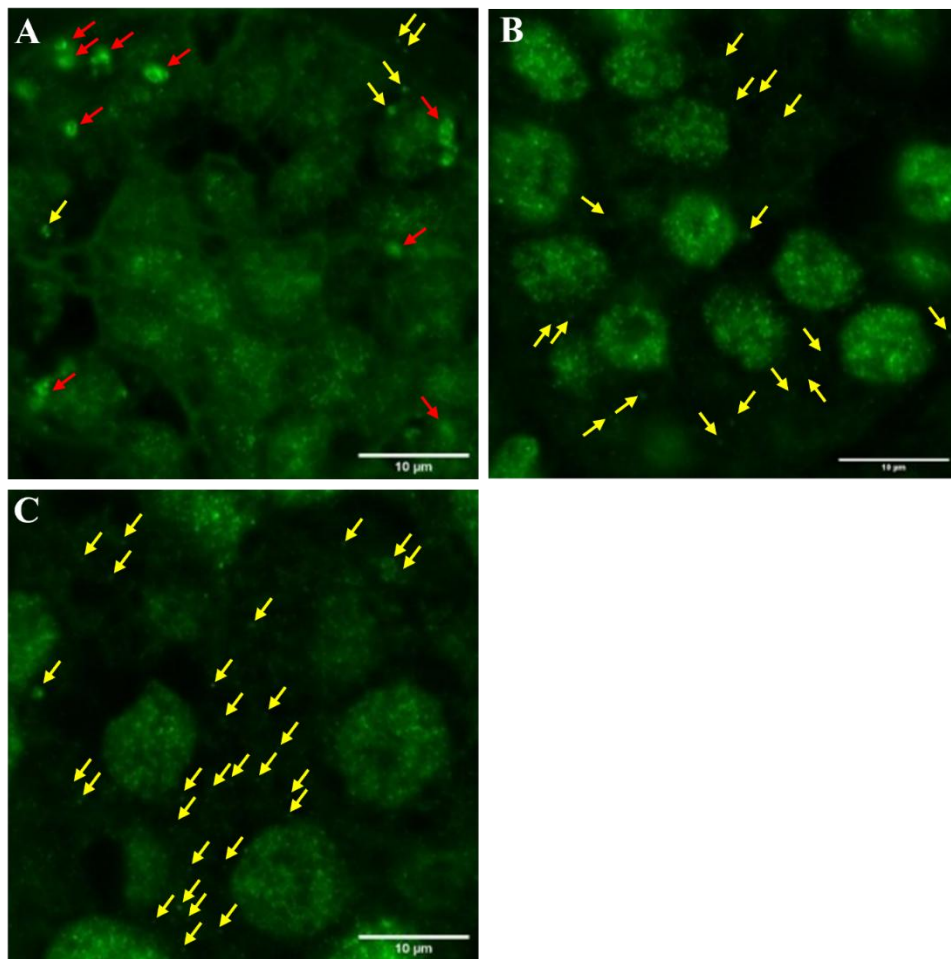


17. ábra - A teljesen regresszáló minták, RPB1 és HSP90 fehérjemintázatának reprezentatív mikroszkópos felvétele

A - DAPI festéssel a sejtmagok láthatók (kék); B - RPB1 fehérje eloszlása (Alexa488 - zöld), a sárga nyilak a kis méretű citoplazmatikus fókuszokat mutatják; C - a HSP90 fehérje eloszlása (Alexa647 - piros); D - a három különböző festés egymásra vetített képe; a képek sarkában látható skála 10 μm nagyságú

Korábbi ismereteink alapján inhomogén magi RPB1-eloszlást vártunk, ami a polimeráz működése során, annak C-terminális doménjén jelenlévő heptapeptid-ismétlődéseinek szerin foszforilációs állapotától meghatározó a fókuszok. A sejtmagvacskákban a polimeráz jellemzően nem detektálható¹³⁸. A nagyszámú sejtmagi denz folt ezáltal a transzkripció fokozottabb működéséről árulkodhat a tumorsejtekben. A három fenotípust összehasonlítva az RPB1-eloszlását tekintve megállapíthatjuk, hogy a polimeráz fehérje a nukleuszban minden esetben jelen volt, viszont annak sejtmagon belüli megoszlása alapján egyelőre nem figyelhető meg szabályszerűség. Az általunk készített felvételeken is jól kivehető a sejtmagra jellemző mintázat az apró, nem festődő sejtmagvacskákkal, illetve gócpontokkal (18. ábra). Megállapíthatjuk, hogy a parciális, illetve teljes regressziós csoportoknál jellemzőbb inkább a sejtmagi jelenlét, mint a citoplazmatikus. Erre a fluoreszcens jel intenzitásának különbségéből következtethetünk.

A regressziót nem mutató minták esetén kivétel nélkül megfigyelhetők nagyobb RPB1-fókuszok a citoplazmában, azonban eltérő számban. Ezzel szemben a teljes vagy parciális regressziót mutató mintáknál csupán 1–1 mintán fedeztünk fel nagy méretű fókuszokat (4. táblázat). A citoplazmatikus RPB1-fókuszok kapcsán megfigyeltünk egy olyan tendenciát, amely a tumorvizsgálat szempontjából a későbbiekben jelentőséggel bírhat. Azt tapasztaltuk, hogy nagyobb méretű RPB1 citoplazmatikus aggregátumoknak tűnő fókuszok magasabb valószínűséggel fordulnak elő olyan betegek mintáiban, akiknél nem jött létre regresszió. Azonban a regressziós mintákban is előfordulnak hasonló, ugyanakkor a korábbiaknál kisebb méretű fókuszok. A teljes, illetve a parciális regressziós minták esetén közel azonos volt a citoplazmatikus fókuszok mérete és mennyisége is. Azoknál a mintáknál tehát, ahol neoadjuváns kezelésre javulást nem tapasztalunk, nagyobb gyakorisággal találunk nagyobb méretű RPB1-aggregátumoknak vélt fókuszokat (18. ábra).

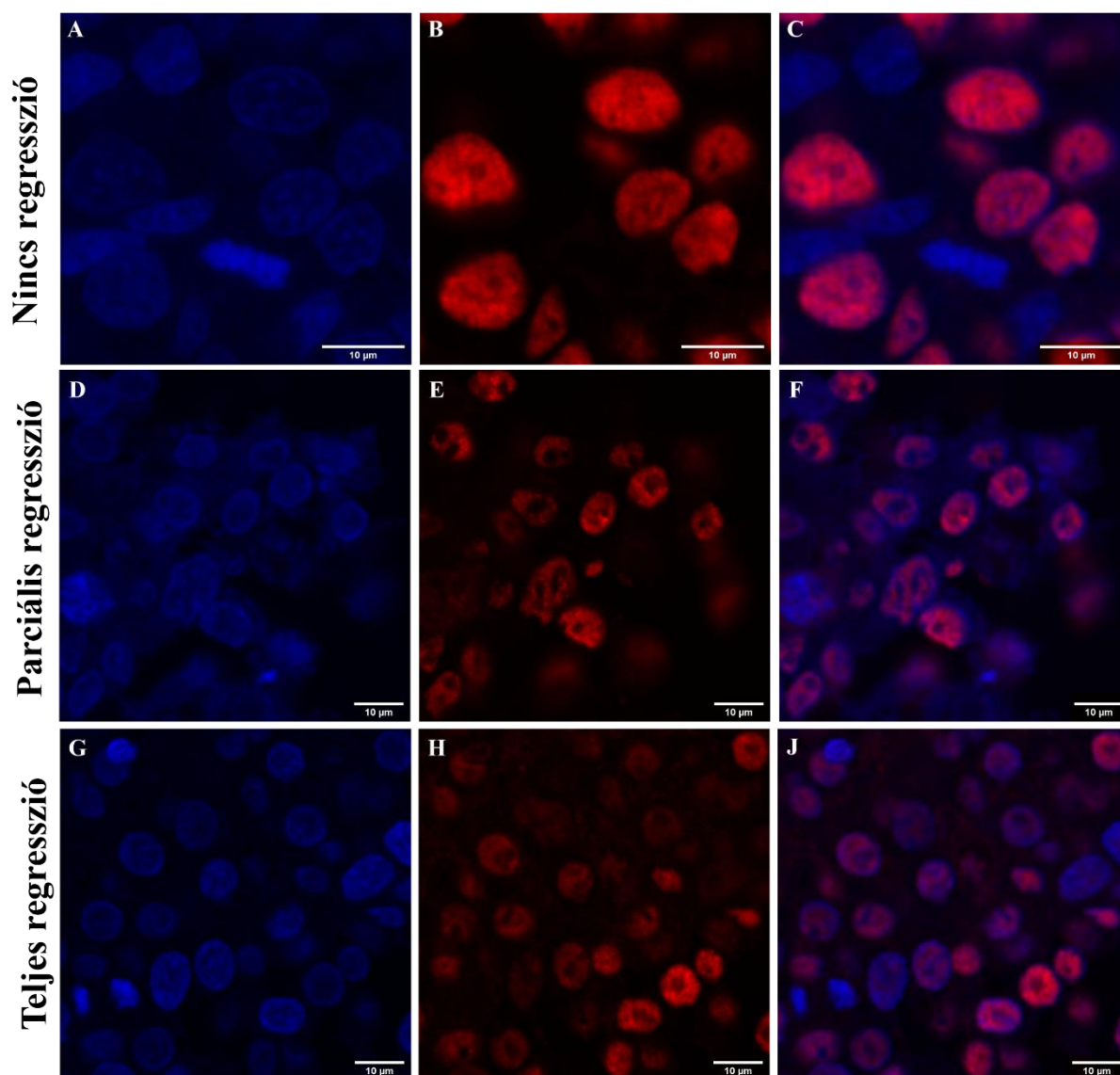


18. ábra – A három regressziós fenotípus RPB1 mintázatának összehasonlítás

A - Nincs regresszió; B - Parciális regresszió; C - Teljes regresszió; a piros nyilak a nagy méret a sárga nyilak a kis méretű citoplazmatikus fókuszokat mutatják; a képek sarkában látható skála 10 µm nagyságú

Annak megerősítésére, hogy az általunk detektált citoplazmatikus RPB1-fókuszok, nem a mintakezelési vagy az immunhisztokémiai eljárás eredményei, további kísérleteket végeztünk, amelyek során olyan elsődleges ellenanyagot használtunk, ami csak a C-terminális ismétlődő heptapeptid ötödik pozíciójában található szerin aminosav foszforilált állapotában ismeri fel az RPB1-et (sc-47701). Az RPB1 működési ciklusa során a heptapeptid ismétlődések különböző pozícióiban található szerinek foszforilációs állapota határozza meg, hogy az RNS-polimeráz milyen szakaszában van a transzkripciónak. Az ötödik pozícióban található szerin foszforilációja a transzláció iniciációjában és elongációjában lévő polimerázra jellemző. A termináció során illetve a transzkripcióban aktívan részt nem vevő RNS-polimeráz esetében ez az aminosav nem foszforilált¹³⁸. Azt tapasztaltuk, hogy az ötödik szerinen foszforilált RNS-polimeráz csak a magban lokalizálódik az összes regressziós fenotípusban (19. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy sem a mintakezelés, sem a festési eljárás nem okoz olyan hatást, ami mesterséges citoplazmatikus RPB1-fókuszok kialakulásához vezet. Továbbá támogatja, azt a

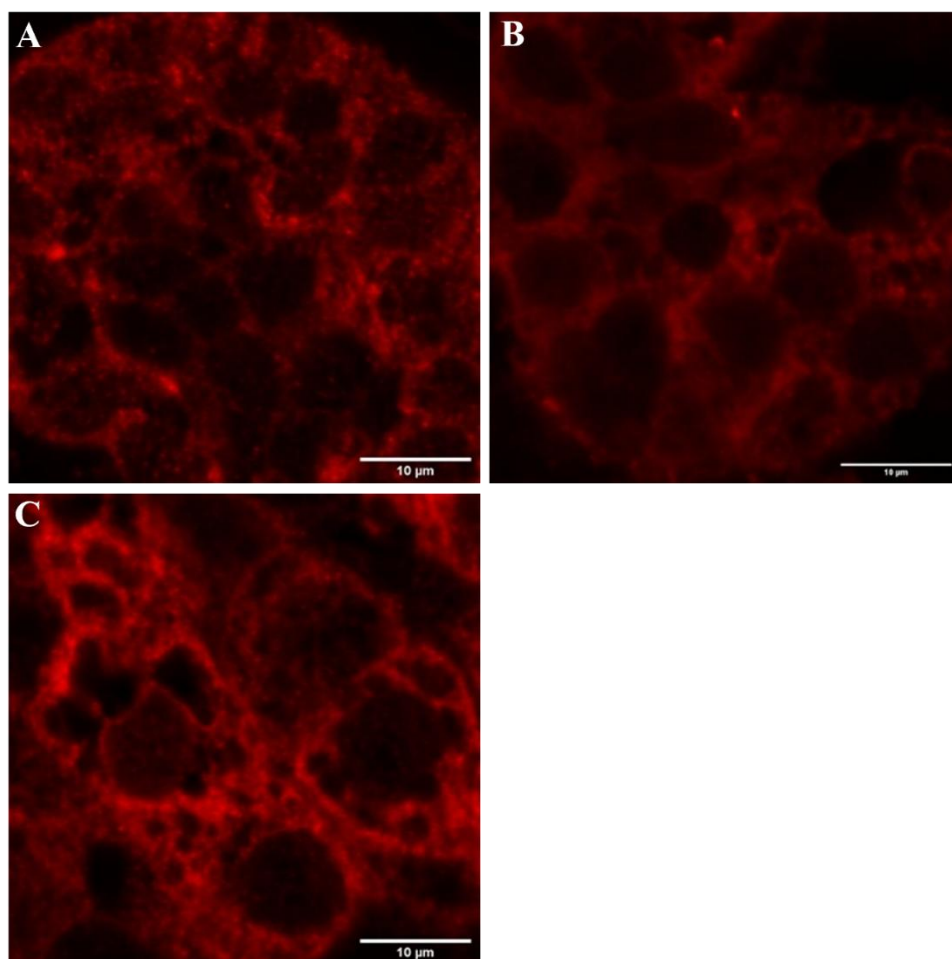
feltételezésünket, hogy az általunk megfigyelt citoplazmatikus fókuszokat, a transzlációban még részt nem vett RPB1-molekulák alkotják.



19. ábra – Szerin5 foszforilált RPB1 CTD lokalizációja a biopsziamintákban

A,B,C – Nincs regresszió; D,E,F – Parciális regresszió; G,H,I – Teljes regresszió; A,D,G – DAPI festéssel a sejtmagok láthatók (kék); B,E,H – Szerin5 foszforilált RPB1 CTD (Alexa647 - piros); C,F,I – a két festés egymásra vetített képe; a képek sarkában látható skála 10 µm nagyságú

A HSP90 chaperont illetően citoplazmatikus lokalizációt vártunk a sejtben betöltött szerepe, valamint a korábbi kutatásokból származó tapasztalatok alapján^{136,150}. Mi is a HSP90 citoplazmatikus jelenlétet tapasztaltuk a kísérleteink során (20. ábra). Az esetek döntő többségében a fehérje egyenletesen oszlott el a sejt plazmában. A HSP90 jele a magi régióval csupán egyetlen páciensből származó minta esetében mutatott kis mértékű átfedést (4. táblázat). Teljes bizonyossággal nem állapítható meg egyértelmű összefüggés a kemoterápiás fenotípus és a HSP90 festődése között. Az RPB1-hez hasonlóan a HSP90 fehérje festődésénél is előfordulnak eltérő méretű, aggregátumnak tűnő citoplazmatikus fókuszok. Egyes mintáknál az is megfigyelhető volt, hogy ott jelennek meg RPB1-aggregátumoknak tűnő fókuszok, ahol relatíve alacsony a HSP90 jele. Azonban ez csak kis számú mintára igaz (4. táblázat).



20. ábra - A három regressziós fenotípus HSP90 mintázatának összehasonlítás

A – Nincs regresszió; B – Parciális regresszió; C – Teljes regresszió; a képek sarkában látható skála 10 µm nagyságú

4. táblázat – A dolgozatban vizsgált egyedi minták RPB1 és HSP90 fehérje megoszlásának szöveges jellemzése

Minta	RPB1-mintázat		HSP90-mintázat	
	Sejtmag	Citoplazma	Sejtmag	Citoplazma
Nincs regresszió				
15722	diffúz	több nagy fókusz, diffúz	nincs	apró fókuszok, diffúz
15362	diffúz	nagyobb fókuszok	nincs	néhány nagyobb fókusz, diffúz
21192	lokalizált	több nagy fókusz, diffúz	nincs	nagyobb fókuszok, diffúz
19920	diffúz	főként kisebb fókuszok, illetve néhány nagy fókusz	nincs	nagyobb fókuszok, diffúz
Parciális regresszió				
17490	inkább a magban, lokalizált	diffúz háttér, sok apró fókusz	nincs	diffúz
12356	diffúz	több nagyobb fókusz	nincs	diffúz
15213	inkább a magban, lokalizált	diffúz háttéren, apró fókuszok	nincs	diffúz, szálak
18875	inkább a magban, lokalizált	diffúz	nincs	diffúz
19305	inkább a magban, lokalizált	apró fókuszok	minimális átfedés	diffúz háttér, sok apró fókusz
Teljes regresszió				
13126	inkább a magban, lokalizált	változatos méretű fókusz	nincs	diffúz, szálak
13452	inkább a magban, lokalizált	diffúz háttér, sok apró fókusz	nincs	diffúz, szálak
15428	inkább a magban, lokalizált	kevés apró fókusz	nincs	diffúz háttér, változatos méretű fókusz
8053	inkább a magban, lokalizált	kevés apró fókusz	nincs	diffúz háttér, változatos méretű fókusz

Az egyes mintákhoz tartozó felvételek a 2) Függelékben található.

6.1.2. Ismeretlen regressziós fenotípusú minták vizsgálata

A 6.1.1 fejezetben bemutatott eredmények alapján az RPB1 citoplazmatikus mintázata alkalmas prediktív marker lehet a neoadjuváns terápia sikerességének előrejelzésére. A HSP90 fehérje eloszlásában nem figyeltünk meg olyan mintázatot, mely összefüggést mutatott volna a terápia kimenetelével, így a továbbiakban csak az RPB1-fehérjét vizsgáltuk.

Kísérleteink során 13 olyan mintát vizsgáltunk meg, amelyek esetében előzetesen nem ismertük a regressziós fenotípust. Az ismeretlen fenotípusú mintákat a korábbiakkal azonos protokoll alkalmazásával immunfestettük, majd mikroszkóppal vizsgáltuk. A minták RPB1 mintázatát a korábbiakhoz hasonlóan jellemeztük, ezt követően a megfigyelt tulajdonságok alapján besoroltuk őket a feltételezett regressziós fenotípusokba.

5. táblázat – Az ismeretlen regressziós fenotípusú minták RPB1 mintázata és a prediktált fenotípusuk

Mintaszáma*	Citoplazmatikus RPB1-mintázat	Sejtmagi RPB1-mintázat	Prediktált fenotípus
1	erős jel, több nagy és néhány kis fókusz	erős magi jel, számos fókusz	Parciális regresszió
2	erős jel, néhány nagy és kis fókusz	erős magi jel, számos fókusz	Teljes regresszió
4	gyenge jel, néhány nagyobb és számos kis fókusz	gyenge magi jel, számos fókusz	Parciális regresszió
5	gyenge, néhány nagy és kis fókusz	gyenge magi jel, számos fókusz	Teljes regresszió
6	gyenge jel, kevés nagyobb fókusz	erős magi jel, számos fókusz	Nincs regresszió
7	gyenge jel, néhány nagyobb és számos kis fókusz	gyenge magi jel, számos fókusz	Nincs regresszió
14	gyenge jel, néhány nagyobb és számos kis fókusz	gyenge magi jel, számos fókusz	Teljes regresszió
16	gyenge jel, néhány nagyobb és számos kis fókusz	erős magi jel, számos fókusz	Parciális regresszió
17	gyenge jel, számos kis fókusz	erős magi jel, számos fókusz	Teljes regresszió
21	erős jel, számos nagy fókusz	erős magi jel, számos fókusz	Nincs regresszió
22	erős jel, számos nagy és kis fókusz	erős magi jel, számos fókusz	Parciális regresszió
23	gyenge jel, néhány nagyobb fókusz	erős magi jel, számos fókusz	Nincs regresszió
24	gyenge jel, számos nagy és kis fókusz	erős magi jel, számos fókusz	Nincs regresszió

*a mintaszám a mintavétel sorrendjét jelöli egy nagyobb mintasorozaton belül, a számsorrend nincs összefüggésben a regressziós fenotípussal.

Az egyes mintákhoz tartozó felvételek a 2) Függelékben találhatóak.

Végül összevetettük a feltételezett és a valós fenotípusokat, hogy megállapítsuk a besorolásunk pontosságát. A 13 vizsgált vak minta közül 10-et sikerül a valós regressziós fenotípusba kategorizálni, csupán a bennük megfigyelhető RPB1 aggregációs mintázat alapján (6. táblázat).

6. táblázat – A prediktált és valós regressziós fenotípusok összehasonlítása

Mintaszám	Prediktált fenotípus	Valós fenotípus	Besorolás helyessége
1	Parciális regresszió	Nincs regresszió	Téves
2	Teljes regresszió	Teljes regresszió	Helyes
4	Parciális regresszió	Parciális regresszió	Helyes
5	Teljes regresszió	Teljes regresszió	Helyes
6	Nincs regresszió	Nincs regresszió	Helyes
7	Nincs regresszió	Nincs regresszió	Helyes
14	Teljes regresszió	Teljes regresszió	Helyes
16	Parciális regresszió	Parciális regresszió	Helyes
17	Teljes regresszió	Parciális regresszió	Téves
21	Nincs regresszió	Nincs regresszió	Helyes
22	Parciális regresszió	Parciális regresszió	Helyes
23	Nincs regresszió	Parciális regresszió	Téves
24	Nincs regresszió	Nincs regresszió	Helyes

Az egyes mintákhoz tartozó felvételek a 2) Függelékben találhatóak.

Az összesített eredmények a 7. táblázatban bemutatott mátrixban találhatóak.

7. táblázat – Fenotípus besorolási mátrix

		Valós fenotípus		
		Teljes regresszió	Parciális regresszió	Nincs regresszió
Prediktált fenotípus	Teljes regresszió (n=3)	3	0	0
	Parciális regresszió (n=5)	1	3	1
	Nincs regresszió (n=5)	0	1	4

Az előrejelzési pontosság a regressziót nem mutató minták esetében 92%, a parciálisan regrediáló minták esetében 76% a teljesen regrediáló minták esetében pedig 84% volt. A besorolás pontosságát a Matthews-korrelációs koefficiens (MCC) segítségével adtuk meg¹⁵². A

Matthews-korrelációs koefficiens besorolási modell a tökéletes elméleti besorolás (MCC értéke 1) és a random találgatás (MCC értéke 0) közti kapcsolatot és az összesített pontatlanságot írja le. Ennek értelmében csak fals pozitív és fals negatív hibák állhatnak (melyek MCC-je -1) fent¹⁵³. Az MCC a regressziót nem mutató minták esetében 0,675 (8. táblázat), a parciálisan regrediáló minták esetében 0,5 (9. táblázat), a teljesen regrediáló minták esetében pedig 0,8216 (10. táblázat) volt.

8. táblázat – Nem regrediáló fenotípusba történt besorolás

	Valós fenotípus			Hiba ráta = 2/13 (15,385%)
Prediktált fenotípus		Pozitív	Negatív	Pontosság = 11/13 (84,615%)
	Pozitív	4	1	Fals pozitív = 1
	Negatív	1	7	Fals negatív = 1
				MCC = 0,675

9. táblázat – Parciálisan regrediáló fenotípusba történt besorolás

	Valós fenotípus			Hiba ráta = 3/13 (23,077%)
Prediktált fenotípus		Pozitív	Negatív	Pontosság = 10/13 (76,923%)
	Pozitív	3	2	Fals pozitív = 2
	Negatív	1	7	Fals negatív = 1
				MCC = 0,5007

10. táblázat – Teljesen regrediáló fenotípusba történt besorolás

	Valós fenotípus			Hiba ráta = 1/13 (7,692%)
Prediktált fenotípus		Pozitív	Negatív	Pontosság = 12/13 (92,308%)
	Pozitív	3	0	Fals pozitív = 0
	Negatív	1	9	Fals negatív = 1
				MCC = 0,8216

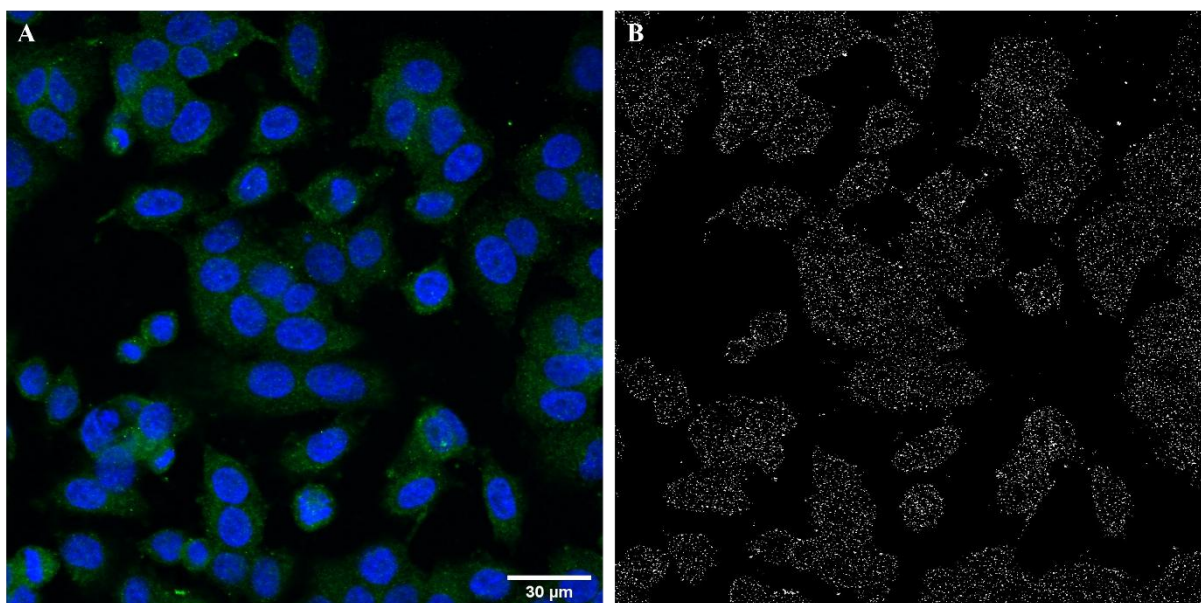
Ezek az eredmények bizonyítják az RPB1 citoplazmatikus aggregációs mintázatának prediktív markerként való alkalmazásának validitását.

6.2. Asszembliszómák vizsgálata MCF7 emlőtumorsejtvonalban

Az eddigiekben bemutatott eredményeink arra utalnak, hogy a fázisszeparációnak fontos szerepe lehet az emlőtumorok kemoterápiával szembeni rezisztenciájának kialakulásában. Az elmélet további vizsgálatához olyan modellrendszerre volt szükség, amelyben közvetlenül tudjuk vizsgálni a kemoterápiában alkalmazott szerek által kiváltott hatás és a folyadék-folyadék fázisszeparáció összefüggéseit. Ezen kísérletek lefolytatásához az MCF7-sejtvonalat választottuk, amely egy emlőtumor eredetű sejtvonal¹⁵⁵.

6.2.1. Asszembliszómák jelenlétének kimutatása fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálatokkal

Első körben azt a kérdést tettük fel, hogy kimutatható-e asszembliszómák jelenléte az MCF7-sejtekben. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához, fluoreszcens immuncitokémiai megközelítést alkalmaztunk. Az asszembliszómák eddig ismert jellemző fehérjéjének, a NOT1-nek⁷⁸ az eloszlását vizsgáltuk. Az immunfestésen látható (21. ábra), hogy a NOT1 jellemzően a citoplazmába lokalizálódik és számos apró fókusz figyelhető meg, ami feltételezhetően asszembliszómák jelenlétére utal.



21. ábra – Az MCF7 sejtekben megfigyelhető citoplazmatikus NOT1-fókuszok

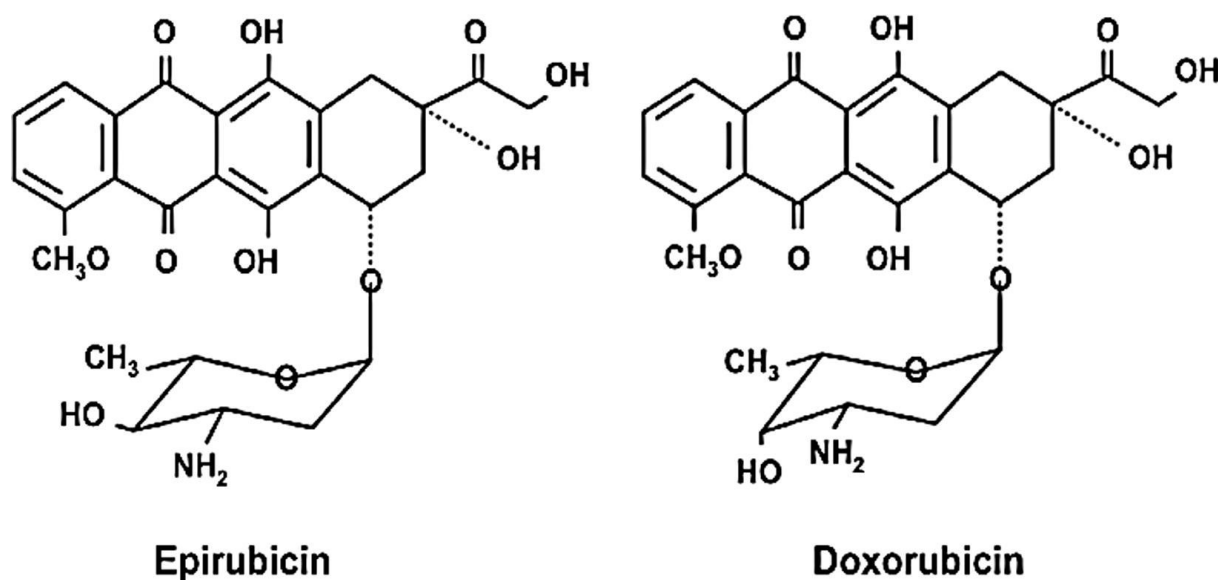
A – a NOT1 fehérje zöld-el (Alexa488) a sejtmagok kékkel (DAPI) láthatók; B – a NOT1 fókuszok; a képek sarkában látható skála 30 μm nagyságú

Ezen citoplazmatikus fókuszok jelenléte a tumorsejtekben tovább erősíti azt a feltételezésünket, hogy a fázisszeparálódó asszembliszómák jelenléte, funkciójuk teljes transzkriptomszintű vizsgálatára érdemes, mivel az összefüggésbe hozható a kemorezisztencia jelenségével.

6.3. A fázisszeparáció kemoterápia-rezisztenciában betöltött szerepének vizsgálata

A neoadjuváns kemoterápia jellemzően egy kombinált kezelés, melyben több különböző hatásmechanizmusú gyógyszerrel kezelik a beteget. Ezen gyógyszerek egyedi kombinációját a tumorról rendelkezésre álló előzetes információk alapján határozzák meg³³. Ilyen információk jellemzően a core biopszián vizsgált prediktív markerek jelenléte (lásd: 3.1.2 fejezet).

A kezelés gerincét sok esetben olyan vegyületek adják, amelyek képesek beépülni a DNS-be, ez által megakadályozni a transzkripciót és a DNS replikációt. Ilyen vegyületek például az antraciklin-származékok, mint a doxorubicin és az epirubicin. Az epirubicin a doxorubicin 4'-epimere, a vegyületek közti különbséget a daunozamingyűrű 4' pozíciójában található szénatomjához kapcsolódó hidroxilcsoport orientációja adja (22. ábra).



22. ábra – Az epirubicin és a doxorubicin szerkezeti képlete³⁵

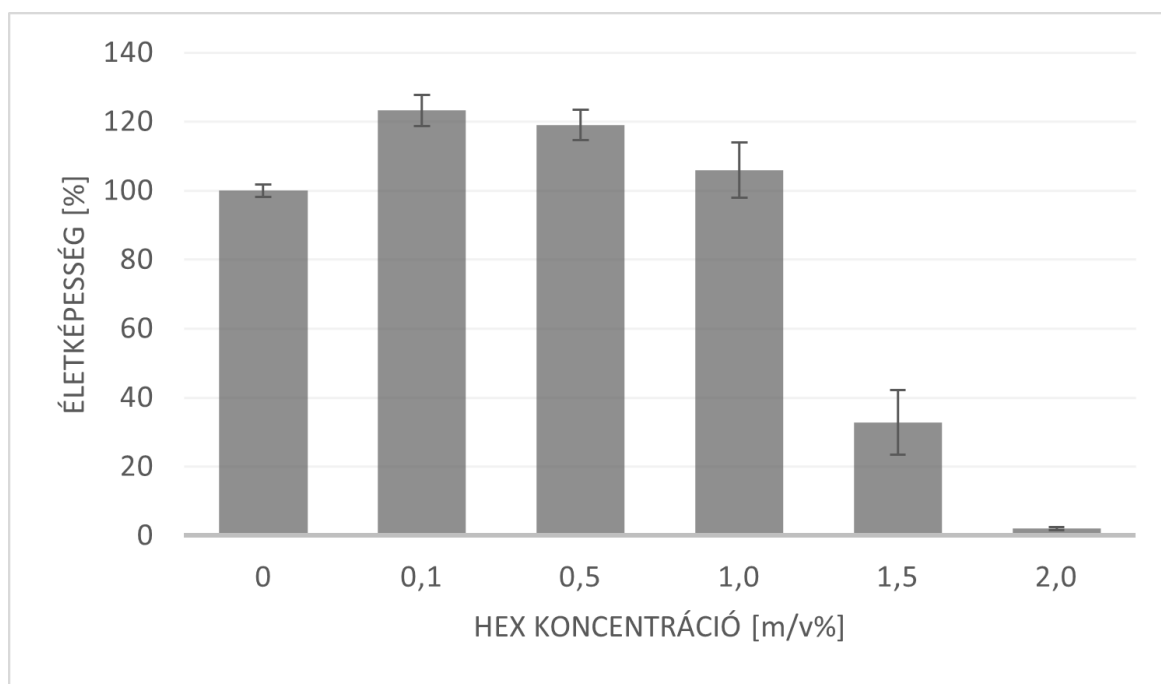
Az epirubicin egy széles körben alkalmazott terápiás szer, amelynek alkalmazása preferált az emlőtumorok esetében, a doxorubicinnal szemben, alacsonyabb kardiotoxicitási tulajdonságának köszönhetően³⁵. A DNS-be integrálódva gátolja a topoizomeráz II aktivitását, valamint szabadgyökök keletkezését idézi elő¹⁵⁶.

Kísérleteink során az epirubicin hatékonyságának és a folyadék-folyadék fázisszeparációnak a lehetséges összefüggéseit vizsgáltuk, mivel azt feltételeztük, hogy az asszembliszómák hatékony védelmet biztosíthatnak olyan kemoterápiás szerek ellen, amelyek a DNS-t, azon keresztül a transzkripciót célozzák.

6.3.1. 1,6-hexándiol kezelés hatásának vizsgálata az epirubicin hatékonyságára

A fázisszeparáció jelenségének egyik leghatékonyabb vizsgálati megközelítése a folyamat gátlása olyan anyagok alkalmazásával, amelyek megbontják a makromolekulák közt kialakuló gyenge, másodlagos kölcsönhatásokat (lásd: 3.3.4 fejezet). Kísérleteink során, a korábban ismertetett vegyületet, az 1,6-hexándiolt (HEX) alkalmaztuk a folyadék-folyadék fázisszeparáció gátlására.

Első lépésben egy olyan HEX koncentrációt kellett megállapítanunk, amely önmagában nem toxikus a sejtekre, de elég magas lehet ahhoz, hogy megzavarhassa a fázisszeparációt. A megfelelő koncentráció megállapításához MTT assay-t alkalmaztunk. A kísérletek során a szakirodalomban korábban közölt eredményekből kiindulva¹²⁷, egy konzervatív kezelési tartományt vizsgáltunk. A tesztelt HEX koncentrációk 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; illetve 2,0 m/v% voltak. A kezelés időtartama 24 óra volt. Eredményeink alapján 1,0% HEX kezelés nem okozott kimutatható változást az MCF7-sejtek életképességében (23. ábra). A kísérlethez tartozó nyers mérési adatok és az ábra készítéséhez használt normalizált adatok a 3) Függelékben találhatók.



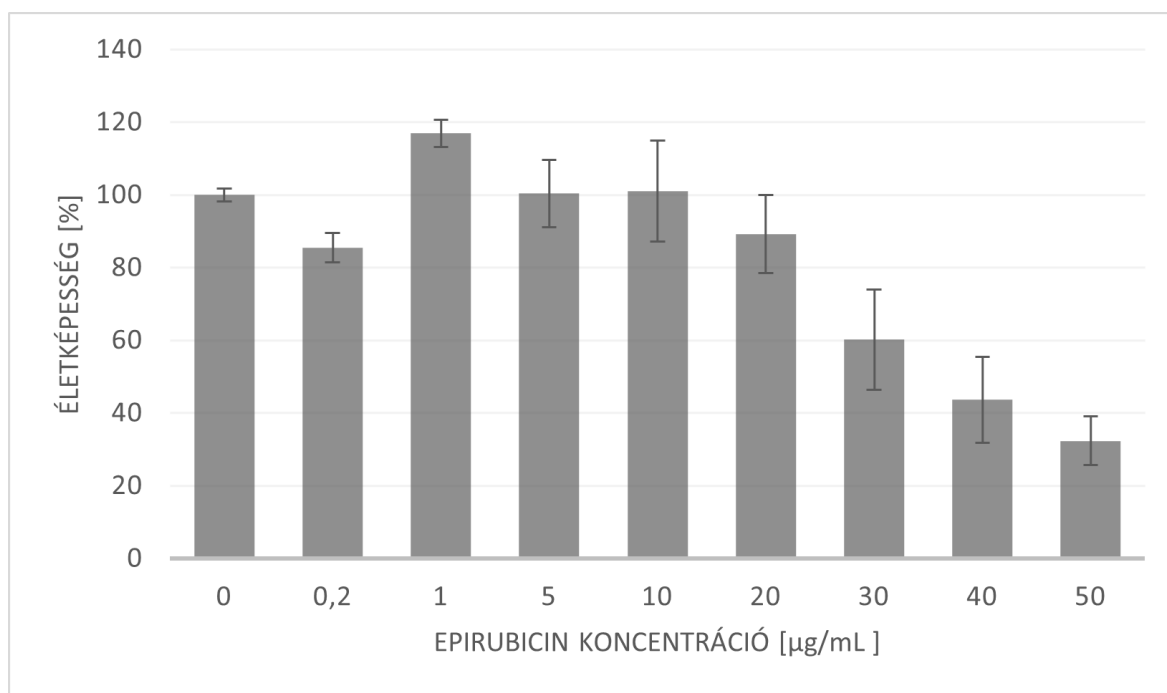
23. ábra – Különböző HEX koncentrációk hatása az MCF7-sejtek életképességére

A hibasávok a szórást reprezentálják n=4 biológiai párhuzamos minta eredményei alapján.

Ez az eredmény összhangban állt a korábbi ismereteinkkel, mivel ez a koncentráció HeLa sejtekben sem volt toxikus, ám a biológiai folyamatokra gyakorolt hatása már kimutatható volt¹²⁷.

Következő lépésként a HEX-el végzett kísérletekhez hasonlóan egy olyan epirubicin koncentrációt kellett megállapítanunk, amely önmagában nem okoz jelentős hatást a sejtek életképességére. A HEX-el ellentétben azonban az volt a célunk, hogy az alkalmazott koncentráció már önmagában is kimutatható hatással bírjon, ám ez a hatás legyen elég enyhe ahhoz, hogy detektálható legyen a későbbi kísérletek során alkalmazni kívánt kombinált kezelések esetleges hatása. Ebben az esetben is MTT-assay módszert alkalmaztunk a megfelelő koncentráció kiválasztásához. Kísérleteink során 0,2; 1; 5; 10; 20; 30; 40 illetve 500 µg/mL epirubicin koncentrációkat vizsgáltunk, ami egy konzervatív koncentráció tartomány, amelyet a szakirodalmi ismeretek alapján állapítottunk meg¹⁵⁷. A kezelés időtartama 24 óra volt.

A kísérletek eredményei alapján 20 µg/mL az az epirubicin koncentráció, aminél már egyértelműen kimutatható életképesség-csökkenés az MCF7-sejtekben, ami ebben az esetben 89% volt. Az ennél magasabb koncentrációknál a túlélési arány már csökkenést mutat (24. ábra). A kísérlethez tartozó nyers mérési adatok és az ábra készítéséhez használt normalizált adatok a 3) Függelékben találhatók.



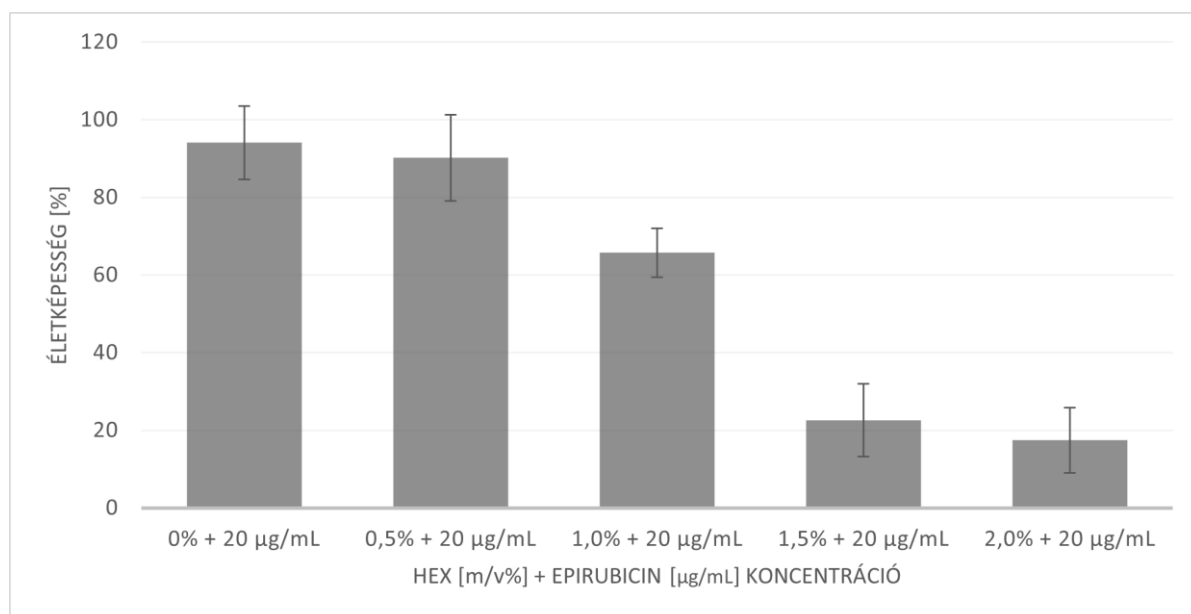
24. ábra - Különböző epirubicin koncentrációk hatása az MCF7-sejtek életképességére

A hibasávok a szórást reprezentálják n=4 biológiai párhuzamos minta eredményei alapján.

A további kísérletekhez így a 20 µg/mL-es epirubicin koncentrációt választottuk, mivel ennél magasabb koncentrációnál már fenn állt a lehetősége, hogy nem tudjuk elég nagy szenzitivitással kimutatni a két vegyület közt fellépő szinergikus hatást.

A kombinált kezelés során minden esetben 20 µg/mL epirubicin kezelést használtunk a HEX koncentrációt pedig 0,5; 1,0; 1,5; illetve 2,0 m/v%-os tartományban vizsgáltuk. Ezzel az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk, milyen HEX koncentrációban mutatható ki szinergikus hatás a kezelések között. Ezért a HEX hatását vizsgáltuk több koncentrációban, mert feltételezésünk szerint az esetlegesen fellépő szinergia háttérében a folyadék-folyadék fázisszeparáció gátlása állhat. A kombinált kezelés során is MTT-assay segítségével vizsgáltuk a sejtek életképességét.

Eredményeink alapján a korábban kiválasztott 20 µg/mL-es epirubicin, illetve az előzőekben önálló hatással nem bíró 1,0 m/v%-os HEX koncentráció együttes alkalmazása egyértelmű szinergiát mutatott (25. ábra). A kezelés időtartama 24 óra volt. A kísérlethez tartozó nyers mérési adatok és az ábra készítéséhez használt normalizált adatok a 3) Függelékben találhatók.



25. ábra – Epirubicin és HEX kombinált kezelés hatása a sejtek életképességére
A hibasávok a szórást reprezentálják n=4 biológiai párhuzamos minta eredményei alapján.

A kombinált kezelés 65,7%-os túlélési arányt eredményezett, ami arra enged következtetni, hogy a HEX felerősíti az epirubicin hatását, ezt még hozzá egy olyan alkalmazott koncentrációban, amely önmagában nem toxikus, ám a sejt biokémiai folyamatainak befolyásolására alkalmas.

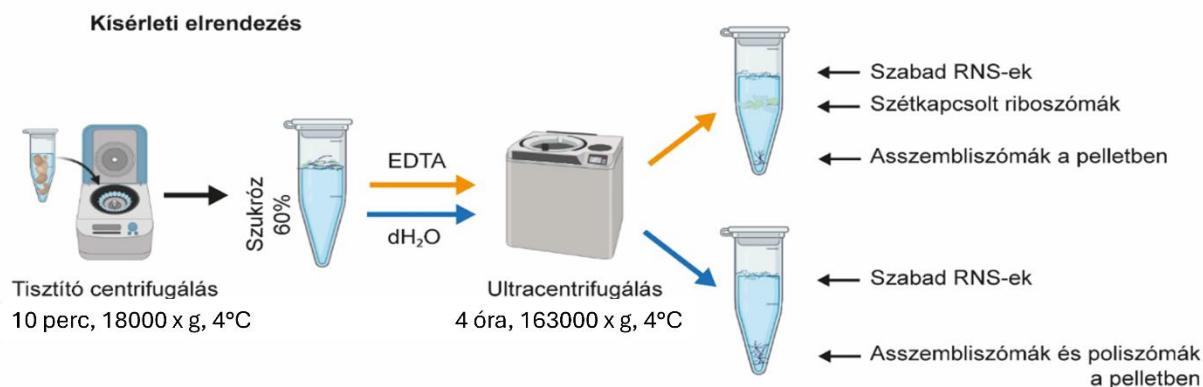
Az eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy előzetes várakozásainknak megfelelően a folyadék-folyadék fázisszeparáció jelensége hatással van az epirubicin kezelés hatékonyságára. Ennek fényében tovább erősödött elméletünk, miszerint az asszembliszómák

jelenléte szelekciós előnyt jelenthet a tumorsejteknek a DNS-t, ezen keresztül a transzkripciót és replikációt célzó kemoterápiás kezelésekkel szemben.

6.3.2. Az asszembliszómákban felhalmozódó géntermékekben, epirubicin kezelés hatására bekövetkező változások vizsgálata

A korábbiakban bemutatott eredményeink arra utalnak, hogy az asszembliszómák fontos szereppel bírhatnak a tumorsejtek kemoterápiával szembeni rezisztenciájának kialakításában. Felmerül a kérdés, hogy milyen géntermékek dúsulnak fel az MCF7-sejtekben megtalálható asszembliszómákban, illetve milyen változások figyelhetők meg az asszembliszómák tartalmában epirubicin kezelés során. Ezen kérdések megválaszolására modern proteomikai és transzkriptomikai módszerek alkalmazása mellett döntöttünk.

A fehérjék és RNS-ek szimultán vizsgálata a legmegfelelőbb módszer annak megállapítására, hogy milyen géntermékek találhatók meg az asszembliszómákban. Ennek oka, hogy eddigi ismereteink ezekről az újonnan felfedezett sejtalkotókról még igen felszínesek. Tudjuk, hogy bennük a translációban elakadt riboszóma-naszcsens fehérjekomplexek találhatók, a NOT1 fehérje az egyetlen eddig ismert markerük, illetve RNáz- és EDTA-rezisztensek^{77,78,129}. Az asszembliszóma izolálására kutatócsoportunk kifejlesztett egy eljárást, amely lehetővé teszi mind az asszembliszómák tisztítását, mind a poliszómák és asszembliszómák együttes dúsítását¹²⁹. Az eljárás, a riboszóma-footprinting¹⁵⁸ első lépéseként alkalmazott poliszóma-frakcionáláson alapul¹⁵⁹. A vizsgálni kívánt sejteket feltárjuk, majd a centrifugálás segítségével megtisztítjuk a lizátumot a sejttermelékektől, nagyobb sejtalkotóktól (sejtmag, mitokondrium, stb.) és a nagyobb méretű fázisszeparált granulumoktól (SG, P-test). Ezt követően egy 60 m/v%-os szukróz oszlop segítségével elválasztjuk az asszembliszómákat és/vagy poliszómákat a különálló riboszóma kis és nagy alegységektől, illetve szabad RNS-ektől. Ezt 163000 g sebességű ultracentrifugálással végezzük. Ennél a sebességénél a nagyobb komplexek (asszembliszómák, poliszómák) képesek áthatolni a szukróz oszlopon, így pelletet képeznek a centrifugacső alján, míg a kis molekulatömegű RNS-ek és riboszóma alegységek elakadnak a szukróz oszlop felső rétegében. Az asszembliszómák kizárólagos izolálására is alkalmas a módszer, amennyiben a feltárás során EDTA-t is adunk a lizispufferhez. Az EDTA ugyanis megköti a riboszóma-alegységek közti kötés kialakításához szükséges magnéziumot¹⁶⁰, ennek hatására a 80S riboszómák alegységeikre esnek szét, így nem képesek áthatolni a szukróz oszlopon. Az asszembliszómák ezzel ellentétben EDTA-rezisztensek^{77,78,129}, így ilyen körülmények közt is képesek kiülni a centrifuga cső aljára az ultracentrifugálás során (26. ábra).



26. ábra – Az asszembliszómák proteomikai és transzkriptomikai vizsgálatának sémája

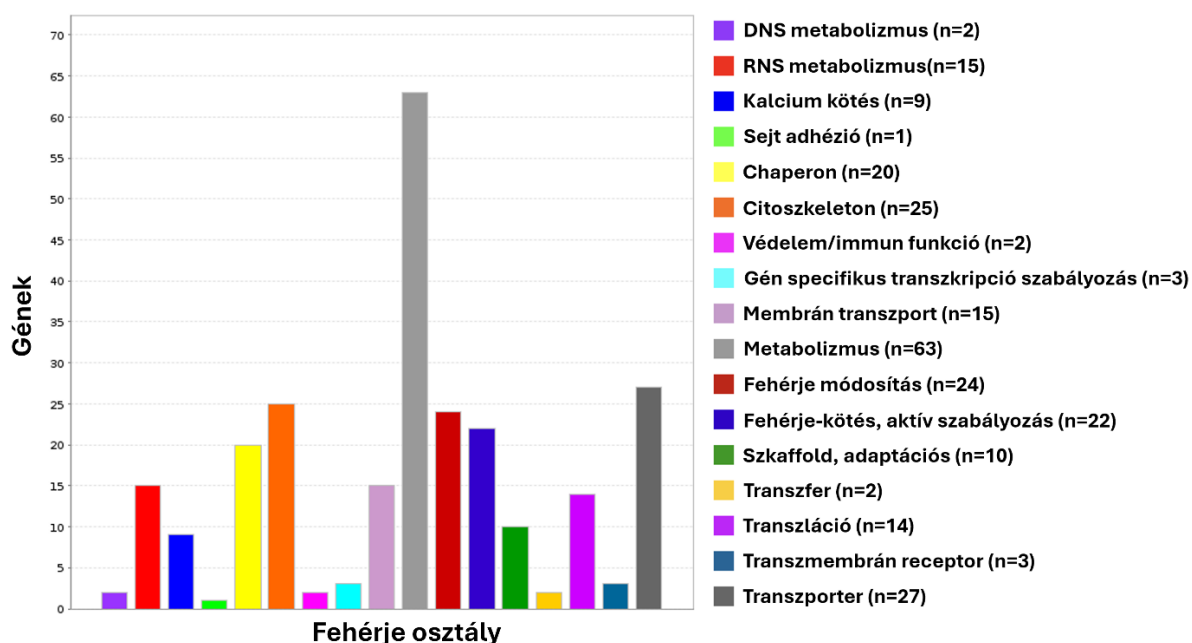
A kísérleteink során MCF7-sejtekből izoláltunk poliszómákat és asszembliszómákat illetve csak asszembliszómákat tartalmazó frakciókat 24 órás 20 µg/mL epirubicin kezelés után, illetve kezelés nélkül. Az így dúsított mintákból fehérjéket tisztítottunk, amelyeket HPLC-MS/MS módszerrel vizsgáltunk. Ezen felül RNS-szekvenálást is végeztünk. Az azonosított fehérjék és RNS-ek mennyiségét a kezelt, illetve kontroll minták teljes transzkriptómjához, mint belső kontrollhoz történő normalizálás után hasonlítottuk össze. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az epirubicinkezelés hatására, milyen változások jelentkeznek az egyes géntermékek translációs állapotában. Ezért összehasonlítottuk, hogy az egyes RNS-ek és fehérjék milyen mennyiségben találhatók meg a poliszómákat és asszembliszómákat tartalmazó frakciókban (innenről a Poly megnevezéssel hivatkozom ezeket a mintákat) és az EDTA-kezelés miatt csak asszembliszómákat tartalmazó frakciókban (innenről EDTA megnevezéssel hivatkozom ezeket a mintákat). A vizsgálat során két biológiai párhuzamos minta eredményeinek elemzését végeztük el. A párhuzamosok közti szórás alacsony volt (< 5%). Az változások szignifikanciáját t-teszt segítségével vizsgáltuk, csak a szignifikánsnak tekinthető változást mutató eredményeket elemztük. Az azonosított fehérjék és RNS közül csak azokat elemztük, melyek mennyisége legalább kétszeresére növekedett vagy felére csökkent a kezelés hatására. A továbbiakban az epirubicin kezelt mintákat Epi, a kezelésen át nem esett mintákat Kontroll rövidítéssel hivatkozom.

Az asszembliszómákban az adott gén terméke egyszerre van jelen RNS és fehérje formájában, lévén, hogy ezek a granulumok transzlációban elakadt riboszómákat tartalmaznak. Így, ha le akarjuk szűkíteni, hogy melyek azok a géntermékek, amik nagy valószínűséggel az asszembliszómák szabályozása alatt állnak, meg kell vizsgálnunk az azonosított RNS-ek és fehérjék közös halmazát.

Elsőként megvizsgáltuk, hogy melyek azok az RNS-ek és fehérjék, amelyek mennyisége megnő az epirubicin kezelés hatására a Poly frakcióban, azaz poliszómákon és asszembliszómákon, tehát az RNS Epi_Poly – Kontroll_Poly arány >1 . 3431 ilyen RNS-t és 544 fehérjét azonosítottunk.

Az azonosított találatok közös halmazára 297 gén volt, tehát ezen gének termékei mind RNS, mind fehérje szinten jelen voltak a Poly frakcióban és mennyiségük növekedett az epirubicin kezelés hatására. Az azonosított közös találatok génontológiai vizsgálatából az állapítható meg, hogy az epirubicin kezelés jelentős hatással van a sejtek transzlációs aktivitására. Tizenhét olyan fehérjeosztályt azonosítottunk, amelyek jelenléte megnőtt a Poly frakcióban. Mivel ez a frakció mind a poliszómákat, mind az asszembliszómákat tartalmazza, nem jelenthető ki teljes biztossággal, hogy az itt dúsuló RNS-ek és fehérjék az aktívan transzlálódó poliszómákon vagy az asszembliszómákon vannak-e jelen. Azonban, mivel a poliszómák mennyisége a sejtben feltételezhetően jelentősen meghaladja az asszembliszómák mennyiségét, az itt azonosított géntermékek inkább transzlációban lévő géntermékek.

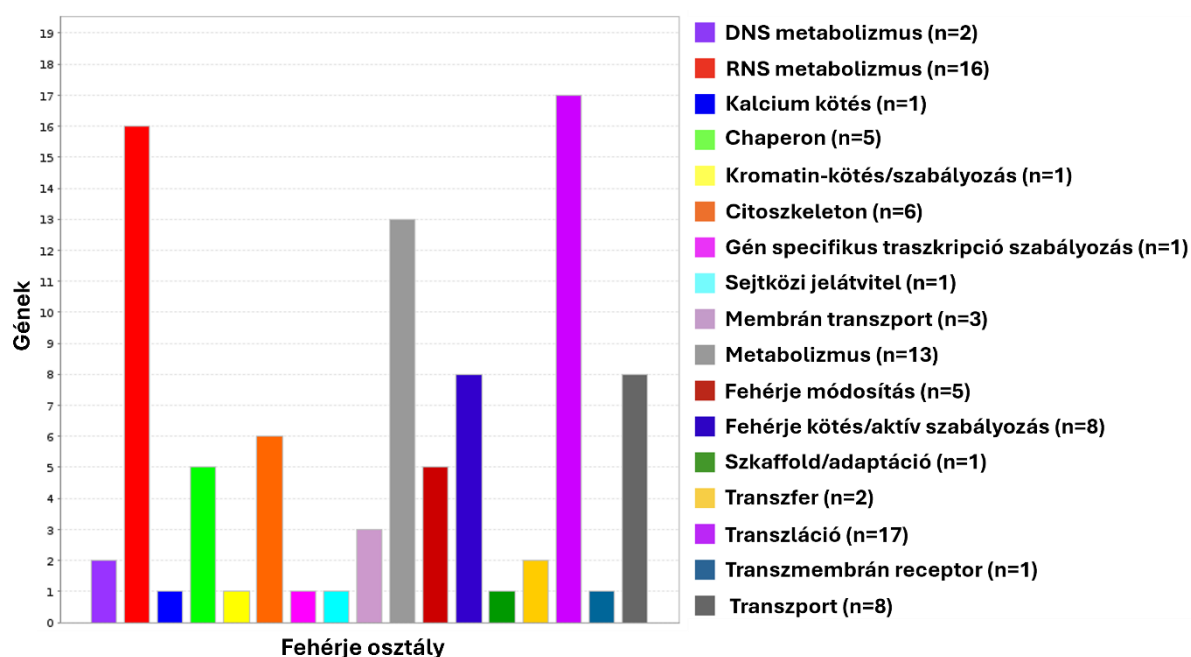
Az epirubicin kezelés hatására dúsult géntermékek főként metabolikus (24,5%), transzport (10,5%) illetve citoszketalális (9,7%) funkcióval rendelkeztek (27. ábra). A metabolikus folyamatok között legnagyobb számban a glikolízishez kapcsolódó enzimek voltak jelen (foszfoglicerát-mutáz 1, d-glükóz-6-foszfát-izomeráz, alpha-enoláz, gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz, piruvát-kináz PKM, hexokináz 1, triezofoszfát-izomeráz, foszfoglicerát-kináz 1). Az azonosított gének közül 54-et nem tudtunk besorolni az adatbázisban elérhető kategóriák egyikébe sem, ezeket nem ábrázoltuk a grafikonon.



27. ábra – Epirubicin kezelés hatására a Poly frakcióban növekvő mennyiségű RNS- és fehérjetermékek közös halmazának génontológiai elemzésének grafikus ábrázolása

A fehérjeosztályok definíciói és a besorlási szempotok a <https://pantherdb.org> felületen érhetők el. Az ábrán nem jelenítettük meg azokat a géneket, amelyeket nem tudtunk besorolni egy fehérjeosztályba sem. Egy gén több fehérjeosztályba is besorolásra kerülhet, így a megjelenített gének darabszáma nem egyezik meg az azonosított gének számával.

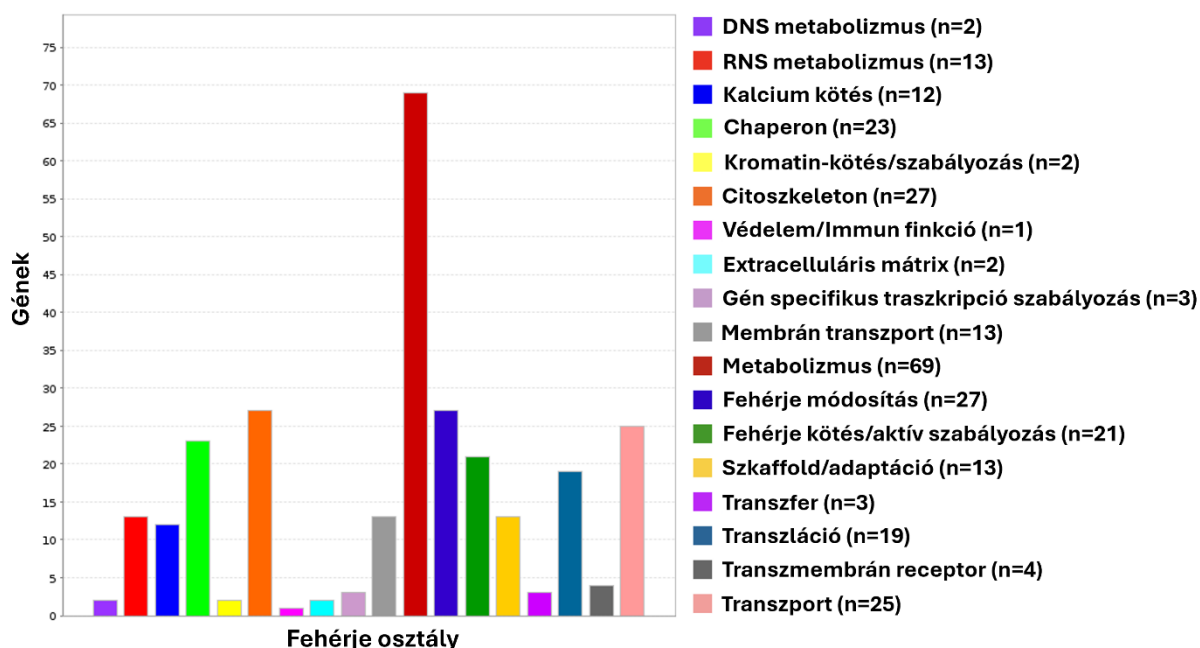
A Poly frakcióban azonosított géntermékek közül 3328 RNS-t és 820 fehérjét azonosítottunk, amelyek mennyisége lecsökkent az epirubicin kezelés hatására. Az RNS-fehérje halmazok közötti átfedések száma 115 volt. A csökkenést mutató géntermékek között a legnagyobb arányban az RNS metabolizmussal (17,6%), metabolizmussal (14,3%) és transzlációval (18,7%) összefüggő fehérjék voltak jelen (28. ábra). A metabolikus folyamatok között legnagyobb számban a nukleotid, aminosav és koleszterin anyagcseréhez kapcsolódó enzimek voltak jelen (purin-nukleozid-foszforiláz, metionin-adenozil-transzferáz 2A, szkvalén-monooxygenáz). Az azonosított gének közül 26-ot nem tudtunk besorolni az adatbázisban elérhető kategóriák egyikébe sem, ezeket nem ábrázoltuk a grafikonon.



28. ábra - Epirubicin kezelés hatására a Poly frakcióban csökkenő mennyiségű RNS- és fehérjetermékek közös halmazának génontológiai elemzésének grafikus ábrázolása

A fehérjeosztályok definíciói és a besorlási szempotok a <https://pantherdb.org> felületen érhetők el. Az ábrán nem jelenítettük meg azokat a géneket, amelyeket nem tudtunk besorolni egy fehérjeosztályban sem. Egy gén több fehérjeosztályba is besorolásra kerülhet, így a megjelenített gének darabszáma nem egyezik meg az azonosított gének számával.

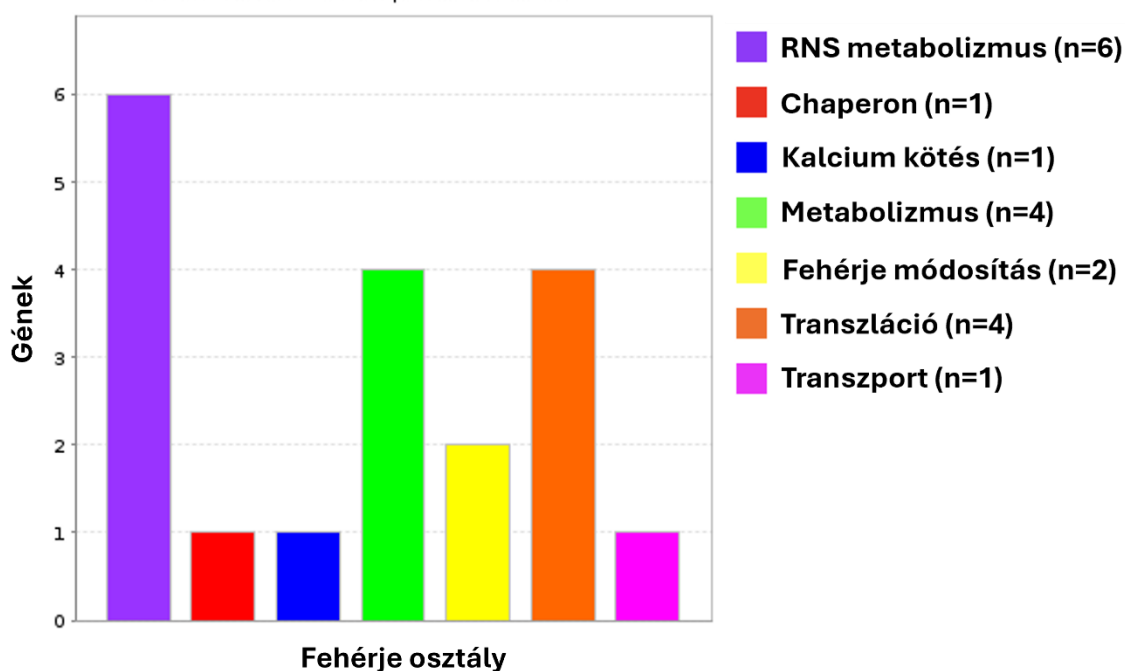
A Poly frakciót követően megvizsgáltuk, hogy az EDTA frakcióban milyen változások detektálhatók epirubicinkezelés hatására.. Az EDTA frakcióban 3472 RNS-t és 513 fehérjét azonosítottunk, amelyek mennyisége megnövekedett az epirubicinkezelés hatására. Az RNS és fehérje találatok közös halmaza 315 volt. A közös találatok génontológiai vizsgálata kimutatta, hogy ezek olyan gének termékei, amelyek szerepe leginkább a metabolizmusban (24,7%) van. Nagyjából azonos arányban találtunk továbbá chaperonokat (8,2%), citoszkeletális elemeket (9,7%), fehérje módosításban szerepet játszó fehérjéket (9,7%) és transzporterfehérjéket (9,0%) (29. ábra). A metabolikus folyamatok között legnagyobb számban a glikolízishez kapcsolódó enzimek voltak jelen (foszfogllicerát-mutáz 1, alfa-enoláz, glükóz-6-foszfát-izomeráz, fruktóz-biszfoszfát-aldoláz A). Az azonosított gének közül 50-et nem tudtunk besorolni az adatbázisban elérhető kategóriák egyikébe sem, ezeket nem ábrázoltuk a grafikonon.



29. ábra - Epirubicin kezelés hatására az EDTA frakcióban növekvő mennyiségű RNS- és fehérjetermékek közös halmazának génontológiai elemzésének grafikus ábrázolása

A fehérjeosztályok definíciói és a besorlási szempotok a <https://pantherdb.org> felületen érhetők el. Az ábrán nem jelenítettük meg azokat a géneket, amelyeket nem tudtunk besorolni egy fehérjeosztályban sem. Egy gén több fehérjeosztályba is besorolásra kerülhet, így a megjelenített gének darabszáma nem egyezik meg az azonosított gének számával.

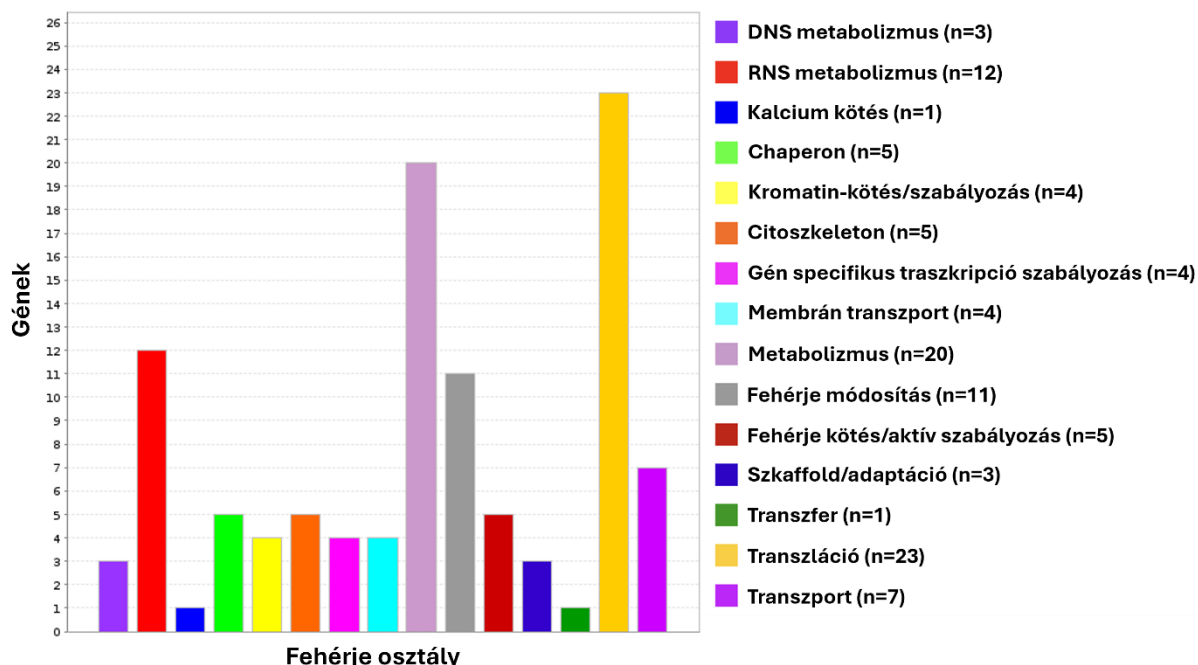
Az EDTA frakcióban 2733 olyan RNS-t és 307 fehérjét azonosítottunk, amelyek mennyisége lecsökkent az epirubicin kezelés hatására. Az RNS-fehérje találatok közti átfedés 30 volt. Az azonosított fehérjék szerepe főként az RNS metabolizmusban (31,6%), metabolikus folyamatokban (21,1%) és a transzlációban (21,1%) volt (30. ábra). Az azonosított gének közül 11-et nem tudunk besorolni az adatbázisban elérhető kategóriák egyikébe sem, ezeket nem ábrázoltuk a grafikonon.



30. ábra - Epirubicin kezelés hatására az EDTA frakcióban csökkenő mennyiségű RNS- és fehérjetermékek közös halmazának génontológiai elemzésének grafikus ábrázolása

A fehérjeosztályok definíciói és a besorlási szempotok a <https://pantherdb.org> felületen érhetők el. Az ábrán nem jelenítettük meg azokat a géneket, amelyeket nem tudunk besorolni egy fehérjeosztályba sem.

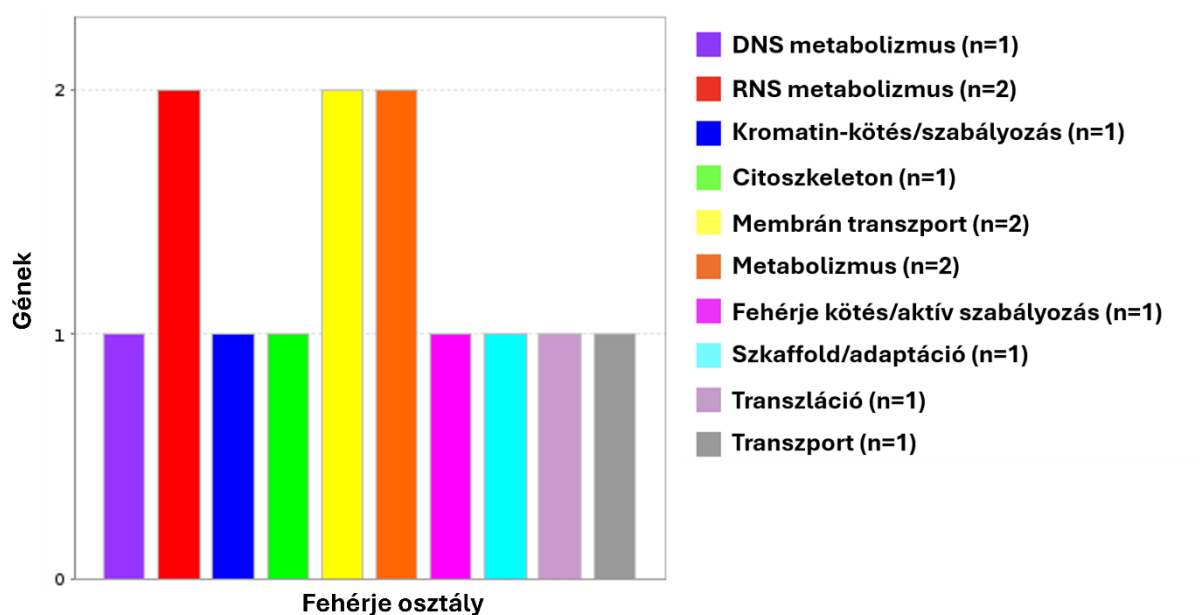
Következő lépésként azt vizsgáltuk meg, hogy melyek azok a gének, amelyek termékeinek eloszlása átrendeződést mutat a Poly és EDTA frakciók között, az epirubicin kezelés hatására. 162 olyan RNS-t azonosítottunk, amelyek mennyisége csökkent a Poly frakcióban és ezzel párhuzamosan nőtt az EDTA frakcióban. Ezen RNS-ek által kódolt fehérjék szerepe főként az RNS-metabolizmusban (11,1%), metabolikus folyamatokban (18,5%) és a transzlációban (21,3%) volt (31. ábra). A metabolikus folyamatok között legnagyobb számban a nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrogén (NADH) anyacserhez kapcsolódó enzimek voltak jelen (ubiquion-vas-kén fehérje 5, ubiquion 1 béta 1, 2, 3, 4, 6, 7 és 12 alegységek). Az azonosított gének közül 44-et nem tudtunk besorolni az adatbázisban elérhető kategóriák egyikébe sem, ezeket nem ábrázoltuk a grafikonon.



31. ábra – Epirubicin kezelés hatására a Poly frakcióban csökkenő és az EDTA frakcióban növekvő mennyiségű RNS-termékek génontológiai elemzésének grafikus ábrázolása

A fehérjeosztályok definíciói és a besorlási szempotok a <https://pantherdb.org> felületen érhetők el. Az ábrán nem jelenítettük meg azokat a géneket, amelyeket nem tudtunk besorolni egy fehérjeosztályba sem. Egy gén több fehérjeosztályba is besorolásra kerülhet, így a megjelenített gének darabszáma nem egyezik meg az azonosított gének számával.

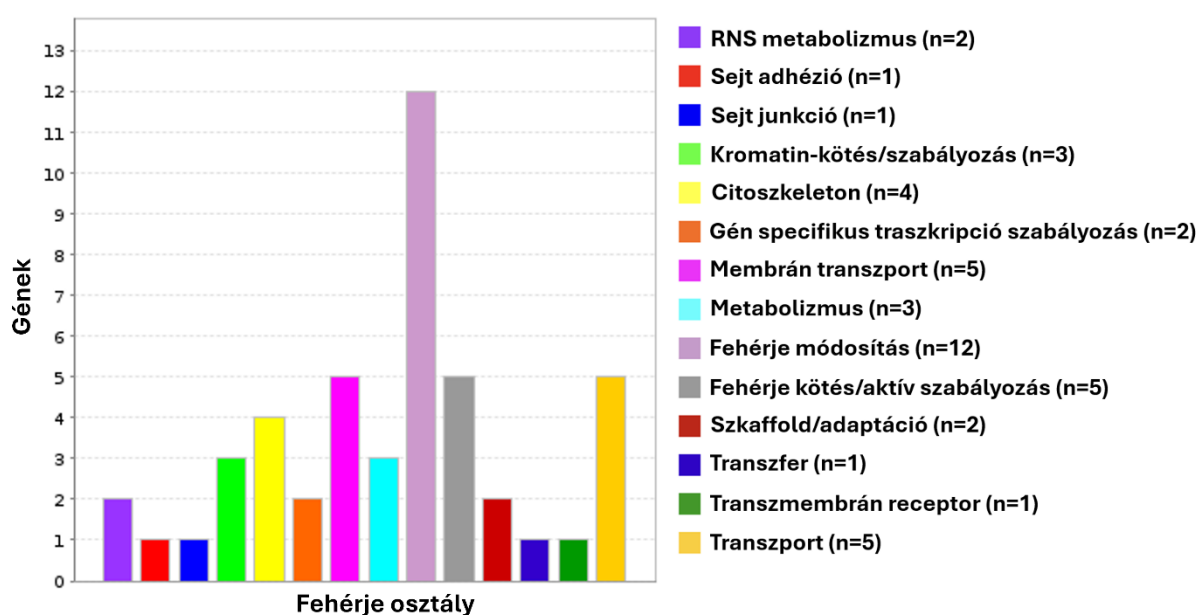
Továbbá 15 olyan génterméket azonosítottunk, amelyek mind RNS, mind fehérje szinten mutattak csökkenést a Poly frakcióban és dúsulást az EDTA frakcióban (32. ábra). Az azonosított gének közül 2-t nem tudtunk besorolni az adatbázisban elérhető kategóriák egyikébe sem, ezeket nem ábrázoltuk a grafikonon.



32. ábra – Epirubicin kezelés hatására a Poly frakcióban csökkenő és az EDTA frakcióban növekvő mennyiségű RNS- és fehérjetermékek közös halmazának génontológiai elemzésének grafikus ábrázolása

A fehérjeosztályok definíciói és a besorlási szempotok a <https://pantherdb.org> felületen érhetők el. Az ábrán nem jelenítettük meg azokat a géneket, amelyeket nem tudtunk besorolni egy fehérjeosztályban sem.

Az előbbivel ellentétes irányú változást mutató, azaz a Poly frakcióban dúsuló és az EDTA frakcióban csökkenő mennyiségű géntermékek elemzése során 68 RNS-t azonosítottunk. Ezen RNS-ek szerepe főként az egyéb fehérjék módosításában jelentős (25,5%), és azonos mértékben voltak jelen membrántranszportban (10,6%), fehérjekötésben és aktivitásszabályozásban (10,6%) és egyéb transzport funkciókban (10,6%) szerepet játszó gének (33. ábra). Olyan géntermékeket nem azonosítottunk, amelyek mind RNS-szinten, mind fehérjeszinten mutatták ezt a jellegű változást. Az azonosított gének közül 20-at nem tudtunk besorolni az adatbázisban elérhető kategóriák egyikébe sem, ezeket nem ábrázoltuk a grafikonon.



33. ábra - Epirubicin kezelés hatására a Poly frakcióban növekvő és az EDTA frakcióban csökkenő mennyiségű RNS-termékek génontológiai elemzésének grafikus ábrázolása

A fehérjeosztályok definíciói és a besorlási szempontok a <https://pantherdb.org> felületen érhetők el. Az ábrán nem jelenítettük meg azokat a géneket, amelyeket nem tudtunk besorolni egy fehérjeosztályba sem. Egy gén több fehérjeosztályba is besorolásra kerülhet, így a megjelenített gének darabszáma nem egyezik meg az azonosított gének számával.

A különböző frakciókban feldúsuló, vagy éppen csökkenő mennyiségű géntermékek összehasonlítása során azt állapíthatjuk meg, hogy az epirubicin kezelés hatására az MCF7 sejtekben megnövekszik a sejt metabolizmusban és a transzport folyamatokban résztvevő egyes géntermékek transzlációja (27. ábra). Ezzel párhuzamosan azok között a géntermékek között, amelyek transzlációja lecsökken a kezelés hatására 33 RNS-metabolizmusban és transzlációban szerepet játszó fehérjét azonosítottunk (28. ábra). Ez arra utal, hogy ebben a stresszhelyzetben

a sejt azon géntermékek előállítását helyezi előtérbe, amelyek a metabolikus stressz kivédésében és a stresszt kiváltó anyag potenciális sejtől való eltávolításában lehetnek fontosak.

Az EDTA frakciók géntermék vizsgálata során azt figyeltük meg, hogy a metabolikus enzimek itt is kimagasló arányban voltak jelen az azonosított funkcionális csoportok között (29. ábra). A glikolízisben szerepet játszó enzimeket kódoló gének termékei dúsultak a poliszómákon. Ezzel párhuzamosan a NADH anyagcserében érintett komplexek alegységei dúsultak az asszembliszómákon. Ez a megfigyelés egybevág azzal az elmélettel, hogy a sejt energiatermelésébe szerepet játszó fehérjekomplexek megfelelő összeszerelődése – amelynek fontos lépései valósulhatnak meg az asszembliszómák segítségével – létfontosságú a sejt túlélése szempontjából. Az EDTA frakcióban csökkést mutató géntermékek a Poly frakcióhoz hasonló eloszlást mutattak (30. ábra), számuk azonban jelentősen kisebb volt (30), mint a dúsulás mutató géntermékeké (315).

Azon géntermékek, amelyek mennyiségi változása eltérő tendenciát mutatott a Poly és EDTA frakciókban, mutatják meg számunkra, hogy hogyan változik az asszembliszómák összetétele az epirubicin kezelés során.

A Poly frakcióban csökkenő és ezzel párhuzamosan az EDTA frakcióban növekvő géntermékek között mind a sejt metabolizmusban, mind a transzlációban és RNS-metabolizmusban szerepet játszó gének termékei nagy számban voltak jelen RNS-szinten (31. ábra). Ám azon géntermékek száma, amelyek RNS- és fehérjeformában is azonosíthatók voltak, igen alacsonynak bizonyult és funkcionalitásukban nem volt megfigyelhető egyes csoportok egyértelmű felülreprezentáltsága (32. ábra). Mivel az asszembliszómák alkalmasak az egyes géntermékek tárolására¹²⁹, ez arra utal, hogy a sejt a kemoterápia hatására a nagy energiaigényű riboszómális fehérjék és egyéb transzlációhoz kapcsolódó komplexek szintézise helyett a túléléséhez szükséges fehérjék aktív transzlációját létesíti előnyben.

A Poly frakcióban dúsuló és ezzel párhuzamosan az EDTA frakcióban csökkenő mennyiségű géntermékek között felülreprezentáltak voltak azon gének RNS-ei, amelyek más fehérjék módosításáért felelős proteinek kódolnak (33. ábra), de számos transzporter- és fehérjekötő-találatot is azonosítottunk. Ezek az RNS-ek feltételezhetően kiszabadulnak az asszembliszómákból és aktív transzlációba lépnek¹²⁹. Olyan géntermékeket nem sikerült azonosítanunk, amelyek RNS- és fehérjeszinten egyaránt ilyen változást mutatnának.

7. Diskusszió

A sejteket érő különféle stresszhatások kivédésre számos különböző mechanizmus evolválódott. Ezek képessé teszik az élőlényeket és sejtjeiket, hogy alkalmazkodni tudjanak a folyamatosan változó környezethez és az ebből fakadó káros hatásokhoz, biztosítva ezzel a túlélésüket. Azonban ezek a folyamatok a szervezet hátrányára is válhatnak, amennyiben egy tumoros folyamat következtében egyes sejtek kontrollálatlan osztódásba kezdenek. Az így szaporodó sejtömegekben működő stresszválaszok szelekciós előnyt jelentenek a tumor számára, ami jelentős kihívást támaszt az orvosok elé a betegség hatékony kezelése szempontjából¹⁶¹. A tumorsejtek természetükből fakadóan megnövekedett fehérjetermelési és osztódási képességekkel rendelkeznek, amelyek megkülönböztetik őket a szervezet egészséges sejtjeitől¹¹², ezáltal támadási pontot is biztosítva a terápiás szereknek. A DNS-t célozva, mind a fehérjeszintézis, mind az osztódás gátolható. Azonban, ha a tumorsejtekben olyan mechanizmusok is megjelennek vagy felerősödnek, amelyek képesek ellensúlyozni a transzkripció gátlását, az hatástalanná teszi azokat a genotoxikus hatású szereket, amelyek a legszélesebb körben használatosak a tumorok elleni küzdelemben¹⁵⁴. A közelmúltban felfedezett asszembliszómák⁷⁸ hozzájárulhatnak a terápiás szerrel szemben mutatott rezisztenciához.

Kutatásunk során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a folyadék-folyadék fázisszeeparációnak, és az így kialakuló asszembliszómáknak milyen szerepük lehet a tumoros betegségek kemoterápiával szembeni rezisztenciájának kialakításában.

Kutatásunk során megvizsgáltuk, hogy az emlőtumorok kezelésében széles körben alkalmazott neoadjuváns kemoterápiára adott válasz összefüggésbe hozható-e a sejtekben a kezelés előtt megfigyelhető, a transzkripciós mechanizmus gerincét adó, RPB1 fehérje aggregációjának mértékével. Elméletünk kiindulópontja az volt, hogy az aggregálódott RPB1 nem képes ellátni funkcióját, ami arra utal, hogy a sejtek a génkifejeződési folyamat egy későbbi lépésének segítségével ellensúlyozzák a transzkripciós aktivitás csökkenését, ami egyúttal csökkenti a DNS-t és a transzkripciót célzó terápiás megközelítések hatékonyságát. Feltételezésünk szerint továbbá, az RPB1 aggregálódása nem véletlen, hiszen amennyiben a transzkripció blokkját a sejt úgy képes kompenzálni, hogy korábban már megszintetizált RNS-eket szabadít fel a raktárként működő asszembliszómákból, akkor a NOT1 fehérje elvonódik az RPB1 összeszerelődésétől¹⁴⁵, és inkább a stresszgranulumokon, vagy az asszembliszómákon fordul elő⁷⁸. Következésképpen az RPB1 citoplazmatikus aggregációja közvetve NOT1

tartalmú RNS granulumok dúsulására is utal – legyenek azok SG-k, vagy asszembliszómák – azokban a tumorsejtekben, amelyek túléléséhez nem a transzkripció a limitáló génexpressziós lépés.

Vizsgálatainkhoz emlőtumor core biopsziamintákon vizsgáltuk az RPB1-fehérje aggregációját, valamint a HSP90-chaperonfehérje mintázatot. A HSP90 az RPB1 megfelelő térszerkezetének kialakításához nélkülözhetetlen fehérje, ezért mennyisége vagy sejten belüli eloszlása összefügghet a RPB1 aggregációjával^{136,150}.

Eredményeink alapján a nem regrediáló esetekehez tartozó mintákban nagyobb számban fordultak elő nagy méretű RPB1-fókuszok a citoplazmában, mint a parciálisan regrediáló és a teljesen regrediáló esetekhez tartozó mintákban. Azt feltételezzük, hogy ezek a nagyméretű fókuszok aggregálódott RPB1-fehérjéket tartalmaznak. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy a parciálisan és teljesen regrediáló eseteknél az RPB1 nagyobb arányban található a sejtmagban a citoplazmához képest, mint a regressziót nem mutató esetekben. Ez arra utal, hogy ezeknél az eseteknél a transzkripció fokozottabb a regressziót nem mutató esetekhez képest. A regrediáló tumorok elméletünk szerint megemelkedett transzlációval, és kiterjedtebb transzláció szabályozással ellensúlyozzák az RPB1-fehérje aggregációja miatt kieső génkifejeződési és szabályozási funkciókat. Az asszembliszómákban a géntermékek védettek a bomlástól, és poliszómákká alakulva hatékony, és egyben szabályozható génkifejeződést tesznek lehetővé. Az RPB1-fehérje aggregációja másfelől éppen az asszembliszómák jelenlétére utal, amelyek feltételezésünk szerint elvonják a NOT1-fehérjét, mint dajkafehérje platformot, a naszcens RBP1 érésétől. A HSP90-chaperon mintázata nem mutatott ilyen egyértelmű különbséget az egyes fenotípusok között. Ezek alapján megállapítottuk, hogy az RPB1-citoplazmatikus fókuszok mérete és sejtmagi koncentrációja összefügghet a kemoterápiára adott válasszal.

Megvizsgáltuk, hogy a megfigyelt RPB1-aggregátumok jelenléte alkalmas lehet-e a kemoterápia hatékonyságának előrejelzésére. Az elmélet teszteléséhez ismeretlen fenotípusú mintákon végeztünk immunfestést, majd ezeket a mintákat az RPB1-mintázatuk alapján besoroltuk a lehetséges fenotípusokba. A teszt során 13 mintából 10 esetben megfelelő fenotípust prediktáltunk, a regressziót nem mutató eseteket 92%, a parciálisan regrediálókat 76%, a teljesen regrediáló eseteket pedig 84%-os valószínűséggel azonosítottuk. A minél korábbi diagnózis mellett a megfelelő terápia kiválasztása elengedhetetlen a jó prognózis eléréséhez. A manapság alkalmazott prognosztikai markerek (ER, PR, HER, Ki-67) mellett szükséges olyan új vizsgálati megközelítések kifejlesztése, amelyek segítik a megfelelő kemoterápiás szerek kiválasztását, vagy éppen előre jelzik a kezelés hatékonyságát.

Amennyiben már előre lehet tudni, hogy a rendelkezésre álló terápiák kis valószínűséggel fognak regressziót előidézni, lehetőség nyílik a korábbi operációra, ami az ilyen esetekben javíthatja a betegek túlélési esélyét. Eredményeink ígéretesek az RPB1-aggregáció vizsgálatának új prediktív, markerként való alkalmazásának tekintetében. Amennyiben az RPB1 hatékony markere a neoadjuváns kemoterápia sikerességének emlőtumорок esetében, az tovább javíthatja a betegek kilátásait. További esetek vizsgálatával növelve a mintaszámot még pontosabb képet kaphatunk az RPB1-eloszlás és a terápiás válasz közötti összefüggésekről. Kellően nagy számú eset bevonásával, standardizált festési eljárással és megfelelő felbontást biztosító mikroszkópos berendezések alkalmazásával pedig lehetőség nyílik az RPB1-mintázat kvantitatív jellemzésére, amely egy félautomatizált, vagy akár teljesen automatizált diagnosztikai eljárás alapját képezheti, ami bevezethető a klinikumba, ez által növelve a betegek kilátásait. A kutatás során tapasztaltuk, hogy az emlőszövet magas lipid tartalma miatt erős autofluoreszcenciával rendelkezik, ami megnehezítette a mikroszkópos képek kiértékelését. A klinikumban való alkalmazhatóság javítása érdekében célszerű lehet olyan detekciós módszert alkalmazni, ami kiküszöböli ezt a tulajdonságot. Erre megfelelő megközelítés lehet különböző enzim-konjugált (például peroxidáz enzim) másodlagos antitestek alkalmazása. Amennyibe így alacsonyabb háttérrel és ennek következtében jobb jel-zajarányt sikerül elérni az lehetővé teheti a citoplazmatikus RPB1 fókuszok kvantitatív jellemzését.

A diagnosztikai eljárásokon felül új terápiás megközelítések felé is megnyílhat az út. Amennyiben a tumorsejtek nagyobb hatékonysággal állnak ellen a transzkripciót és replikációt célzó kemoterápiának abban az esetben, ha bennük a transzkripcióért felelős komplex központi fehérjéje aggregálódik, az arra utal, hogy ezek a sejtek képesek a génexpresszió egy másik lépésével vagy lépéseivel kiegyenlíteni a kiesett transzkripciót. Erre a jelenségre magyarázatul szolgálhat a nemrégiben felfedezett asszembliszómák jelenléte⁷⁸. A szövetmintákon végzett kísérletek eredményeinek további vizsgálatára olyan megközelítést választottunk, amellyel közvetlenebbül vizsgálhattuk mind az asszembliszómák jelenlétét, mind szerepüket a kemorezisztenciában. A további kísérletek során sejtkultúrákat használtunk fel ebből a célból. MCF7 emlőtumor-eredetű sejteken végeztük a kísérleteket.

Immunfestés segítségével kimutattuk, hogy várakozásainknak megfelelően az MCF7-sejtekben nagy számban fordulnak elő NOT1-tartalmú citoplazmatikus fókuszok. A NOT1 az asszembliszómák markere⁷⁸, az MCF7-sejtekben megfigyelt mintázata arra utal, hogy ezek a nemrégiben felfedezett sejtalkotók ebben a sejtvonalban is jelen vannak. Mivel az asszembliszómákról tudjuk, hogy folyadék-folyadék fázisszeparációval alakulnak ki, vizsgálatukhoz olyan kísérletes megközelítést kell alkalmazni, amely kifejezetten a

fázisszeparált granulomok tulajdonságainak felderítésére alkalmas. A HEX kezelés széles körben elterjedt megközelítés ezen a téren, ami lehetőséget biztosít a fázisszeparált granulomok feloldására, és ezáltal a biológiai funkciójuk felderítésére¹²⁵. Kimutattuk, hogy a HEX alkalmazása biológiai hatást még ki nem váltó koncentrációban¹²⁷ képes felerősíteni az epirubicin kezelés hatását. Ez arra enged következtetni, hogy a folyadék-folyadék fázisszeparáció szerepet játszik az epirubicin toxikus hatásának kivédésében. A HEX kezelés alkalmazására a tumorterápiában már számos ígéretes eredmény létezik, amely altámasztja, hogy a folyadék-folyadék fázisszeparáció gátlásán keresztül elérhető antitumorális hatás egy jelentős potenciállal rendelkező irányvonal. Az eddig közölt eredmények a hasnyálmirigyrák¹⁶² és a tüdőrák¹⁶³ esetén alátámasztották a HEX kezelés alkalmazhatóságát. Továbbá azt is bizonyították, hogy a HEX az angiogenezis befolyásolásán keresztül is képes hatni¹⁶⁴, ami további utakat nyithat a tumorterápia frontján. Eredményeink megerősítik, hogy a HEX egy potens molekula, amely képes olyan sejtfolyamatok befolyásolására, amelyek számos tumortípus esetében lehetnek terápiás célpontok. Más szerekekkel (mint például az epirubicin) kombinálva a HEX hatékony és széles körben alkalmazható antitumorális szer lehet, amely jó víz-oldékonysága és stabilitása miatt számos formulációs lehetőség és beviteli út vonal kifejlesztésére nyújt lehetőséget.

Az asszembliszómák kemorezisztenciában betöltött jelentőségének bizonyítása felveti azt a kérdést, hogy mi a hatásmechanizmus, ami elősegíti a sejtek túlélését az epirubicin kezeléssel szemben. Az asszembliszómák képesek megvédeni a sejteket az UV- vagy radioaktív sugárzás által kiváltott genotoxikus stressztől¹²⁹ és közvetve kihatnak a DNS hibajavításra¹³⁰. Továbbá az asszembliszómákban jelen lévő NOT1 fehérje funkciója is jelentőséggel bírhat a védelmi folyamatokban. ACcr4-Not komplex sokrétűen és rugalmasan szabályozza az RNS-ek transzlációját. Ezt a jelenséget stresszhatások során már számos formában kimutatták. A NOT1 kontextusfüggő módon képes aktívan promótálni vagy represszálni az egyes RNS-ek transzlációját, illetve elősegíteni a sok alegységből felépülő fehérjekomplexek mRNS-einek kolokalizációját. A NOT5 és az asszembliszómákban megtalálható NOT1 fehérjék összekötik a transzkripciót és a transzlációt¹⁴⁵. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a primidinnukleotidok szintézisének gátlása esetén a sejteket metabolikus stressz éri. Ezt a stresszt a sejt úgy próbálja kompenzálni, hogy megnöveli a riboszómális fehérjék szintézisének rátáját. Ezt az mRNS NOT1-hez való kötődésén keresztül éri el¹⁶⁵.

Az epirubicin kezelésen átesett és kontrollsejtekből izolált, poliszómákat és asszembliszómákat együttesen tartalmazó, vagy csak asszembliszómákat tartalmazó frakciókon végzett proteomikai és újgenerációs RNS-szekvenálási kísérletek eredményeinek génontológiai

vizsgálata során kiderült, hogy az epirubicin által okozott stressz nagymértékben megváltoztatja a sejtek metabolikus folyamataiban kulcsfontosságú enzimek translációs dinamikáját. A tumorsejtek által mutatott fokozott metabolikus aktivitás széles körben kutatott terület¹⁶⁶. A nagy energiaigényű folyamatok fokozása szelekciós előnyt biztosít a tumorsejtek számára a szervezet egészséges sejtjeivel szemben. Ezen enzimek fokozott translációja arra utal, hogy a tumorsejtek metabolikus újraprogramozásba kezdenek a kemoterápia hatására. Ez az újraprogramozás ismert jelenség^{112,167}, és eredményeink arra utalnak, hogy az epirubicin jelenlétében blokkolt transzkripció miatt a már korábban megszintetizált mRNS-ek translációjának fokozása révén is megvalósulhat.

Ezen felül azt is megfigyeltük, hogy számos olyan fehérje translációja is fokozódik, amelyek transzport folyamatokért felelősek. Az ABC és SLC transzporterek tumorrezisztenciában betöltött szerepe megkérdőjelezhetetlen^{168,169}. Az általunk azonosított transzporterek képesek lehetnek kipumpálni a kemoterápiás szereket a tumorsejtekből, hozzájárulva ezzel a kemorezisztencia kialakulásához. Az asszembliszómmák által szabályozott transzporterek egyedi vizsgálata fényt deríthet arra, hogy mely fehérjék képesek a sejtben translációsan represszált állapotban várakoznimert szükség esetén ezek védik meg a sejteket a kemoterápiás kezelés hatásától.

Kimutattuk továbbá, hogy a translációban fontos szerepet betöltő fehérjék, mint a riboszóma alegységeket alkotó proteinek vagy transláció iniciációs faktorok termelése lecsökken. Ezek a fehérjék szigorú Ccr4-NOT szabályozás alatt állnak^{145,165}, termelésük igen energiaigényes. Az epirubicinkezelés hatására a sejt átcsoportosítja erőforrásait és a túléléséhez szükséges metabolikus enzimek, transzporterek és egyéb szabályozó fehérjék termelésére fókuszálva az erőforrásokat a már rendelkezésre álló translációs kapacitás hatékony kihasználására..

Összefoglalásképpen kijelenthetjük, hogy a folyadék-folyadék fázisszeparáció és az ezzel összefüggő fehérjeaggregáció fontos szerepet játszik az emlőtumork kemorezisztenciájában. Az RPB1 citoplazmatikus aggregációja a neoadjuváns kemoterápia hatékonyságnak ígéretes prediktív markere. Az asszembliszómmák jelen vannak az MCF7 emlőtumor-eredetű sejtvonalban és szerepet játszanak az epirubicin elleni védelemben. Továbbá az asszembliszómmákban tárolt géntermékek jelentős változásokat mutatnak epirubicinkezelés hatására, amely megnyilvánul a sejtek translációs dinamikájában, ez elsősorban a metabolikus enzimek, translációban szerepet játszó fehérjék és transzporterek translációs preferenciájának változásaiban figyelhető meg.

8. Irodalomjegyzék

1. Transcription in the nucleus and mRNA decay in the cytoplasm are coupled processes. Accessed July 31, 2025. <https://genesdev.cshlp.org/content/22/15/2022>
2. Dori-Bachash M, Shema E, Tirosh I. Coupled Evolution of Transcription and mRNA Degradation. *PLOS Biol.* 2011;9(7):e1001106. doi:10.1371/journal.pbio.1001106
3. Hassanpour SH, Dehghani M. Review of cancer from perspective of molecular. *J Cancer Res Pract.* 2017;4(4):127-129. doi:10.1016/j.jcrpr.2017.07.001
4. Cancer (IARC) TIA for R on. Global Cancer Observatory. Accessed February 20, 2025. <https://gco.iarc.fr/>
5. Breast Cancer Statistics | How Common Is Breast Cancer? Accessed February 20, 2025. <https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html>
6. Breast cancer statistics. World Cancer Research Fund. Accessed February 20, 2025. <https://www.wcrf.org/preventing-cancer/cancer-statistics/breast-cancer-statistics/>
7. Breast cancer risk factors - PubMed. Accessed February 20, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26528110/>
8. Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies - PubMed. Accessed February 20, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17503436/>
9. BRCA1 mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history - PubMed. Accessed February 20, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9544766/>
10. Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes - PubMed. Accessed February 20, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22441895/>
11. Family history and risk of breast cancer: nurses' health study - PubMed. Accessed February 20, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22350789/>
12. Ottó S. Népegészségügy. Accessed February 20, 2025. <https://www.nnk.gov.hu/>
13. Az emlőrák patológiai diagnosztikája, feldolgozása és kórszövettani leletezése | Request PDF. Accessed February 21, 2025. https://www.researchgate.net/publication/275762354_Az_emlorak_patologiai_diagnosztikaja_feldolgozasa_es_korszovettani_leletezese
14. Breast Cancer Staging: TNM Classification for Breast Cancer. Published online February 26, 2024. Accessed February 21, 2025. <https://emedicine.medscape.com/article/2007112-overview>
15. Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem.* 2005;51(3):494-503. doi:10.1373/clinchem.2004.046227

16. Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathology*. 2008;52(1):82-90. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02897.x
17. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(28):7212-7220. doi:10.1200/JCO.2005.07.501
18. Sleightholm R, Neilsen BK, Elkhatib S, et al. Percentage of Hormone Receptor Positivity in Breast Cancer Provides Prognostic Value: A Single-Institute Study. *J Clin Med Res*. 2021;13(1):9-19. doi:10.14740/jocmr4398
19. Yu F, Bender W. The mechanism of tamoxifen in breast cancer prevention. *Breast Cancer Res BCR*. 2001;3(Suppl 1):A74. doi:10.1186/bcr404
20. Wr M. Aromatase inhibitors: mechanism of action and role in the treatment of breast cancer. *Semin Oncol*. 2003;30(4 Suppl 14). doi:10.1016/s0093-7754(03)00302-6
21. Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol*. 2014;21(2):100-107. doi:10.1097/PAP.0000000000000015
22. Maadi H, Soheilifar MH, Choi WS, Moshtaghian A, Wang Z. Trastuzumab Mechanism of Action; 20 Years of Research to Unravel a Dilemma. *Cancers*. 2021;13(14):3540. doi:10.3390/cancers13143540
23. Aysola K, Desai A, Welch C, et al. Triple Negative Breast Cancer – An Overview. *Hered Genet Curr Res*. 2013;2013(Suppl 2):001. doi:10.4172/2161-1041.S2-001
24. Brouckaert O, Wildiers H, Floris G, Neven P. Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *Int J Womens Health*. 2012;4:511-520. doi:10.2147/IJWH.S18541
25. Andrés-Sánchez N, Fisher D, Krasinska L. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67. *J Cell Sci*. 2022;135(11):jcs258932. doi:10.1242/jcs.258932
26. (PDF) Emlőrak Konszenzus Konferencia – Az emlőrak korszerű sebészeti kezelése. ResearchGate. Accessed February 25, 2025. https://www.researchgate.net/publication/348065174_Emlorak_Konszenzus_Konferencia_-_Az_emlorak_korszeru_sebeszi_kezelese
27. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139(2):539-552. doi:10.1007/s10549-013-2560-8
28. Wang J, Wu SG. Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. *Breast Cancer Targets Ther*. 2023;15:721-730. doi:10.2147/BCTT.S432526
29. Jordan RM, Oxenberg J. Breast Cancer Conservation Therapy. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2025. Accessed March 6, 2025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547708/>

30. Goethals A, Menon G, Rose J. Mastectomy. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2025. Accessed March 6, 2025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538212/>
31. Handley RS. Indications and contraindications for mastectomy. *JAMA*. 1967;200(7):610-612. doi:10.1001/jama.200.7.610
32. Chakraborty S, Chatterjee S. Adjuvant radiation therapy in breast cancer: Recent advances & Indian data. *Indian J Med Res*. 2021;154(2):189-198. doi:10.4103/ijmr.IJMR_565_20
33. Thompson AM, Moulder-Thompson SL. Neoadjuvant treatment of breast cancer. *Ann Oncol*. 2012;23(Suppl 10):x231-x236. doi:10.1093/annonc/mds324
34. Kedzierawski P, Macek P, Ciepiela I, Kowalik A, Gozdz S. Evaluation of Complete Pathological Regression after Neoadjuvant Chemotherapy in Triple-Negative Breast Cancer Patients with BRCA1 Founder Mutation Aided Bayesian A/B Testing Approach. *Diagnostics*. 2021;11(7):1144. doi:10.3390/diagnostics11071144
35. Khasraw M, Bell R, Dang C. Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *The Breast*. 2012;21(2):142-149. doi:10.1016/j.breast.2011.12.012
36. Lim PT, Goh BH, Lee WL. 3 - Taxol: Mechanisms of action against cancer, an update with current research. In: Swamy MK, Pullaiah T, Chen ZS, eds. *Paclitaxel*. Academic Press; 2022:47-71. doi:10.1016/B978-0-323-90951-8.00007-2
37. Ogino MH, Tadi P. Cyclophosphamide. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2025. Accessed June 18, 2025. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553087/>
38. Hoeben A, Joosten EAJ, van den Beuken-van Everdingen MHJ. Personalized Medicine: Recent Progress in Cancer Therapy. *Cancers*. 2021;13(2):242. doi:10.3390/cancers13020242
39. Goudarzi KM, Lindström MS. Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review). *Int J Oncol*. 2016;48(4):1313-1324. doi:10.3892/ijo.2016.3387
40. Gomez MAR, Ibba M. Aminoacyl-tRNA synthetases. *RNA*. 2020;26(8):910-936. doi:10.1261/rna.071720.119
41. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, et al. Activating mutations in the NT5C2 nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med*. 2013;19(3):368-371. doi:10.1038/nm.3078
42. Rao S, Lee SY, Gutierrez A, et al. Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. *Blood*. 2012;120(18):3764-3773. doi:10.1182/blood-2012-03-415349
43. Nakagawa H, Wardell CP, Furuta M, Taniguchi H, Fujimoto A. Cancer whole-genome sequencing: present and future. *Oncogene*. 2015;34(49):5943-5950. doi:10.1038/onc.2015.90
44. Sim EUH, Ang CH, Ng CC, Lee CW, Narayanan K. Differential expression of a subset of ribosomal protein genes in cell lines derived from human nasopharyngeal epithelium. *J Hum Genet*. 2010;55(2):118-120. doi:10.1038/jhg.2009.124

45. Tye BW, Commings N, Ryazanova LV, et al. Proteotoxicity from aberrant ribosome biogenesis compromises cell fitness. Hinnebusch AG, Barkai N, Tollervy D, eds. *eLife*. 2019;8:e43002. doi:10.7554/eLife.43002
46. Holmberg Olausson K, Nistér M, Lindström MS. p53 -Dependent and -Independent Nucleolar Stress Responses. *Cells*. 2012;1(4):774-798. doi:10.3390/cells1040774
47. Nucleolar stress with and without p53 - PubMed. Accessed February 17, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25482194/>
48. Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A, et al. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol*. 2009;11(4):501-508. doi:10.1038/ncb1858
49. Fumagalli S, Ivanenkov VV, Teng T, Thomas G. Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev*. 2012;26(10):1028-1040. doi:10.1101/gad.189951.112
50. Teng T, Mercer CA, Hexley P, Thomas G, Fumagalli S. Loss of tumor suppressor RPL5/RPL11 does not induce cell cycle arrest but impedes proliferation due to reduced ribosome content and translation capacity. *Mol Cell Biol*. 2013;33(23):4660-4671. doi:10.1128/MCB.01174-13
51. Somkuti Judit. Fehérjék nyomás által indukált szerkezetváltozásainak jellemzése infravörös és fluoreszcencia spektroszkópiai módszerekkel. Published online 2014. doi:10.14753/SE.2014.1919
52. Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science*. 2016;353(6294):aac4354. doi:10.1126/science.aac4354
53. Orphan quality control by an SCF ubiquitin ligase directed to pervasive C-degrons - PMC. Accessed February 17, 2025. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10724198/>
54. Ciechanover A, Schwartz AL. The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2727-2730.
55. Peña C, Hurt E, Panse VG. Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat Struct Mol Biol*. 2017;24(9):689-699. doi:10.1038/nsmb.3454
56. Mayor T, Graumann J, Bryan J, MacCoss MJ, Deshaies RJ. Quantitative profiling of ubiquitylated proteins reveals proteasome substrates and the substrate repertoire influenced by the Rpn10 receptor pathway. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2007;6(11):1885-1895. doi:10.1074/mcp.M700264-MCP200
57. Analysis of polyubiquitin conjugates reveals that the Rpn10 substrate receptor contributes to the turnover of multiple proteasome targets - PubMed. Accessed February 17, 2025. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15699485/>
58. Jäkel S, Mingot JM, Schwarzmaier P, Hartmann E, Görlich D. Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J*. 2002;21(3):377-386. doi:10.1093/emboj/21.3.377

59. Shin Y, Brangwynne CP. Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*. 2017;357(6357):eaaf4382. doi:10.1126/science.aaf4382
60. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry | Nature Reviews Molecular Cell Biology. Accessed May 3, 2025. <https://www.nature.com/articles/nrm.2017.7>
61. Sundaravadivelu Devarajan D, Wang J, Szała-Mendyk B, et al. Sequence-dependent material properties of biomolecular condensates and their relation to dilute phase conformations. *Nat Commun*. 2024;15(1):1912. doi:10.1038/s41467-024-46223-w
62. Wang B, Zhang L, Dai T, et al. Liquid–liquid phase separation in human health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):1-16. doi:10.1038/s41392-021-00678-1
63. Gabaldón T, Pittis AA. Origin and evolution of metabolic sub-cellular compartmentalization in eukaryotes. *Biochimie*. 2015;119:262-268. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.021
64. Mummery CL, van de Stolpe A, Roelen B, Clevers H. Chapter 1 - The biology of the cell. In: Mummery CL, van de Stolpe A, Roelen B, Clevers H, eds. *Stem Cells (Third Edition)*. Academic Press; 2021:1-30. doi:10.1016/B978-0-12-820337-8.00001-0
65. Lafontaine DLJ, Riback JA, Bascetin R, Brangwynne CP. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(3):165-182. doi:10.1038/s41580-020-0272-6
66. A guide to membraneless organelles and their various roles in gene regulation | Nature Reviews Molecular Cell Biology. Accessed April 3, 2025. <https://www.nature.com/articles/s41580-022-00558-8>
67. Mao YS, Zhang B, Spector DL. Biogenesis and Function of Nuclear Bodies. *Trends Genet TIG*. 2011;27(8):295-306. doi:10.1016/j.tig.2011.05.006
68. Riggs CL, Kedersha N, Ivanov P, Anderson P. Mammalian stress granules and P bodies at a glance. *J Cell Sci*. 2020;133(16):jcs242487. doi:10.1242/jcs.242487
69. Yang P, Mathieu C, Kolaitis RM, et al. G3BP1 Is a Tunable Switch that Triggers Phase Separation to Assemble Stress Granules. *Cell*. 2020;181(2):325-345.e28. doi:10.1016/j.cell.2020.03.046
70. Decker CJ, Parker R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a012286. doi:10.1101/cshperspect.a012286
71. Hofweber M, Hutten S, Bourgeois B, et al. Phase Separation of FUS Is Suppressed by Its Nuclear Import Receptor and Arginine Methylation. *Cell*. 2018;173(3):706-719.e13. doi:10.1016/j.cell.2018.03.004
72. Liu JL, Gall JG. U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(28):11655-11659. doi:10.1073/pnas.0704977104

73. Syntabulin, a motor protein linker, controls dorsal determination | Development | The Company of Biologists. Accessed May 3, 2025. <https://journals.biologists.com/dev/article/137/6/923/44140/Syntabulin-a-motor-protein-linker-controls-dorsal>
74. Boke E, Ruer M, Wühr M, et al. Amyloid-like Self-Assembly of a Cellular Compartment. *Cell*. 2016;166(3):637-650. doi:10.1016/j.cell.2016.06.051
75. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins | Nature. Accessed May 3, 2025. <https://www.nature.com/articles/nature10879>
76. Du M, Chen ZJ. DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. *Science*. 2018;361(6403):704-709. doi:10.1126/science.aat1022
77. Gombás BG, Németh-Szatmári O, Nagy-Mikó B, Villányi Z. Role of Assemblysomes in Cellular Stress Responses. *WIREs RNA*. 2025;16(2):e70009. doi:10.1002/wrna.70009
78. Panasenko OO, Somasekharan SP, Villanyi Z, et al. Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assemblysomes. *Nat Struct Mol Biol*. 2019;26(2):110-120. doi:10.1038/s41594-018-0179-5
79. Nizami Z, Deryusheva S, Gall JG. The Cajal Body and Histone Locus Body. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(7):a000653. doi:10.1101/cshperspect.a000653
80. Handwerger KE, Cordero JA, Gall JG. Cajal Bodies, Nucleoli, and Speckles in the *Xenopus* Oocyte Nucleus Have a Low-Density, Sponge-like Structure. *Mol Biol Cell*. 2005;16(1):202-211. doi:10.1091/mbc.E04-08-0742
81. Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. PML Nuclear Bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(5):a000661. doi:10.1101/cshperspect.a000661
82. Spector DL, Lamond AI. Nuclear Speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(2):a000646. doi:10.1101/cshperspect.a000646
83. Hennig S, Kong G, Mannen T, et al. Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles. *J Cell Biol*. 2015;210(4):529-539. doi:10.1083/jcb.201504117
84. Courchaine EM, Lu A, Neugebauer KM. Droplet organelles? *EMBO J*. 2016;35(15):1603-1612. doi:10.15252/embj.201593517
85. Das S, Vera M, Gandin V, Singer RH, Tutucci E. Intracellular mRNA transport and localized translation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(7):483-504. doi:10.1038/s41580-021-00356-8
86. van Gijtenbeek LA, Kok J. Illuminating Messengers: An Update and Outlook on RNA Visualization in Bacteria. *Front Microbiol*. 2017;8. doi:10.3389/fmicb.2017.01161
87. Bakshi S, Choi H, Weisshaar JC. The spatial biology of transcription and translation in rapidly growing *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2015;6:636. doi:10.3389/fmicb.2015.00636

88. Fei J, Sharma CM. RNA Localization in Bacteria. *Microbiol Spectr.* 6(5):10.1128/microbiolspec.rwr-0024-2018. doi:10.1128/microbiolspec.rwr-0024-2018
89. Moffitt JR, Pandey S, Boettiger AN, Wang S, Zhuang X. Spatial organization shapes the turnover of a bacterial transcriptome. Green R, ed. *eLife.* 2016;5:e13065. doi:10.7554/eLife.13065
90. Nevo-Dinur K, Nussbaum-Shochat A, Ben-Yehuda S, Amster-Choder O. Translation-Independent Localization of mRNA in *E. coli*. *Science.* 2011;331(6020):1081-1084. doi:10.1126/science.1195691
91. Labeling native bacterial RNA in live cells | Cell Research. Accessed May 8, 2025. <https://www.nature.com/articles/cr201447>
92. So L hang, Ghosh A, Zong C, Sepúlveda LA, Segev R, Golding I. General properties of transcriptional time series in *Escherichia coli*. *Nat Genet.* 2011;43(6):554-560. doi:10.1038/ng.821
93. Llopis PM, Jackson AF, Sliusarenko O, et al. Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature.* 2010;466(7302):77-81. doi:10.1038/nature09152
94. Shepard KA, Gerber AP, Jambhekar A, et al. Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: Identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(20):11429-11434. doi:10.1073/pnas.2033246100
95. Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM. Localization of *ASH1* mRNA Particles in Living Yeast. *Mol Cell.* 1998;2(4):437-445. doi:10.1016/S1097-2765(00)80143-4
96. Gu W, Deng Y, Zenklusen D, Singer RH. A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses *ASH1* mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev.* 2004;18(12):1452-1465. doi:10.1101/gad.1189004
97. Paquin N, Ménade M, Poirier G, Donato D, Drouet E, Chartrand P. Local Activation of Yeast *ASH1* mRNA Translation through Phosphorylation of Khd1p by the Casein Kinase Yck1p. *Mol Cell.* 2007;26(6):795-809. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.016
98. Schmid M, Jaedicke A, Du TG, Jansen RP. Coordination of Endoplasmic Reticulum and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Curr Biol.* 2006;16(15):1538-1543. doi:10.1016/j.cub.2006.06.025
99. Gadir N, Haim-Vilmovsky L, Kraut-Cohen J, Gerst JE. Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* 2011;17(8):1551-1565. doi:10.1261/rna.2621111
100. Trcek T, Lehmann R. Germ granules in *Drosophila*. *Traffic.* 2019;20(9):650-660. doi:10.1111/tra.12674
101. Forrest KM, Gavis ER. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol CB.* 2003;13(14):1159-1168. doi:10.1016/s0960-9822(03)00451-2

102. Seydoux G. The P Granules of *C. elegans*: A Genetic Model for the Study of RNA–Protein Condensates. *J Mol Biol.* 2018;430(23):4702-4710. doi:10.1016/j.jmb.2018.08.007
103. Moor AE, Golan M, Massasa EE, et al. Global mRNA polarization regulates translation efficiency in the intestinal epithelium. *Science.* 2017;357(6357):1299-1303. doi:10.1126/science.aan2399
104. Luo Y, Na Z, Slavoff SA. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry.* 2018;57(17):2424-2431. doi:10.1021/acs.biochem.7b01162
105. Marcelo A, Koppenol R, de Almeida LP, Matos CA, Nóbrega C. Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? *Cell Death Dis.* 2021;12(6):1-17. doi:10.1038/s41419-021-03873-8
106. Tong X, Tang R, Xu J, et al. Liquid–liquid phase separation in tumor biology. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):1-22. doi:10.1038/s41392-022-01076-x
107. Alberti S, Dormann D. Liquid-Liquid Phase Separation in Disease. *Annu Rev Genet.* 2019;53:171-194. doi:10.1146/annurev-genet-112618-043527
108. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
109. Gibson BA, Doolittle LK, Schneider MWG, et al. Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation. *Cell.* 2019;179(2):470-484.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.08.037
110. Wang E, Aifantis I. RNA Splicing and Cancer. *Trends Cancer.* 2020;6(8):631-644. doi:10.1016/j.trecan.2020.04.011
111. Calses PC, Crawford JJ, Lill JR, Dey A. Hippo Pathway in Cancer: Aberrant Regulation and Therapeutic Opportunities. *Trends Cancer.* 2019;5(5):297-307. doi:10.1016/j.trecan.2019.04.001
112. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/s0092-8674(00)81683-9
113. Bradner JE, Hnisz D, Young RA. Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell.* 2017;168(4):629-643. doi:10.1016/j.cell.2016.12.013
114. Fox AH, Nakagawa S, Hirose T, Bond CS. Paraspeckles: Where Long Noncoding RNA Meets Phase Separation. *Trends Biochem Sci.* 2018;43(2):124-135. doi:10.1016/j.tibs.2017.12.001
115. Li RH, Tian T, Ge QW, et al. A phosphatidic acid-binding lncRNA SNHG9 facilitates LATS1 liquid–liquid phase separation to promote oncogenic YAP signaling. *Cell Res.* 2021;31(10):1088-1105. doi:10.1038/s41422-021-00530-9
116. Nair SJ, Yang L, Meluzzi D, et al. Phase separation of ligand-activated enhancers licenses cooperative chromosomal enhancer assembly. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(3):193-203. doi:10.1038/s41594-019-0190-5

117. Zhou H, Luo J, Mou K, et al. Stress granules: functions and mechanisms in cancer. *Cell Biosci.* 2023;13(1):86. doi:10.1186/s13578-023-01030-6
118. Mehta S, Zhang J. Liquid–liquid phase separation drives cellular function and dysfunction in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2022;22(4):239-252. doi:10.1038/s41568-022-00444-7
119. Gu X, Zhuang A, Yu J, Chai P, Jia R, Ruan J. Phase separation drives tumor pathogenesis and evolution: all roads lead to Rome. *Oncogene.* 2022;41(11):1527-1535. doi:10.1038/s41388-022-02195-z
120. Wootton JC. Non-globular domains in protein sequences: automated segmentation using complexity measures. *Comput Chem.* 1994;18(3):269-285. doi:10.1016/0097-8485(94)85023-2
121. Mitrea DM, Chandra B, Ferrolino MC, et al. Methods for physical characterization of phase separated bodies and membrane-less organelles. *J Mol Biol.* 2018;430(23):4773-4805. doi:10.1016/j.jmb.2018.07.006
122. Gao Y, Li X, Li P, Lin Y. A brief guideline for studies of phase-separated biomolecular condensates. *Nat Chem Biol.* 2022;18(12):1307-1318. doi:10.1038/s41589-022-01204-2
123. PubChem. Hexane-1,6-diol. Accessed May 17, 2025. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12374>
124. Li S, Wang Y, Lai L. Small molecules in regulating protein phase separation. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2023;55(7):1075-1083. doi:10.3724/abbs.2023106
125. Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules | eLife. Accessed May 17, 2025. <https://elifesciences.org/articles/06807>
126. Wheeler JR, Matheny T, Jain S, Abrisch R, Parker R. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. Nilsen TW, ed. *eLife.* 2016;5:e18413. doi:10.7554/eLife.18413
127. Düster R, Kalthéuner IH, Schmitz M, Geyer M. 1,6-Hexanediol, commonly used to dissolve liquid–liquid phase separated condensates, directly impairs kinase and phosphatase activities. *J Biol Chem.* 2021;296:100260. doi:10.1016/j.jbc.2021.100260
128. Itoh Y, Iida S, Tamura S, et al. 1,6-hexanediol rapidly immobilizes and condenses chromatin in living human cells. *Life Sci Alliance.* 2021;4(4). doi:10.26508/lsa.202001005
129. Németh-Szatmári O, Nagy-Mikó B, Györkei Á, et al. Phase-separated ribosome-nascent chain complexes in genotoxic stress response. *RNA.* 2023;29(10):1557-1574. doi:10.1261/rna.079755.123
130. Gombás BG, Villányi Z. 1,6-Hexanediol Is Inducing Homologous Recombination by Releasing BLM from Assemblysomes in *Drosophila melanogaster*. *Int J Mol Sci.* 2024;25(3):1611. doi:10.3390/ijms25031611
131. Samatova E, Dabberger J, Liutkute M, Rodnina MV. Translational Control by Ribosome Pausing in Bacteria: How a Non-uniform Pace of Translation Affects Protein Production and Folding. *Front Microbiol.* 2021;11. doi:10.3389/fmicb.2020.619430

132. Filbeck S, Cerullo F, Pfeffer S, Joazeiro CAP. Ribosome-associated Quality Control (RQC) Mechanisms from Bacteria to Humans. *Mol Cell*. 2022;82(8):1451-1466. doi:10.1016/j.molcel.2022.03.038
133. Kassem S, Villanyi Z, Collart MA. Not5-dependent co-translational assembly of Ada2 and Spt20 is essential for functional integrity of SAGA. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(3):1186-1199. doi:10.1093/nar/gkw1059
134. Cramer P, Armache KJ, Baumli S, et al. Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Biophys*. 2008;37:337-352. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.130008
135. Wild T, Cramer P. Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends Biochem Sci*. 2012;37(3):99-105. doi:10.1016/j.tibs.2011.12.001
136. Boulon S, Pradet-Balade B, Verheggen C, et al. HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. *Mol Cell*. 2010;39(6):912-924. doi:10.1016/j.molcel.2010.08.023
137. Boehning M, Dugast-Darzacq C, Rankovic M, et al. RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation. *Nat Struct Mol Biol*. 2018;25(9):833-840. doi:10.1038/s41594-018-0112-y
138. Phatnani HP, Greenleaf AL. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev*. 2006;20(21):2922-2936. doi:10.1101/gad.1477006
139. Presnyak V, Alhusaini N, Chen YH, et al. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell*. 2015;160(6):1111-1124. doi:10.1016/j.cell.2015.02.029
140. Hu W, Sweet TJ, Chamnongpol S, Baker KE, Collier J. Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 2009;461(7261):225-229. doi:10.1038/nature08265
141. Villanyi Z, Collart MA. Building on the Ccr4-Not architecture. *Bioessays*. 2016;38(10):997-1002. doi:10.1002/bies.201600051
142. Collart MA. The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;7(4):438-454. doi:10.1002/wrna.1332
143. Jiang H, Wolgast M, Beebe LM, Reese JC. Ccr4-Not maintains genomic integrity by controlling the ubiquitylation and degradation of arrested RNAPII. *Genes Dev*. 2019;33(11-12):705-717. doi:10.1101/gad.322453.118
144. Laribee RN. Ccr4-Not as a mediator of environmental signaling: a jack of all trades and master of all. *Curr Genet*. 2021;67(5):707-713. doi:10.1007/s00294-021-01180-5
145. Villanyi Z, Ribaud V, Kassem S, et al. The Not5 subunit of the ccr4-not complex connects transcription and translation. *PLoS Genet*. 2014;10(10):e1004569. doi:10.1371/journal.pgen.1004569
146. Collart MA, Panasenko OO. The Ccr4--not complex. *Gene*. 2012;492(1):42-53. doi:10.1016/j.gene.2011.09.033

147. Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*. 1998;2(1):135-140. doi:10.1016/s1097-2765(00)80122-7
148. Nishimura T, Padamsi Z, Fakim H, et al. The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5' and 3' Termini of Target mRNAs. *Cell Rep*. 2015;11(9):1425-1436. doi:10.1016/j.celrep.2015.04.065
149. Chalabi Hagkarim N, Grand RJ. The Regulatory Properties of the Ccr4-Not Complex. *Cells*. 2020;9(11):2379. doi:10.3390/cells9112379
150. Boulon S, Bertrand E, Pradet-Balade B. HSP90 and the R2TP co-chaperone complex: building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression. *RNA Biol*. 2012;9(2):148-154. doi:10.4161/rna.18494
151. Sejben A. Evaluation of diagnostic and prognostic features of breast cancer. Published online 2021.
152. Tharwat A. Classification assessment methods. *Appl Comput Inform*. 2021;17(1):168-192. doi:10.1016/j.aci.2018.08.003
153. Matthews BW. Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. *Biochim Biophys Acta*. 1975;405(2):442-451. doi:10.1016/0005-2795(75)90109-9
154. Baskin AS, Huppert LA, Kelil T, Singer L, Mukhtar RA. The neoadjuvant approach to treatment of breast cancer: Multidisciplinary management to improve outcomes. *Surg Oncol Insight*. 2024;1(2):100059. doi:10.1016/j soi.2024.100059
155. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res*. 2015;35(6):3147-3154.
156. Bonadonna G, Gianni L, Santoro A, et al. Drugs ten years later: Epirubicin. *Ann Oncol*. 1993;4(5):359-369. doi:10.1093/oxfordjournals.annonc.a058514
157. Tidefelt U, Sundman-Engberg B, Paul C. Intracellular uptake and cytotoxic effect in vitro of doxorubicin and epirubicin in human leukemic and normal hematopoietic cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1991;29(1):7-12. doi:10.1007/BF00686328
158. Ingolia NT. Ribosome Footprint Profiling of Translation throughout the Genome. *Cell*. 2016;165(1):22-33. doi:10.1016/j.cell.2016.02.066
159. Sobhany M, Stanley RE. Polysome Profiling Without Gradient Makers or Fractionation Systems. *J Vis Exp JoVE*. 2021;(172):10.3791/62680. doi:10.3791/62680
160. Fuchs G, Diges C, Kohlstaedt LA, Wehner KA, Sarnow P. Proteomic Analysis of Ribosomes: Translational Control of mRNA populations by Glycogen Synthase GYS1. *J Mol Biol*. 2011;410(1):118-130. doi:10.1016/j.jmb.2011.04.064
161. Vasan N, Baselga J, Hyman DM. A view on drug resistance in cancer. *Nature*. 2019;575(7782):299-309. doi:10.1038/s41586-019-1730-1

162. Ming Y, Chen X, Xu Y, et al. Targeting liquid-liquid phase separation in pancreatic cancer. *Transl Cancer Res.* 2019;8(1):96-103. doi:10.21037/tcr.2019.01.06
163. Stefanello ST, Mizdal CR, da Silva AF, Todesca LM, Soares FAA, Shahin V. Synergistic activity of Pitstop-2 and 1,6-hexanediol in aggressive human lung cancer cells. *Discov Nano.* 2025;20(1):12. doi:10.1186/s11671-025-04184-z
164. Jiang Y, Lei G, Lin T, et al. 1,6-Hexanediol regulates angiogenesis via suppression of cyclin A1-mediated endothelial function. *BMC Biol.* 2023;21:75. doi:10.1186/s12915-023-01580-8
165. Gupta I, Villanyi Z, Kassem S, et al. Translational capacity of a cell is determined during transcription elongation via the Ccr4-Not complex. *Cell Rep.* 2016;15(8):1782-1794. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.055
166. Guo D, Meng Y, Zhao G, Wu Q, Lu Z. Moonlighting functions of glucose metabolic enzymes and metabolites in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2025;25(6):426-446. doi:10.1038/s41568-025-00800-3
167. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell.* 2012;21(3):297-308. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.014
168. Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(7):452-464. doi:10.1038/s41568-018-0005-8
169. Hossen MdS, Islam MSU, Yasin M, Ibrahim M, Das A. A Review on the Role of Human Solute Carriers Transporters in Cancer. *Health Sci Rep.* 2025;8(1):e70343. doi:10.1002/hsr2.70343

9. Angol nyelvű összefoglaló

In the research presented in my thesis, we sought to answer the question of what role protein aggregation, as well as liquid-liquid phase separation and the resulting assembliesomes, may play in the development of resistance to chemotherapy in cancer diseases.

As the first question, we examined whether the response to neoadjuvant chemotherapy, widely used in the treatment of breast tumors, correlates with the extent of RPB1 — a protein that forms the backbone of the transcriptional machinery — aggregation. Based on our results, larger ($>1\ \mu\text{m}$ diameter) RPB1 foci were found more frequently in the cytoplasm of samples from non-regressing cases compared to those from partially regressing and completely regressing cases.

Next, we investigated whether the presence of the previously identified RPB1 aggregates could serve as a predictor of chemotherapy efficacy. To test this hypothesis, we performed immunostaining on samples with unknown phenotypes, then classified them into possible phenotypes based on their RPB1 pattern. We then compared the predicted and actual phenotypes of the samples and calculated the classification accuracy. In the test, we correctly predicted the phenotype in 10 out of 13 cases. Non-regressing cases were identified with 92% accuracy, partially regressing cases with 76%, and completely regressing cases with 84%.

Based on these results, we can conclude that the number of large cytoplasmic RPB1 foci, which we hypothesize to be aggregates, may serve as a potentially useful predictive marker for the success of neoadjuvant chemotherapy in breast tumors.

If tumor cells more effectively resist chemotherapy targeting transcription and replication—especially when the central transcriptional protein in these cells aggregates—it suggests that these cells are capable of compensating for the loss of transcription through other steps in gene expression. For instance, it is well-known that transcription and mRNA degradation are closely linked processes¹. Dori-Bachash and colleagues, in their experiments with yeast, further clarified that proteins involved in transcription and RNA decay have co-evolved, indicating a close collaboration between these two gene expression steps². Therefore, compensation might involve the use of previously synthesized mRNAs. This phenomenon could be explained not only by changes in RNA degradation but also by the presence of the recently discovered assembliesomes. Assembliesomes act as RNA storage, where RNAs are stable and even translationally competent.

For further investigation of the tissue sample results, we chose an approach that would allow a more direct examination of both the presence of assemblysomes and their role in chemoresistance. For these experiments, we used MCF7 breast tumor-derived cell cultures.

As the first step, we used immunostaining to examine whether NOT1-containing cytoplasmic foci, a reliable marker for assemblysomes, could be observed in the tumor cells, suggesting the presence of assemblysomes. We demonstrated that, as expected, numerous NOT1-containing cytoplasmic foci were present in MCF7 cells.

Next, we investigated whether liquid-liquid phase separation, affects the effectiveness of epirubicin, a commonly used chemotherapy agent in breast tumors. We know that assemblysomes form through liquid-liquid phase separation. To address this, we applied 1,6-hexanediol (HEX) treatment, as HEX disrupts weak, secondary interactions between macromolecules, thus inhibiting phase separation. First, we determined the HEX concentration that does not alter cell viability but is likely able to inhibit phase separation. Based on our experiments, this concentration was 1% m/v. We then searched for an epirubicin concentration that significantly reduces cell viability but to a degree where a synergistic effect could be detected in combination treatment. Our experiments showed that 20 $\mu\text{g/mL}$ of epirubicin was effective in this regard, resulting in an 89% survival rate. We then examined whether combining epirubicin with HEX would amplify the anti-proliferative effect. The combination of 20 $\mu\text{g/mL}$ of epirubicin and 1% m/v HEX resulted in 65.7% cell survival. This suggests that HEX treatment enhances the effectiveness of epirubicin, even when the HEX concentration alone is non-toxic to the cells. This observation implies that liquid-liquid phase separation plays a significant role in the development of resistance to epirubicin.

Following this, we enriched assemblysomes and polysomes from epirubicin-treated and control MCF7 cells by ultracentrifugation. Proteomic and RNA sequencing experiments were then performed to characterize the gene products present in the fractions. We identified the proteins and RNAs present in the assemblysomes and polysomes and examined which gene products were present in both forms. These genes were subjected to gene ontology analysis to determine which protein families exhibited translational changes due to epirubicin treatment. We found that enzymes involved in cellular metabolic processes, proteins involved in translation, and transporter proteins were primarily affected by the translational changes. This is consistent with known phenomena in the literature and provides a potential explanation for the resistance developed against epirubicin.

10. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10089263

A doktori eljárás alapját képező közlemény

Nagy-Mikó B, Németh-Szatmári O, Faragó-Mészáros R, Csókási A, Bognár B, Ördög N, és mtsai. Predictive Potential of RNA Polymerase B (II) Subunit 1 (RPB1) Cytoplasmic Aggregation for Neoadjuvant Chemotherapy Failure. *Int J Mol Sci.* 2023. november 1.;24(21):15869. doi:10.3390/ijms242115869

D1, IF: 4,9

Fokozatszerzéshez felhasznált, de a dolgozat alapját nem képező közlemény

Németh-Szatmári O, Nagy-Mikó B, Györkei Á, Varga D, Kovács BBH, Igaz N, és mtsai. Phase-separated ribosome-nascent chain complexes in genotoxic stress response. *RNA.* 2023. október;29(10):1557–74. doi:10.1261/rna.079755.123

Q1, IF: 4,5

Referált folyóiratban megjelent közlemény

Gombás BG, Németh-Szatmári O, Nagy-Mikó B, Villányi Z. Role of Assemblysomes in Cellular Stress Responses. *WIREs RNA.* 2025;16(2). doi:10.1002/wrna.70009.

D1, IF: 6,4

Összesített impakt faktor: 11,345

11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőim, Dr. Villányi Zoltán és Dr. Vörös András lelkiismeretes munkáját és azt, hogy a kutatómunkám alatt mindvégig bizalommal fordulhattam feléjük, szakmai támogatásukat mindvégig biztosították, időt és energiát nem kímélve.

Szeretném megköszönni az SZTE TTIK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék volt és jelenlegi tanszékvezetőjének, Prof. Dr. Boros Imrének és Dr. Bodai Lászlónak, hogy szakmai hozzájárulásukkal támogatták munkámat.

Szeretném hálám kifejezni kutatócsoportunk egykori és jelenlegi tagjainak, Németh-Szatmári Orsolyának, Gombás Bence Györgynek, Német Kristófnak, Bognár Bencének, Bagi Nikolettnek és Balogh Dórának, valamint szakdolgozóimnak Faragó-Mészáros Rékának és Dr. Csókási Aliznak, hogy technikai segítségükkel, szorgos munkájukkal és ötleteikkel támogattak.

Köszönettel tartozom egykori témavezetőmnek, Dr. Sinka Ritának, és konzulensemnek, Dr. Vedelek Viktornak, akik segítettek a szakdolgozati és diplomamunkám, lehetőséget biztosítottak a labormunka rejtelmeinek megismerésére, és mind szakmailag, mind pedig emberileg támogattak a tudományos pályán.

Külön köszönöm tanszékünk egykori munkatársának, Dr. Vedelek Balázsnak, hogy szakmai segítséget nyújtott a munkám során és minden felmerülő technikai kérdésre megadta a választ.

Hálával tartozom tanszékünk valamennyi volt és jelenlegi munkatársának, főként Igaz Nórának, Adamecz Dórának, Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónikának, Dr. Huliák Ildikónak, Dr. Zsindely Nórának és Nagy Gábornak, hogy hozzájárultak a munkámhoz a laborban nyújtott segítségükkel, illetve szakmai tanácsaikkal.

Hálásan köszönöm a HUN-REN SZBK proteomikai laboratóriumának munkatársainak a proteomikai kísérletek elvégzésében és az adatok elemzésében nyújtott segítséget.

Végül pedig szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a támogatást, akik végig mellettem álltak és átsegítettek a nehéz helyzeteken.

A dolgozat megvalósításához szükséges pénzügyi támogatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal által támogatott GINOP-2.3.2-15-2016-00020, GINOP-2.3.2-15-2016-00038 és OTKA-K-142961 (V.Z.).

12. Függelékek

1) A felhasznált core biopsziaminták jellemzői és a hozzájuk tartozó azonosítószámok.

Regresszió csoport	Minta azonosító szám
Nincs regresszió	12, 15, 20, 21*
Parciális regresszió	8, 11, 16*, 18, 19
Teljes regresszió	3, 9, 10, 13
Ismeretlen regressziós státusz	1, 2, 4, 5, 6, 7, 14, 16*, 17, 21*, 22, 23, 24

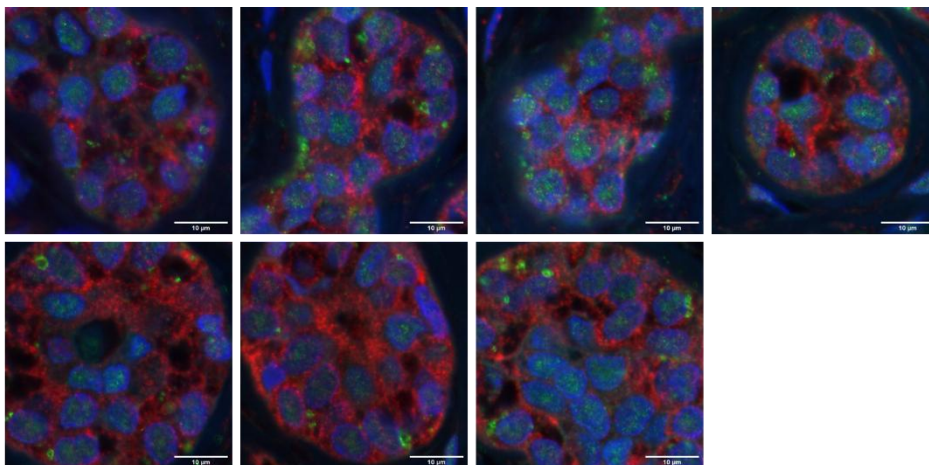
*egyes minták ismert és ismeretlen fenotípusúkat is felhasználásra kerültek. Ezekben az esetekben egy új preparátumon újra elvégzésre került az immunfestés és új felvételek készültek. A vizsgált mintapéldányok nem voltak beazonosíthatók az értékelést megelőzően.

Minta azonosító	Tumor bank azonosító	Nem	Életkor	Tumor grade	ER	PR	HER2	Regressziós pontszám	Regressziós fenotípus
1	5212/20	nő	66	3	8	6	neg	TR2	Nincs
2	5789/20	nő	76	3	0	0	poz	TR1	Teljes
3	8053/18	nő	66	1	8	0	neg.	TR1	Teljes
4	8217/19	nő	46	3	5	5	neg.	TR2	Parciális
5	10560/20	nő	61	3	0	0	neg	TR1	Teljes
6	10957/20	nő	63	3	NA	NA	NA	TR3	Nincs
7	11086/20	nő	63	2	8	8	neg	TR3	Nincs
8	12356/18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Parciális
9	13126/18	nő	43	3	0	0	neg.	TR1	Teljes
10	13452/18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Teljes
11	15213/19	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Parciális
12	15362/18	nő	66	3	8	8	neg.	TR3	Nincs
13	15428/18	nő	41	3	0	0	neg.	TR1	Teljes
14	15542/19	nő	46	3	0	0	poz.	TR1	Teljes
15	15722/18	nő	52	2	7	3	neg.	TR3	Nincs
16	17490/19	nő	46	2	8	8	neg.	TR2	Parciális
17	18440/19	nő	69	3	8	8	neg	TR1	Parciális
18	18875/18	nő	69	3	8	8	pos.	TR2	Parciális
19	19305/19	nő	60	3	0	0	neg.	TR2	Parciális
20	19920/18	nő	56	2	8	8	neg.	TR3	Nincs
21	21192/18	nő	40	3	0	0	neg.	TR3	Nincs
22	21825/19	nő	57	3	8	8	neg	TR2	Parciális
23	22316/19	nő	72	3	0	0	neg	TR3	Parciális
24	22376/19	nő	40	3	7	7	poz	TR3	Nincs

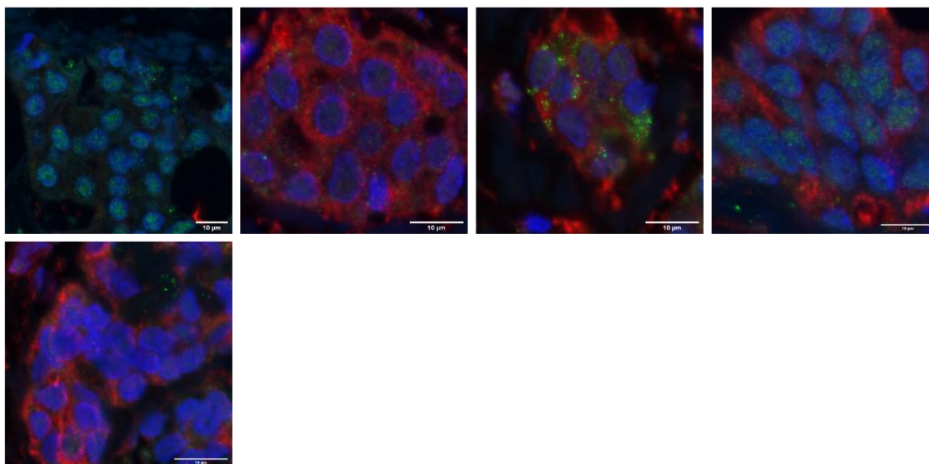
- 2) Az emlőtumor core biopsziaminták mikroszkópos képei (DAPI- kék, RPB1 - Alexa488- zöld, HSP90 - Alexa647 - piros)

Ismert fenotípusú minták:

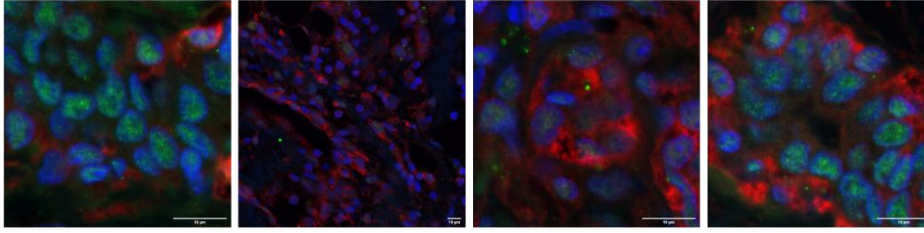
15722/18



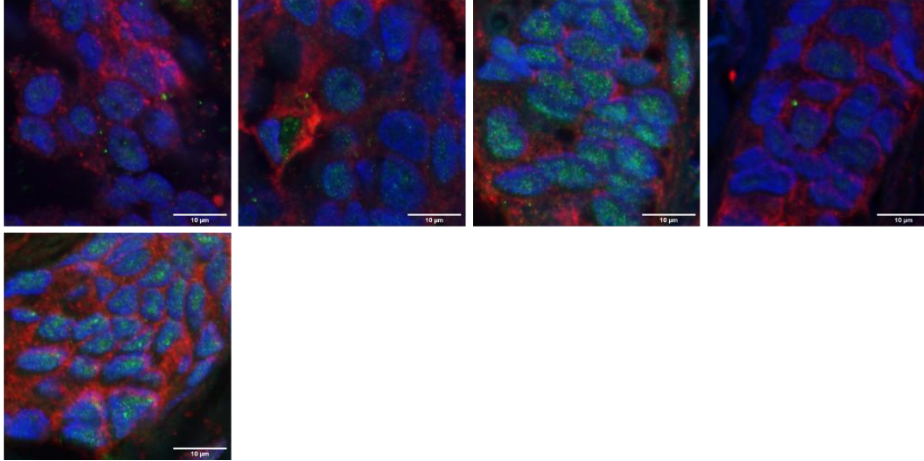
15362/18



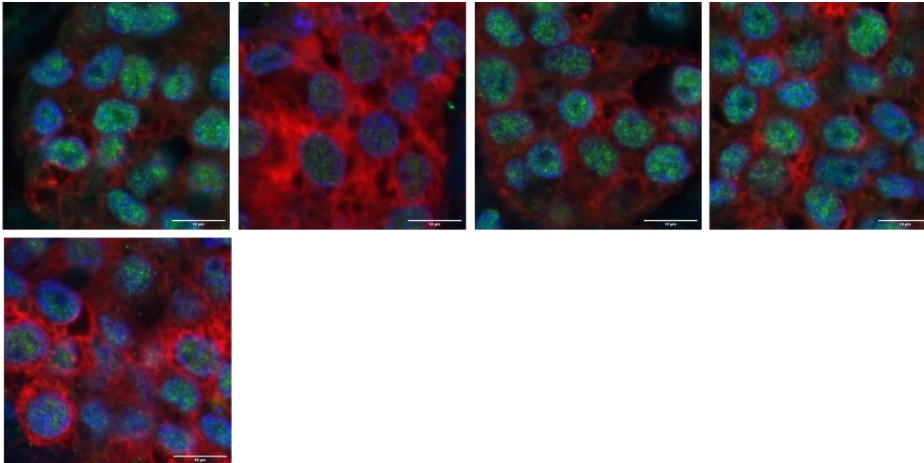
21192/18



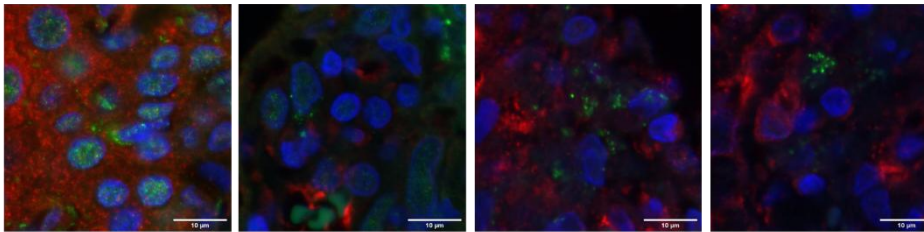
19920/18



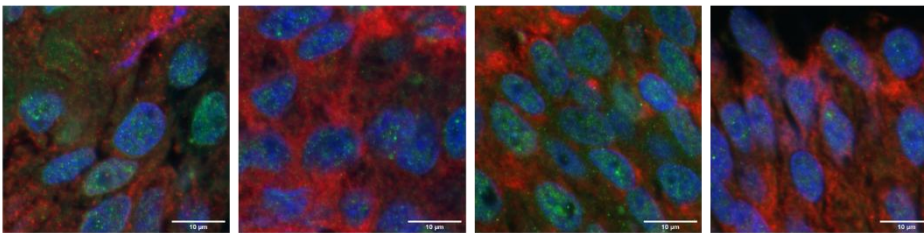
17490/19



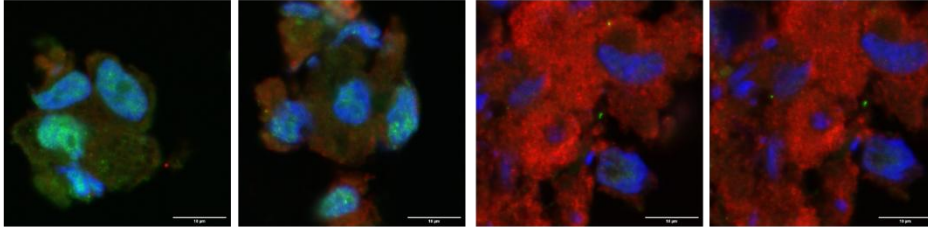
12356/18



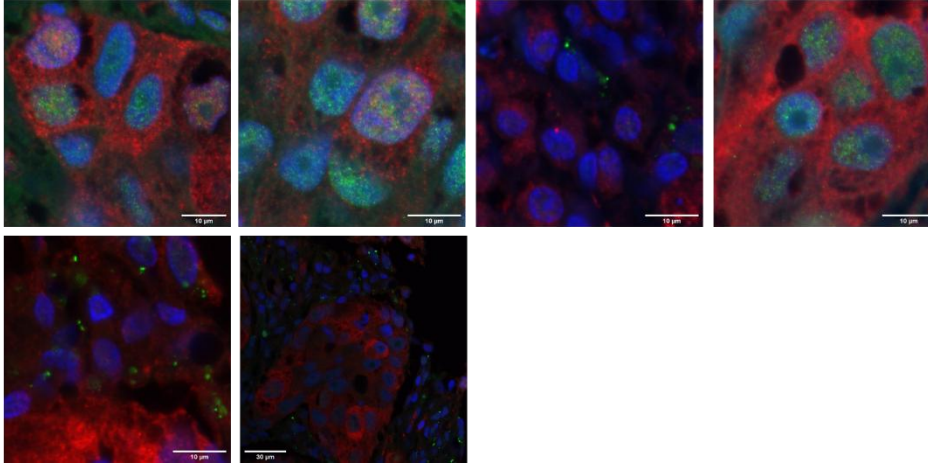
15213/19

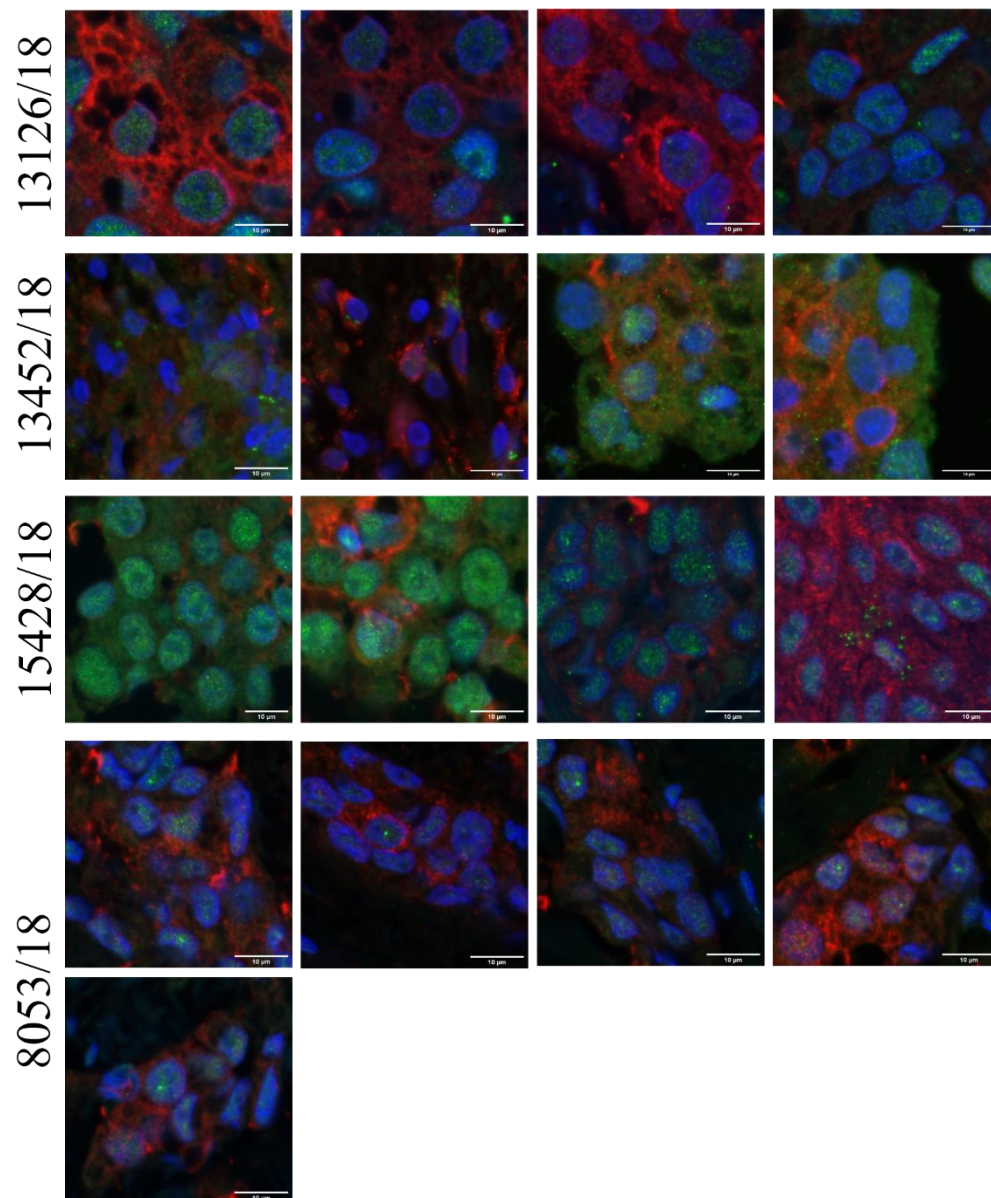


18875/18



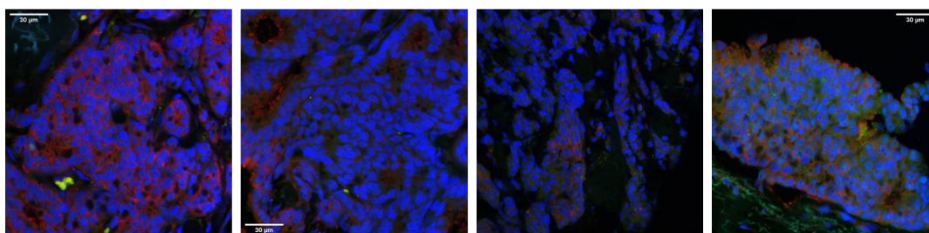
19920/18



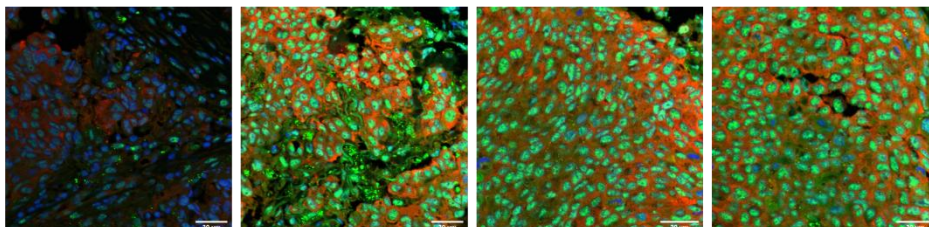


Ismeretlen fenotípusú minták:

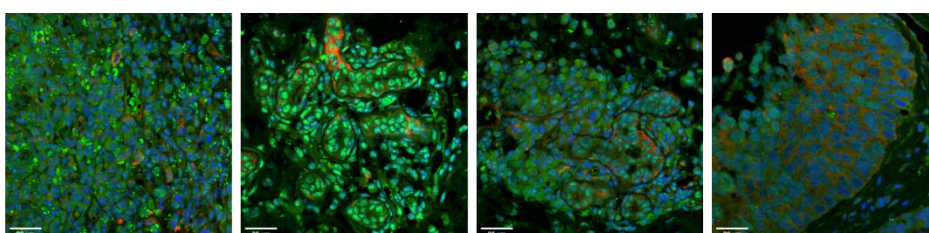
11086/20



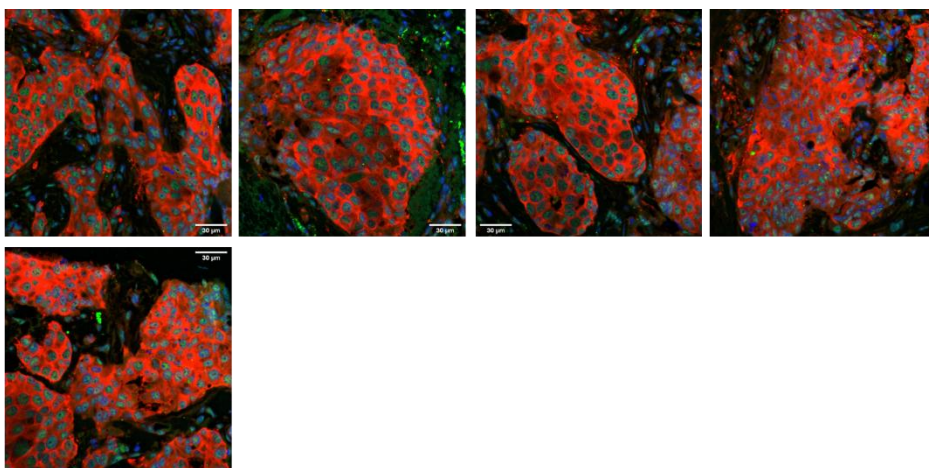
22376/19



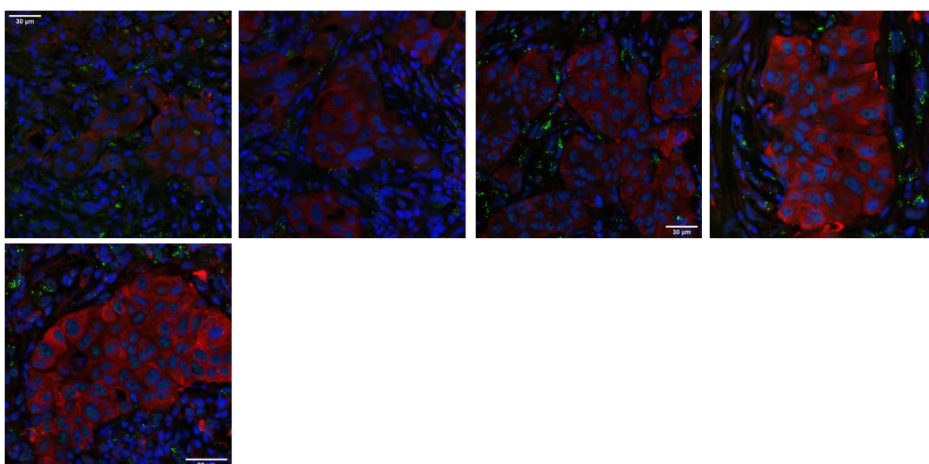
21192/18



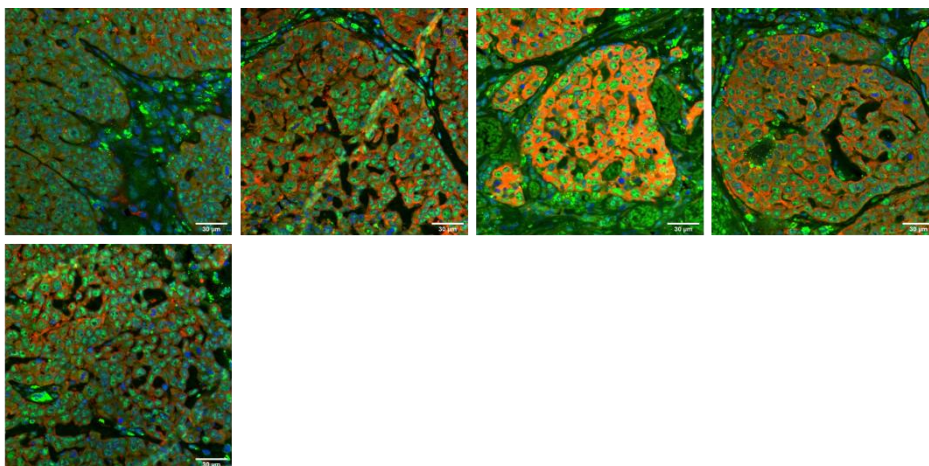
5212/20



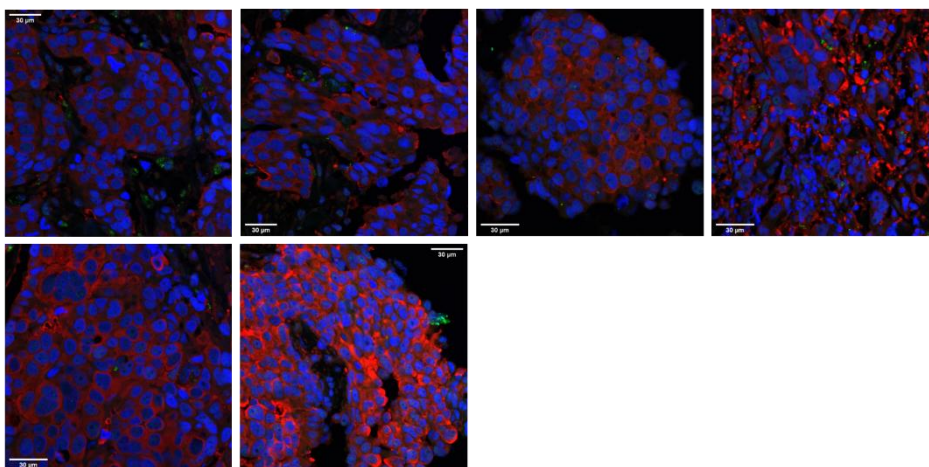
10957/20



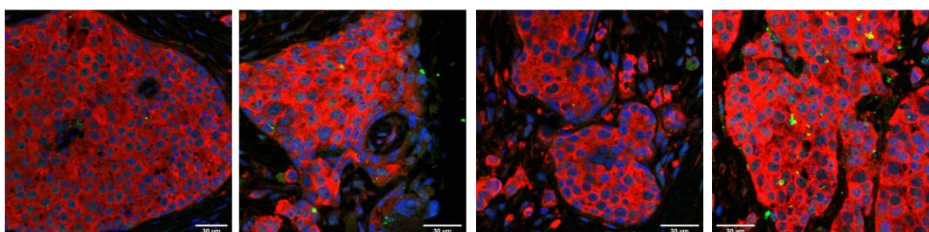
22316/19



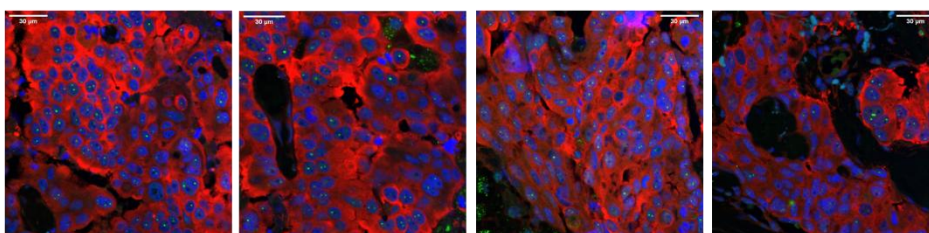
28217/19



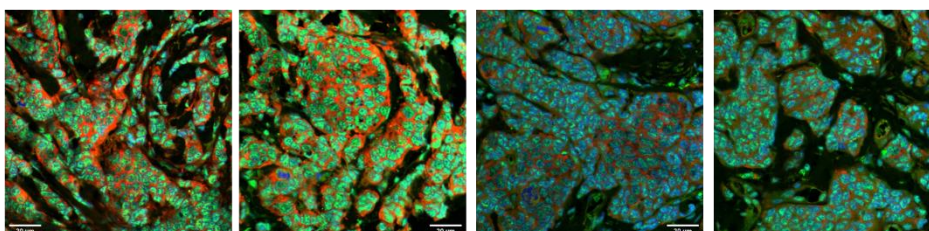
17490/19

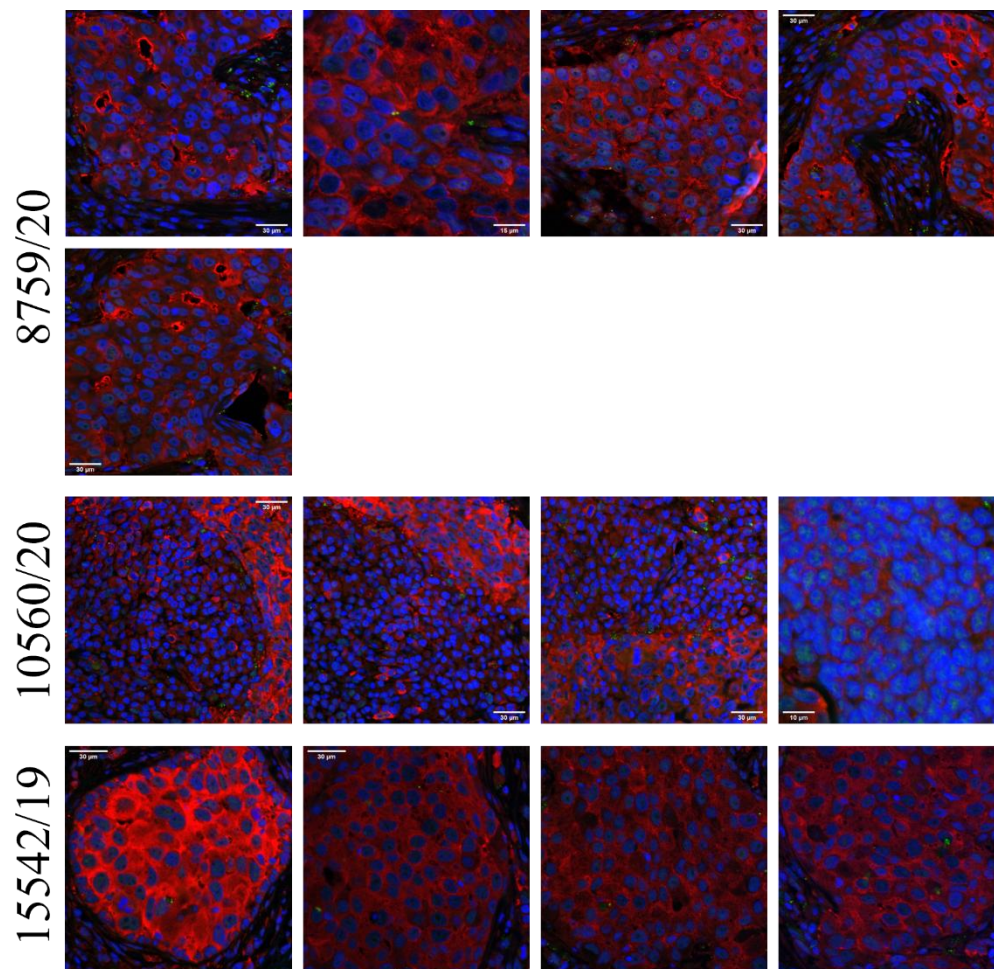


18440/19

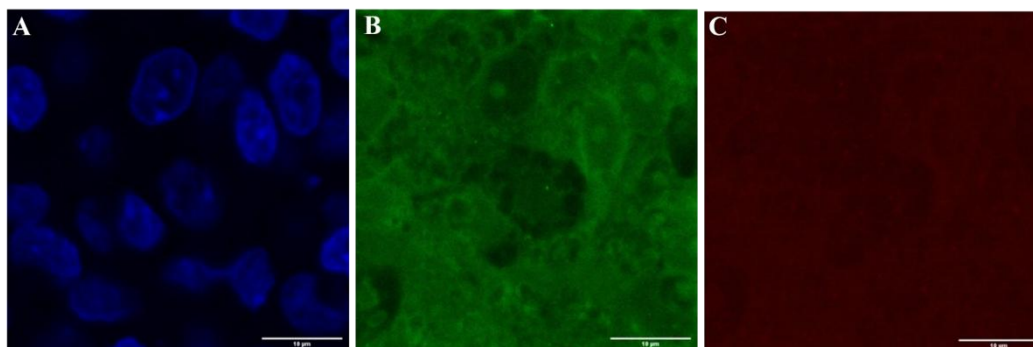


21825/19





Kontroll festések:



Emlőtumor core biopszia minta kontroll immunfestése A: DAPI (kék); B: Alexa488 (zöld) másodlagos ellenanyag elsődleges ellenanyag nélkül, C: Alexa647 (piros) másodlagos ellenanyag elsődleges ellenanyag nélkül

3) MTT assay kísérletek eredményei

HEX MTT assay kísérlet nyers eredmény adatai

HEX koncentráció [m/v%]:	Mérés_1	Mérés_2	Mérés_3	Mérés_4
0	0,923077	1,029272	1,004765	1,042886
0,1	1,26889	1,241661	1,339687	1,366916
0,5	1,173587	1,127297	1,132743	1,247107
1,0	0,993873	0,792376	0,939415	0,963921
1,5	0,539142	0,419333	0,50919	0,530973
2,0	0,019061	0,010892	0,013615	0,021784

HEX MTT assay kísérleti eredmények normalizált adatai

HEX koncentráció [m/v%]:	Mérés_1	Mérés_2	Mérés_3	Mérés_4	Átlag	Szórás*	Átlag [%]	Szórás* [%]
0	1	1	1	1	1	0,035124	100	3,512413
0,1	1,189718	1,108935	1,162791	1,182375	1,232622	0,088991	123,2622	8,899062
0,5	1,250918	1,358629	1,135863	1,104039	1,191273	0,087173	119,1273	8,717339
1,0	1,130967	1,192166	1,258262	1,204406	1,059423	0,161436	105,9423	16,14356
1,5	0,151775	0,208078	0,154223	0,112607	0,328165	0,188596	32,81652	18,85962
2,0	0,017136	0,019584	0,02448	0,03672	0,020409	0,007878	2,040872	0,787811

*a szórás az eredeti mérési eredményekre vonatkozik

Epirubicin MTT assay kísérlet eredményeinek nyers adatai

Epirubicin koncentráció [µg/mL]:	Mérés_1	Mérés_2	Mérés_3	Mérés_4
0	0,923077	1,029272	1,004765	1,042886
0,2	0,78693	0,846835	0,855003	0,871341
1	1,034717	1,187202	1,151804	1,192648
5	0,993873	0,784207	0,9258	0,743363
10	1,029272	0,656229	0,724302	0,904016
20	0,884956	0,658952	0,827774	0,746086
30	0,389381	0,266848	0,422056	0,383935
40	0,261402	0,261402	0,212389	0,201498
50	0,291355	0,209666	0,206943	0,133424

Epirubicin MTT assay kísérlet eredményeinek normalizált adatai

Epirubicin koncentráció [µg/mL]:	Mérés_1	Mérés_2	Mérés_3	Mérés_4	Átlag	Szórás*	Átlag [%]	Szórás* [%]
0	1	1	1	1	1	0,035124	100	3,512413
0,2	0,780906	0,844553	0,812729	1,037944	0,85453	0,080905	85,45301	8,090538
1	1,101591	1,177479	1,265606	1,243574	1,169328	0,07438	116,9328	7,43803
5	1,040392	1,064871	1,246022	1,233782	1,004039	0,184725	100,4039	18,47248
10	1,023256	1,00612	1,19951	1,53978	1,010311	0,276496	101,0311	27,64964
20	0,651163	1,101591	1,0306	1,238678	0,892475	0,214177	89,24749	21,41768
30	0,685435	0,734394	0,917993	1,011016	0,601382	0,274928	60,13821	27,4928
40	0,438188	0,656059	0,69033	0,768666	0,436242	0,235961	43,62419	23,59608
50	0,350061	0,457772	0,445532	0,492044	0,32335	0,134025	32,33498	13,40251

*a szórás az eredeti mérési eredményekre vonatkozik

HEX + Epirubicin MTT assay kísérlet eredményeinek nyers adatai

HEX és Epirubicin koncentráció	Mérés_1	Mérés_2	Mérés_3	Mérés_4
0% + 20 µg/mL	1	0,744615	0,935385	0,843077
5,0% + 20 µg/mL	0,766154	0,72	0,627692	0,806154
1,0% + 20 µg/mL	0,467692	0,590769	0,593846	0,713846
1,5% + 20 µg/mL	0,295385	0,372308	0,403077	0,501538
2,0% + 20 µg/mL	0,335385	0,267692	0,298462	0,406154

HEX + Epirubicin MTT assay kísérlet eredményeinek normalizált adatai

HEX és Epirubicin koncentráció	Mérés_1	Mérés_2	Mérés_3	Mérés_4	Átlag	Szórás*	Átlag [%]	Szórás* [%]
0% + 20 µg/mL	0,647596	1,095557	1,024954	1,231893	0,940385	0,190228	94,03846	19,02277
5,0% + 20 µg/mL	1,141814	1,078515	1,244066	0,830189	0,901823	0,222596	90,18229	22,25961
1,0% + 20 µg/mL	0,70846	0,764455	0,856969	0,562386	0,657303	0,125685	65,7303	12,56851
1,5% + 20 µg/mL	0,043822	0,068168	0,065733	0,055995	0,225753	0,187534	22,57533	18,75344
2,0% + 20 µg/mL	0,017042	0,017042	0,017042	0,031649	0,173808	0,168345	17,38085	16,8345

*a szórás az eredeti mérési eredményekre vonatkozik