

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**AZ ASSZEMBLISZÓMA AZONOSÍTÁSA, MINT
FÁZISSZEPARÁLT RIBOSZÓMA-NASZCENS FEHÉRJE
KOMPLEX, VALAMINT MŰKÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA**

NÉMETH-SZATMÁRI ORSOLYA

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

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

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

SZEGED

2025

Bevezetés

A sejten belüli kompartmentalizáció rendkívül jól szervezett, mivel ezáltal válik elérhetővé számtalan folyamat és útvonal pontos tér-, valamint időbeli szabályozása. A folyadék-folyadék fázisszeparáció egy módot kínál a térbeli szervezettség elérésére a membrán nélküli organellumok (MLO-k) kialakításával. Ezek az organellumok számos biológiai funkcióhoz kapcsoltak, ugyanakkor a fázisszeparáció zavara nagyszámú patológiás következményt von maga után, mint a szív- és érrendszeri megbetegedések, a neurodegeneratív rendellenességek (amilyen az Alzheimer-, Parkinson- és Huntington-kór), anyagcserezavarok, vérképzési problémák, illetve a daganatos megbetegedések. A sejtdinamikában betöltött sokrétű szerepe miatt a fázisszeparáció, és az általa kialakult MLO-k, működésének megértése nagy jelentőséggel bír, valamint a megszerzett tudás segítheti a hatékony terápiefejlesztést.

Valószínűsíthető, hogy az asszembliszómak, melyek a citoplazmatikus MLO-k egy csoportját alkotják, több fehérjekomplex összeállításában is szerepet játszanak. Mindeddig csak élesztőben írták le őket az Rpt1 és Rpt2 proteaszómális alegységek összeszerelődése kapcsán. Ezek

olyan ribonukleoprotein komplexek (RNC-k), melyek tartalmazzák a translációban megakadt riboszómákat a kilógó naszcens fehérje láncokkal együtt. Szerepet játszanak a génexpresszió szabályozásában, valamint a fehérje komplexek kotranszlációs összeszerelődésében. Megkülönbözteti őket a többi, citoplazmatikus membrán nélküli organellumtól, hogy EDTA, RNáz és ciklohexamid rezisztenciát mutatnak.

Az asszembliszómák olyan központoknak tekinthetők, amelyek a koordinált fehérje összeszerelődést és érést biztosítják a részben transzlált géntermékek reverzibilis kötődésén keresztül, biztosítva azok megfelelő feltekeredését és funkciójuk betöltését.

Célkitűzések

Kutatásunk során célul tűztük ki az asszembliszómák komponenseinek azonosítását és fizikai tulajdonságaik, valamint a sejtben betöltött funkciójuk megismerését, illetve fázisszeparációs eredetük igazolását.

Kérdéseink megválaszolásához élesztőn, valamint MCF7 és A549 humán tumoros sejtvonalakon terveztünk *in silico* analíziseket és modern biológiai vizsgálatokat kivitelezni (ultracentrifugálás, RT-qPCR, dSTORM és TEM

mikroszkópia, teljes genom szekvenálás, a sejtek kolóniaképző képességének vizsgálata ismételt besugárzást követően).

Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen egyéb fehérjék tárolódhatnak még asszembliszómákban a korábban azonosított Rpt1- és Rpt2-es proteaszómális alegységek mellett?
 - Az asszembliszómákban tárolt komponensek kilétének felderítéséhez globális *in silico* analízist terveztünk elvégezni élesztő sejteken, majd a lehetséges jelölteket biokémiai vizsgálatokkal kívántuk megerősíteni.
2. Az asszembliszómákban tárolt komponensek hogyan reagálnak különböző stresszhatásokra?
 - A feltehetően asszembliszómákban tárolt mRNS-ek mennyiségi változásainak követésére egy hatékony asszembliszóma izoláló protokollt terveztünk kidolgozni, melynek segítségével lehetőségünk adódna az asszembliszómákat érintő, különböző stresszhatások okozta mennyiségi változások azonosítására RT-qPCR technikával.
3. Az asszembliszóma milyen szerkezettel rendelkezik?

- Annak céljából, hogy az asszembliszómák fizikai tulajdonságairól információhoz jussunk, dSTORM mikroszkópiát terveztünk élesztősejteken.

4. Az asszembliszómák, hasonlóan a többi MLO-hoz, fázisszeeparációval alakulnak-e ki?

- 1,6-hexándiollal (HEX) dolgoztunk ki kísérleteket a kérdés megválaszolásához, ugyanis erről az alifás alkoholról ismert, hogy hatékonyan gátolja a fázisszeeparációhoz szükséges gyenge hidrofób kölcsönhatásokat a fehérje és RNS molekulák között.

5. Vajon az asszembliszómák jelen vannak-e a magasabbrendű eukariótákban is?

- MCF7 humán emlő adenokarcinóma sejtvonalból származó mRNS könyvtárak szekvenálását terveztük annak céljából, hogy információhoz jussunk a humán sejtekben lévő asszembliszóma komponensek funkciójáról, illetve, hogy ezeknél a fehérjéknél megfigyelhető-e az N-terminális rendezetlensége, hasonlóan az élesztőkhöz.

6. Az asszembliszómák szerepet játszanak-e a kemorezisztencia kialakításában?

- A kérdés megválaszolásához A549 sugárrezisztensnek vélt sejtek kolóniaképző tulajdonságának vizsgálatát szándékoztam megvalósítani ismételt irradiációt követően, HEX jelenlétében. A kísérlettel igazolható az asszembliszómák DNS javításban betöltött szerepe.

Módszerek

Az élesztőben található potenciális asszembliszóma komponensek azonosításához bioinformatikai elemzést végeztem. A fehérjék rendezetlenségét a PONDR VSL2B algoritmussal vizsgáltam, ez alapján készítettem el a listánkat, viszont egyéb fehérje rendezetlenség predikciós algoritmusokkal is tanulmányoztam a fehérjéket és hasonló eredményeket kaptam (Hotloops, IUPred, Globplot, Espritz).

Az *in silico* vizsgálati eredmények megerősítéséhez a potenciális jelöltek (*SGS1*, *RAD10* és *RAD14* mRNS-ek) jelenlétét az EDTA-rezisztens granulumokban, vagyis asszembliszómákban RT-qPCR analízissel vizsgáltam. Az asszembliszómákban tárolt komponensek azonosításához a következő kísérleti elrendezést fejlesztettük: a sejtlyázatot egy tisztító fugálási lépést követően ultracentrifugálással ülepítjük EDTA jelenlétében, mely hatására a poliszómák és a 80S riboszómák alegységeikre bomlanak, így a fugálási lépést

követően a pelleték kizárólag asszembliszómákat tartalmaznak. Az asszembliszóma komponensek mennyiségi változásait különböző stresszhatásra az asszembliszómák izolálására alkalmas kísérleti elrendezésben vizsgáltuk RT-qPCR analízissel a teljes kivonatokból és pelletékből származó mRNS mintákon. Proteotoxikus stresszhatásként CuSO_4 kezelést, míg genotoxikus stresszhatásként UV sugárzást alkalmaztunk. Továbbá ezzel a módszerrel azonosítottuk az asszembliszómák fázisszeparációs eredetét UV és HEX kezelést követően.

dSTORM képalkotó eljárást alkalmaztunk a granulomok fizikai tulajdonságainak azonosításához az élesztősejteken, valamint TEM mikroszkópiával azonosítottuk a sugárrezisztensnek vélt humán A549 sejtek citoplazmájában a HEX érzékeny riboszóma csoportokat. Továbbá A549 sejteket ionizáló sugárzással és HEX-szel kezeltünk az asszembliszómákban tárolt faktorok hibajavításban betöltött szerepének igazolásához.

Az MCF7 sejtekből nyert ultracentrifugálási mintákon teljes genom szekvenálással azonosítottuk a poliszómákhoz és asszembliszómákhoz kapcsolt mRNS-eket, illetve azokat génontológiai elemzésnek vetettük alá a funkciójuk felderítése céljából. Permutációs teszttel igazoltuk a rendezetlen N-

terminálissal rendelkező fehérjék dúsulását az asszembliszómákban a szekvenálási eredményeket analizálva.

Fontosabb eredmények, tézispontok

1. Megállapítottuk, hogy számos, a DNS hibajavításban és a stresszválaszban szerepet játszó fehérje asszembliszómákban tárolódhat élesztőben.
2. Biokémiai módszerekkel igazoltuk, hogy az Sgs1, Rad10 és Rad14-es fehérjék, melyek a DNS károsodásra adott válasz fontos szereplői, asszembliszómákban tárolódnak.
3. Bizonyítottuk, hogy az általunk vizsgált riboszóma-naszcents fehérje komplexek eltérő viselkedési mintázatot mutatnak különböző stresszhatásokra: míg a poliszóma/asszembliszóma arány csökkent (mely az asszembliszómákban való dúsulást jelzi) proteotoxikus stresszhatásra, addig az arány emelkedett (mely a poliszómákhoz kapcsolt RNS-ek nagyobb mennyiségét jelzi) genotoxikus stresszhatásra.
4. Megállapításra került, hogy az Sgs1 és Rpt1 fehérjét tartalmazó riboszóma-naszcents fehérje komplexek a citoplazmában nem egyesével helyezkednek el, hanem egymással szorosan összekapcsolódva alakítják ki az

asszembliszómákat. A különböző fehérjéket tartalmazó asszembliszómák eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek.

5. Igazoltuk, hogy az asszembliszómák, hasonlóan a többi MLO-hoz, fázisszeparációval alakulnak ki, tehát rendelkeznek a kondenzátumokra jellemző dinamikussággal, valamint védve vannak a riboszóma minőségellenőrzési folyamataitól.
6. Bizonyítottuk, hogy az MCF7 sejtekben azonosított asszembliszóma komponensek főként a DNS hibajavításban és a stresszválaszban játszanak szerepet, míg a poliszómákhoz kapcsolt RNS-ek transzlációhoz, annak szabályozásához és mitokondriális funkciókhoz kapcsoltak.
7. Kimutattuk, hogy a rendezetlen amino-terminálissal rendelkező génproduktumok nagyobb valószínűséggel tárolódnak az asszembliszómákban.
8. Bizonyítottuk, hogy az asszembliszómák szerepet játszanak a hatékony DNS károsodásra adott válasz kialakításában, és mindez a fázisszeparáció révén szabályozódik ezekben a sejtekben.

Összefoglalás

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az élesztőben azonosított asszembliszómákban olyan komponensek tárolódnak, melyek a DNS-t érintő károsodások javításában játszanak szerepet, mint pl. a kettősszalú törések javításáért felelős Sgs1 fehérje. dSTORM és transzelektronmikroszkópiás vizsgálatokkal felderítettük, hogy 8-9 Sgs1 naszcens lánc-riboszóma komplex szoros összekapcsolódásával alakulnak ki a ~100 nm átmérőjű asszembliszómák és igazoltuk fázisszeparációs eredetüket HEX bevonásával.

Az MCF7 humán emlőkarcinóma sejtek szekvenálásából származó adatok azt mutatják, hogy a stresszválaszban és a DNS hibajavításban szerepet játszó fehérjék dúsulnak a humán asszembliszómákban is, hasonlóan az élesztőn végzett vizsgálatok eredményével. A szekvenálási adatok továbbá igazolták az *in silico* megfigyelésünket, vagyis az asszembliszómákban nagy számban vannak jelen a rendezetlen N-terminálissal rendelkező fehérjék.

A HEX-szel végzett kísérleteink érzékenyebbé tették a tumorsejteket a sugárkezeléssel szemben a fázisszeparáció megbontása révén. Hatékony stratégiát jelenthet a tumoros

sejteknek a túlélésüket segítő fehérjék asszembliszómákban történő felhalmozása.

Summary

Assemblysomes are a distinct group of cytoplasmic membraneless organelles. They are ribonucleoprotein complexes (RNCs) that contain translationally stalled ribosomes with protruding nascent protein chains.

Through bioinformatic analysis, we identified other potentially phase-separating components stored in the assemblysome, like Rpt1 and Rpt2, such as the Sgs1 protein, which involved in the UV-induced damage repair. Using dSTORM and transmission electron microscopy, we characterized the structure of the granules formed by the association of Sgs1 nascent chain-ribosome complexes and confirmed their phase-separation origin. The ring-shaped granules, approximately 100 nm in diameter, are formed by 8–9 ribosomes with their associated mRNA and protein molecules.

Sequencing data from MCF7 human breast carcinoma cells indicate that mRNAs of mitochondrial and ribosomal proteins, whose translation is influenced by Not1 interaction,

are not involved in the formation of assemblysomes. In contrast, proteins involved in stress response and DNA repair are enriched within them. Furthermore, the sequencing results also confirmed our *in silico* observation, that proteins with disordered N-termini are present in large numbers in assemblysomes.

The dynamics of these cytoplasmic granules are universally regulated and are not influenced by the nature of the gene product they contain. Proteotoxic stress increases the number of assemblysomes, whereas genotoxic stress causes the transformation of assemblysomes into polysomes, resulting in their decrease.

Our experiments with HEX sensitized tumor cells to radiation by disrupting phase separation. Accumulation of proteins that support tumor cell survival into assemblysomes represent an effective strategy.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

MTMT azonosító: 10069846

Összesített impakt faktor: 14,2

A doktori eljárás alapját képező publikációk:

1. Orsolya Németh-Szatmári, Bence Nagy-Mikó, Ádám Györkei, Dániel Varga, Bálint Barna H Kovács, Nóra Igaz és mtsai: *Phase- Separated Ribosome- Nascent Chain Complexes in Genotoxic Stress Response*. RNA 30, no. 4: 1557–1574. <https://doi.org/10.1261/rna.079755.123>. Q1 besorolás, IF: 4,5.
2. Bence Nagy-Mikó, Orsolya Németh-Szatmári, Réka Faragó-Mészáros, Aliz Csókási, Bence Bognár, és mtsai : *Predictive Potential of RNA Polymerase B (II) Subunit 1 (RPB1) Cytoplasmic Aggregation for Neoadjuvant Chemotherapy Failure*. International Journal of Molecular Sciences 24, no. 21: 15869. <https://doi.org/10.3390/ijms242115869>. Q1 besorolás, IF: 4,9.

Egyéb publikációk:

1. Bence György Gombás, Orsolya Németh-Szatmári, Bence Nagy-Mikó, Zoltán Villányi: *Role of Assemblysomes in Cellular Stress Responses*. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2025 Mar-Apr;16(2):e70009. doi: 10.1002/wrna.70009. Q1 besorolás, IF: 4,8.

Nyilatkozat

Alulírott Nagy-Mikó Bence (SZTE TTIK Biokémia és Molekuláris Biológiai Tanszék, Transzlációsabályozás Kutatócsoport), a Németh-Szatómári Orsolya doktori fokozatszerzési eljárásának alapját képező társszerzős publikáció (Nagy-Mikó B, Németh-Szatómári 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) 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, 2025.09.30.

.....
Nagy-Mikó Bence
elsőszerző

.....
Dr. Villányi Zoltán
felelős szerző

