

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

ASSZEMBLISZÓMÁK VALAMINT A FEHÉRJEAGGREGÁCIÓ ÉS A TERÁPIAREZISZTENCIA ÖSSZEFÜGGÉSEINEK VIZSGÁLATA EMLŐTUMORBAN

NAGY-MIKÓ BENCE

**TÉMAVEZETŐK:
DR. VILLÁNYI ZOLTÁN
(EGYETEMI ADJUNKTUS)**

**DR. VÖRÖS ANDRÁS
(HABILITÁLT EGYETEMI DOCENS)**

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



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

SZEGED

2025

Bevezetés

Az emlőtumor világszinten és Magyarországon is az egyik leggyakoribb daganatos megbetegedés a nők körében. A diagnózis felállítása során nagy jelentősége van a prognosztikai és prediktív markerek vizsgálatának, melyek a betegség várható kimeneteléről adnak információt, továbbá segítik a megfelelő terápiás megközelítés kiválasztását. Az új prediktív markerek azonosítása segítheti a betegek túlélési esélyeit.

Az RPB1 fehérje biogenezisének sajátosságaiból kifolyólag a sejt chaperon folyamatainak indikátoraként fogható fel, valamint aggregációj a génkifejeződés különböző lépései között fennálló egyensúly eltolódására utal. Ennek oka, hogy az aggregálódott RPB1 nem képes részt venni a transzkripcióban ezt a jelenséget a sejt a korábban megszintetizált mRNS-ek stabilitásának növelésével és azok újbóli felhasználásával lehet képes kompenzálni.

Erre alkalmasak lehetnek az asszembliszmák, melyek translációban elakadt riboszóma-mRNS-naszccens fehérjelánc-komplexek. Az asszembliszmákból felszabaduló mRNS-ek képesek megvédeni a sejteket a DNS-károsító hatásokkal szemben így az is lehetséges, hogy az asszembliszmák védelmet biztosíthatnak a tumorsejtek számára a kemoterápiás kezeléssel szemben. Az asszembliszmák folyadék-folyadék

fázisszeparációval alakulnak ki, így vizsgálatok legkönnyebb 1,6-haxándiol kezeléssel végezhető el. Ez a vegyület képes felbontani a makromolekulák közti gyenge másodlagos kölcsönhatásokat, ez által megakadályozva a fázisszeparációt.

Az epirubicin az egyik legszélesebb körben alkalmazott szer az emlőtumорок kezelésére. Hatását a DNS-be integrálódva fejti ki, gátolja a transzkripciót és a replikációt, valamint szabadgyökök keletkezését is elősegíti, ami további DNS károsodáshoz vezet. Az asszembliszómák képesek megvédeni a sejteket a DNS-károsító stresszhatásoktól, valamint fontos szerepük van a sok komponensből felépülő fehérjekomplexek összeszerelődési folyamataiban. Az asszembliszómákban megtalálható géntermékek és a kemoterápiás kezelés hatására ezekben bekövetkező változások új utakat nyithatnak meg a tumoros megbetegedések kezelésének területén.

Célkitűzések

Kutatásunk 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 emlőtumor biopszia-mintákon, valamint MCF7 emlőtumoreredetű 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 fehérjeaggregáció jelensége alkalmas-e a kemoterápiára adott válasz előrejelzésére?
 - Az RPB1 aggregációs mintázatának eloszlását terveztük vizsgálni ismeretlen terápiás kimenetelű esetekhez tartozó invazív NST- emlőkarcinómából származó biopsziás mintákon, majd a minták feltételezett kimeneteli csoportokba történő kategorizálását terveztük

elvégezni. 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 transzlációs állapotváltozást epirubicin kezelés hatására?

- Epirubicinnel kezelt MCF7-tumorsejtkultúrákból és kontrollmintákból asszembliszómákat és poliszómákat tervzetünk izolálni ultracentrifugálás segítségével, majd az

így készített mintákat transzkriptomikai és proteomikai módszerekkel terveztük vizsgáltuk.

Módszerek

A Kísérleteink során neoadjuváns kemoterápián átesett emlőtumoros betegek formaldehiddel fixált, parafinba ágyazott, kezelést megelőző core biopsziás mintáit használtuk fel. A neoadjuváns terápiát követő regresszió mértéke alapján 3 fenotípus csoportot (teljes, parciális, illetve nem regrediáló) alkottunk

A biopszia mintákon fluoreszcens-immunhisztokémiai festéseket végeztünk RPB1 (ab26721 és sc-47701) illetve HSP90 (sc-13119) ellenanyaggal. Az immunfestett minták vizsgálatára konfokális mikroszkópot használtunk. A mikroszkópos felvételek segítségével jellemeztük az a különböző fenotípusokhoz tartozó minták RPB1 és HSP90 eloszlását.

A korábbiakban meghatározott festődési mintázatok alapján ismeretlen fenotípusú mintákat kategorizáltunk be a feltételezett regressziós csoportokba. ezt követően összevetettük a feltételezett és a valós fenotípusokat és kiszámítottuk a besorolási pontosságot.

Fluoreszcens-immuncitokémiai festéseket végeztünk MCF-7 emlőtumor-eredetű sejtvonalon NOT1 ellenanyaggal (PA5-62024) az asszembliszómák jelenlétének igazolására.

Az asszembliszómák kemorezisztenciában betöltött szerepének igazolásra az MCF-7 sejteket a fázisszeeparáció gátlására alkalmas 1,6-hexándiolóllal, a kemoterápiában széles körben alkalmazott epirubicinnel illetve ezen szerek kombinációjával kezeltük. A sejtek túlélését MTT-assay segítségével vizsgáltuk.

Ultracentrifugálás segítségével asszembliszómákat és poliszómákat, illetve csak asszembliszómákat tartalmazó frakciókat tisztítottunk epirubicin kezelt és kontroll sejtekből. A frakciók tartalmát proteomikai módszerek és RNS-szekvenálás segítségével vizsgáltuk, az asszembliszómákban tárolt géntermékek változásaink jellemzése céljából.

Fontosabb eredmények, tézispontok

1. Megállapítottuk, hogy a nagyobb méretű ($>1\ \mu\text{m}$ átmérő) citoplazmatikus RPB1 fókuszok, melyek nagy valószínűséggel fehérjeaggregátumok, nagyobb arányban fordulnak elő a nem regresszáló mintákban, mint a parciálisan és teljesen regresszáló mintákban.
2. 13 ismeretlen fenotípusú esetből 10-et megfelelő regressziós fenotípusban soroltunk be az RPB1 mintázat alapján. Az előrejelzési pontosság a regressziót nem mutató minták

esetében 92%, a parciálisan regrediáló minták esetében 76% a teljesen regrediáló minták esetében pedig 84% volt.

3. Bizonyítottuk, hogy az MCF-7 sejtekben megfigyelhetők NOT1 tartalmú citoplazmatikus fókuszok, amik asszembliszómák jelenlétére utalnak.

4. Megállapítottuk, hogy a fázisszeparációnak fontos szerepe van az epirubicinnel szemben kialakuló rezisztenciában, mivel az epirubicin és az 1,6-hexándiol kezelés hatásai között szinergiát mutattunk ki.

5. Meghatároztuk azokat a géntermékeket, amelyek mind fehérje, mind RNS formában felhalmozódnak az asszembliszómákban illetve a poliszómákon az MCF-7 sejtekben.

6. Meghatároztuk, hogy mely géntermékek mutatnak mennyiségi változást az asszembliszómákban illetve a poliszómákon epirubicin kezelés hatására.

7. Kimuattuk, hogy epirubicin kezelés hatására megváltozik az MCF-7 sejtekben a transláció szabályozásában részt vevő, illetve transzporter funkciójú fehérjék translációjának dinamikája, valamint, hogy a sejtekben jelentős metabolikus újraprogramozás megy végbe.

Összefoglalás

Kutatásunk során kimutattuk, hogy az RPB1 citoplazmatikus aggregációja korrelál a neoadjuváns kemoterápia sikerességével emlőtumorok esetében. Megállapítottuk, hogy az RPB1 citoplazmatikus aggregációja a kemoterápia hatékonyságának potenciális prediktív markere.

Igazoltuk, hogy az asszembliszómák jelen vannak az MCF-7 sejtekben. Valamint, hogy a folyadék-folyadék fázisszeparáció szerepet játszik az epirubicinnel szemben kialakuló kemorezisztenciában.

Jellemeztük az MCF-7 sejtek asszembliszóma és poliszóma frakcióiban fehérje és RNS szinten feldúsuló géntermékeket. Megállapítottuk, hogy a tumorsejtekben metabolikus újraprogramozás megy végbe az epirubicin kezelés hatására, mivel az energianyerő folyamatokhoz kapcsolódó enzimeket kódoló gének termékei az asszembliszómákból a poliszómákra helyeződnek át. Ezen felül a transzlációban szerepet játszó fehérjéket kódoló gének termékei a poliszómákról az asszembliszómákba helyeződnek át, továbbá a transzporter funkciójú fehérjék transzlációs dinamikája is átrendeződést mutat a kezelés hatására.

Summary

In our research, we demonstrated that cytoplasmic aggregation of RPB1 correlates with the success of neoadjuvant chemotherapy in breast tumors. We proved that the cytoplasmic aggregation of RPB1 is a potential predictive marker for chemotherapy efficacy.

We confirmed the presence of assemblysomes in MCF-7 cells, and showed that liquid-liquid phase separation contributes to the development of chemoresistance against epirubicin.

We characterized gene products enriched at the protein and RNA level within the assemblysome and polysome fractions of MCF-7 cells. Our results revealed that epirubicin treatment triggers metabolic reprogramming in tumor cells, as the products of genes encoding enzymes related to energy-producing pathways shift from assemblysomes to polysomes. Furthermore, gene products encoding proteins involved in translation relocate from polysomes to assemblysomes, and the translational dynamics of transporter-function proteins are also reshaped in response to the treatment.

Publikációk listája

MTMT azonosító: 10089263

A fokozatszerzéshez felhasznált közlemények listája:

1. 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**
2. 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**

Egyéb tudományos közlemények listája:

1. 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

Nyilatkozat

Alulírott írott Németh-Szatmári Orsolya (SZTE TTIK Biokémia és Molekuláris Biológiai Tanszék, Transzlációsabályozás Kutatócsoport), a Nagy-Mikó Bence doktori fokozatszerzési eljárásának alapját képező társszerzős publikáció (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) elsőszerzőjeként nyilatkozom, hogy a jelöltnek meghatározó szerepe volt a fent említett közlemény létrehozásában.

A tanulmány elsőszerzőjeként én, illetve a tanulmány felelős szerzőjeként Dr. Villányi Zoltán (SZTE TTIK Biokémia és Molekuláris Biológiai Tanszék, Transzlációsabályozás Kutatócsoport) hozzájárulunk ahhoz, hogy a publikációt a jelölt felhasználja az SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola doktori fokozatszerzési eljárásához szükséges társszerzős közleményként, és egyúttal kijelentjük, hogy a fenti publikációt más társszerző nem használta fel társszerzős közleményként tudományos fokozat megszerzéséhez, és ezt a jövőben sem fogja megtenni.

Szeged, 2025.08.06.

.....

Németh-Szatmári Orsolya
elsőszerző

.....

Dr. Villányi Zoltán
felelős szerző