

Fázisszeparált riboszóma-naszcentsfehérje-komplexek viselkedése eltérő stresszhatásokra

Németh-Szatmári Orsolya, Gombás Bence György,
Nagy-Mikó Bence, Villányi Zoltán

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és Informatikai Kar,
Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Summary

The recently discovered assemblysomes form a distinct group of cytoplasmic, phase-separated, membraneless organelles (MLOs). Panasenko and colleagues identified Not1-containing granules that contain ribosome associated nascent chains of the proteasomal subunits Rpt1 and Rpt2, which serve as the site for co-translational assembly of these proteins, and the name "Not1-containing assemblysomes" (NCAs) is derived from this finding [1]. Recent data suggests that assemblysomes might contain many more nascent chains involved in timely stress response [2]. These cell components differ from other MLOs in several properties: their size is 100-200 nm [2], [3], [4], they can only be pelleted by ultracentrifugation [5], [6], they are resistant to CHX (Cycloheximide) and EDTA [1], [7], [8], and they contain both the small and large subunits of the ribosome [2]. The assemblysomes contain ribosomes stalled in translation, along with the associated mRNA molecules and nascent protein chains (disordered N-terminus protruding from the ribosome's exit tunnel) [1], [2]. RNCs (Ribosome Nascent Chain Complexes) establish the assemblysomes [9]. The focus of our research group's studies is on assemblysomes. Our results suggest that assemblysomes form through phase separation, and we have demonstrated their evolutionary conservation as well as their role in DNA repair processes and in stress response [2], [9].

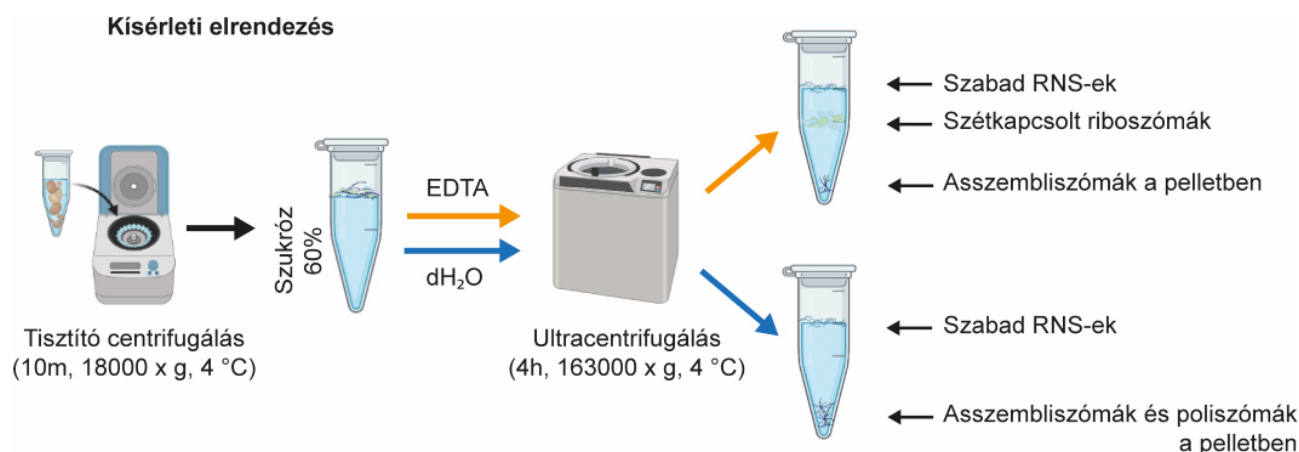
Keywords: assemblysomes, NCAs, phase separation, 1,6-hexanediol

Nélkülözhetetlen a megfelelő sejtműködés fenntartása szempontjából a különböző génexpressziós lépések egymás közötti kommunikációja. Mivel az eukariótákban a két fő génexpressziós lépés, vagyis a transzkripció és a transzláció, térben elválasztott folyamatok, így azok finomhangolását számos mechanizmus segíti, ezáltal megteremtve a lehetőséget a génkifejeződés poszttranszkripció szabályozására. Ebben a folyamatban kap szerepet többek között a Ccr4-Not komplex is. Legnagyobb aleggysége, a Not1, képes az általa kötött mRNS-ek transzlációjának fokozására, illetve a komplex szerepet játszik az RNS polimeráz II és a SAGA transzkripció komplexek kotranszlációs összeszerelődésében is [10], [11].

Az utóbbi időben merült fel a fázisszeparáció indukálta kompartmentalizáció szerepe a génkifejeződés szabályozásában, illetve az, hogy az ily módon kialakult membrán nélküli organellek (Membrane Less Organelles-MLO-k) (mint a P-testek, stressz granulumok) szerepet játszanak a hatékony stresszválasz kialakításában [12], [13, o.], [14]. Az MLO-k dinamikus biológiai kondenzátumok, melyek számos sejten belüli folyamat tér- és időbeli szabályozását segítik [15].

A citoplazmatikus, fázisszeparált, membrán nélküli organellek különálló csoportját képezik a nemrég azonosított asszembliszómák. Panasenko és munkatársai írták le az Rpt1 és Rpt2 proteaszómális aleggységek naszcens láncait tartalmazó RNC-ket (Ribosome Nascent Chain Complexes) és Not1-et tartalmazó granulumokat, melyek a fehérjék kotranszlációs összeszerelődésének helyszínéül szolgálnak, és innen ered az elnevezésük is: Not1-containing

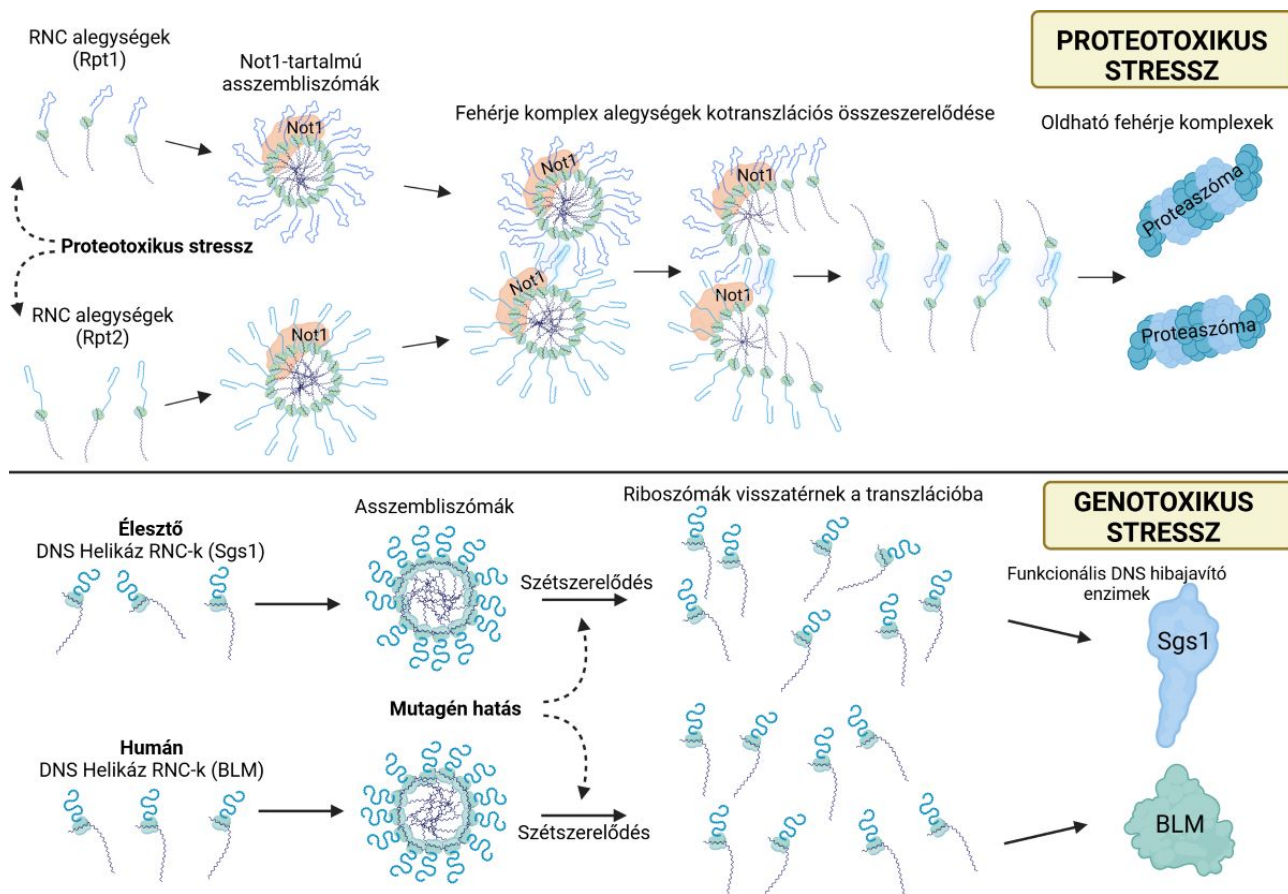
assemblysomes (NCAs) [1]. Ezek a sejtalkotók számos tulajdonságukban eltérnek a többi MLO-tól: méretük 100-200 nm; kizárólag ultracentrifugálással ülepíthetőek; CHX- és EDTA-rezisztensek; illetve tartalmazzák a riboszóma kis és nagy alegységét egyaránt [2], [3], [4], [5, o.], [6], [1], [7], [8]. Az asszembliszómákban jelen vannak a transzlációban elakadt riboszómák, a hozzájuk kapcsolt mRNS molekulákkal és naszcens fehérje láncokkal együtt (melyek transzlált, rendezetlen N-terminálisa kilóg a riboszóma kilépő alagútjából) [1], [4]. Az asszembliszómákat felépítő RNC-k esetében az mRNS-hez nem riboszómák láncolata, hanem egyedi riboszómák kapcsolódnak, ami arra utal, hogy kialakulásukkor blokkolódik a soron következő riboszóma transzlációjának iniciációja [9]. A transzláció folytatására szolgáló jelzés nem más, mint az interakciós partnerek között kialakuló kölcsönhatás. Amennyiben a kölcsönhatás gátolt, a fehérjék feltekeredése sérül, alternatív konformációt vesznek fel, végső soron pedig a proteaszómba való beépülésük nem megfelelő. Az Rpt1 és Rpt2 fehérjék N-terminálisai rendezetlen régiókat tartalmaznak, melyek hiánya esetén a granulumok kialakulása akadályozott [1].



1.ábra. Kísérleti elrendezés az asszembliszómák vizsgálatához [4].

Kutatócsoportunk vizsgálatainak középpontjában az asszembliszómák állnak. Első lépésként megvizsgáltuk, hogy mely egyéb fehérjék tárolódhatnak asszembliszómákban az Rpt1 és Rpt2 mellett. Mivel az asszembliszómák RNáz rezisztensek, ezért a korábban alkalmazott riboszóma profilozási eljárás nem alkalmazható az asszembliszómák tartalmának teljes körű felderítésére, így egy hatékony bioinformatikai módszert fejlesztettünk ki a kérdés megválaszolására. Megvizsgáltuk *in silico* az összes *Saccharomyces cerevisiae* fehérje komplex alegységet azon szűrők alapján, melyek az asszembliszómák formálódásához szükségesek [4]. Ezek a következők: kiterjedt rendezetlen régiók megléte az N-terminálison; lizin aminosavak jelenléte a rendezetlen régió környékén (a ubikvitinációról tudjuk, hogy szükséges az asszembliszómák kialakulásához); illetve a ritka kodonpárok megléte ebben a régióban, ami megakasztja vagy jelentősen lassítja a transzlációt [1], [4]. A találatok között dústak a stresszválaszban és a DNS hibajavításban szerepet játszó fehérjék [4]. Ezek közül választottunk ki három fehérjét: Sgs1, Rad10 és Rad14, melyek jelenlétét az asszembliszómákban megerősítettük kísérletes úton is. Mindhárom fehérje komplex alegységként funkcionálva a DNS-t érintő hibák javításában játszik szerepet [16], [17]. Az asszembliszómákban tárolt komponensek azonosításához a következő kísérleti elrendezést alkalmazzuk: az élesztő/humán lizátumot egy 60%-os cukor grádiensen ultrafugáljuk, melyet megelőz egy tisztítási lépés (mely során megszabadulunk a

sejttörmelékektől, és az egyéb citoplazmatikus MLO-któl, mint a stressz granulumok és a P-testek) (1. ábra) [4]. Az EDTA képes szétválasztani a riboszóma kis és nagy alegységét, ezáltal hatékonyan megbontja a poliszómákat, melyek az ultrafugálás során a cukoroszlopban vagy annak felszínén maradnak, és egyedül az EDTA-rezisztens asszembliszómákban tárolt komponensek lesznek képesek arra, hogy a cukoroszlopon átjutva a pelletben dúsuljanak (1. ábra) [4], [9].

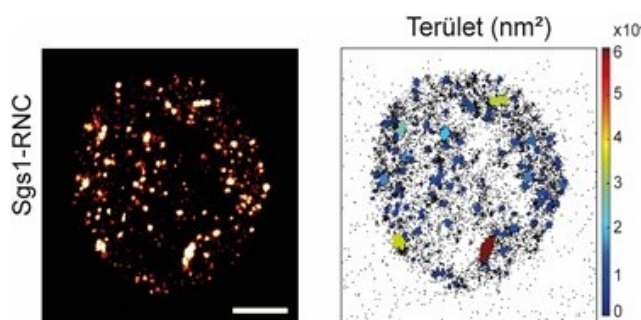


2. ábra. Az asszembliszómák viselkedése különböző stresszhatásokra [9].

Megvizsgáltuk az asszembliszómákban tárolt mRNS-ek mennyiségi változásait különböző stresszhatásokra: míg proteotoxikus stresszhatásra (CuSO_4 kezelés) nőtt az asszembliszómákban tárolt mRNS-ek mennyisége, addig genotoxikus stresszhatásra (UV-kezelés) az ellenkező hatást azonosítottuk, vagyis csökkent az asszembliszómákban tárolt, általunk vizsgált mRNS-ek (*SGS1*, *RAD10*, *RAD14*, *RPT1* és *RPT2*) mennyisége, ám ezzel egyidejűleg nőtt a poliszómákhoz kapcsolt, aktív translációban lévő mRNS mennyiség [9], [18]. Ennek a megfigyelésnek a hátterében az állhat, hogy míg a proteotoxikus stresszhatásra keletkezett nagyszámú hibás fehérje eliminációjához szükséges az Rpt1 és Rpt2 asszembliszómákba történő felhalmozása, ezáltal pedig nagyszámú proteasóma termelése, addig genotoxikus stresszhatásra a keletkezett DNS hibák javításához nélkülözhetetlenek az asszembliszómákban tárolt, DNS hibajavításban szerepet játszó fehérjék, így azok translációja elsődleges (2. ábra) [9]. Mindez arra utal, hogy az asszembliszómák szerepet játszanak a hatékony és gyors stresszválasz kialakításában, ugyanis a bennük tárolt gének translációjának

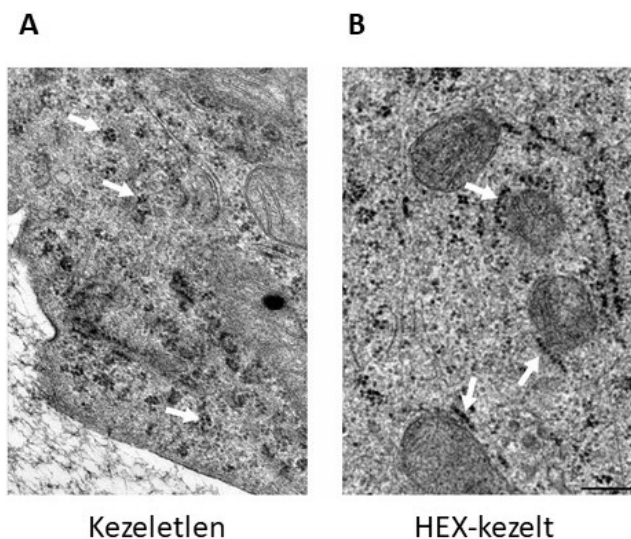
a befejezésére van csupán szükség az újabb transzkripció iniciációt megkerülve, emellett pedig kivédik a komponensek túlzott expressziójának káros hatásait [16], [19], [20].

dSTORM mikroszkópiás kísérleteket végeztünk az Sgs1-RNC-t tartalmazó granulumok szerkezetének feltérképezése céljából [4]. Eredményeink azt mutatják, hogy 8-9 riboszóma-Sgs1 naszcens láncot hordozó komplex szoros kapcsolódásával alakulnak ki az asszembliszómák [4].



3. ábra. Az Sgs1-RNC-k által kialakított granulumok a citoplazmában. Az ábra bal oldalán látható egy reprezentatív dSTORM ábra, mely az N-terminálisán Flag-tag jelölt Sgs1-RNC-k granuláris festődését ábrázolja. Mérőskála: 1 μ m. Az ábra jobb oldalán lévő hő térképen a granulumok színekódolása a területük mérete alapján történt [4].

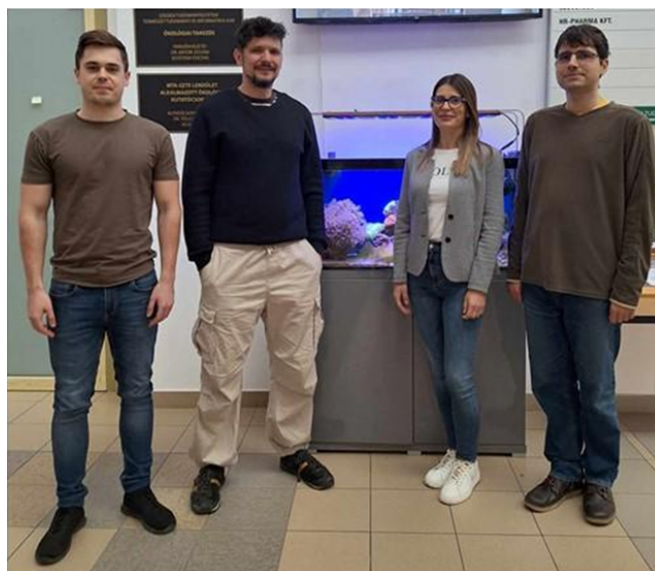
Kísérleteinket kiterjesztettük a magasabbrendű eukariótákra is. MCF7 humán emlő adenokarcinóma sejtek RNS tartalmát vizsgáltuk ultrafugálást követően, szekvenálással [4]. Eredményeink megerősítették a korábbi hipotézisünket, vagyis az asszembliszómákhoz kapcsoltan olyan mRNS-eket azonosítottunk, melyek a stresszválaszban, a DNS hibajavításban, az autofágiában és az összeszerelési folyamatokban kapnak szerepet [4].



4. ábra. 1,6-hexándiol érzékeny riboszóma csoportosulások az A549 sejtek citoplazmájában. A) TEM mikroszkópiával azonosított, gyűrű alakú riboszóma csoportok, fehér nyilakkal jelölve. Mérőskála: 500 nm. B) A sejteket 1 órán át HEX-szel kezeltük, majd a glutáraldehid fixálást követően azonosítottuk a fehér nyilakkal jelölt, lineárisan rendeződött szomszédos riboszómákat [4].

Mivel az asszembliszómákban dúsulnak a rendezetlen N-terminálissal rendelkező fehérjék, illetve az a tény, hogy képesek megbújni a riboszóma minőségellenőrzési folyamatok előtt a translációban vesztglő komponenseik ellenére, felveti a granulumok fázisszeparációval történő

kialakulásának lehetőségét [1], [4]. Ennek igazolásához 1,6-hexándiollal (HEX) végeztünk kísérleteket, melyről ismert, hogy képes megbontani a fázisszeparációhoz szükséges gyenge, hidrofób kölcsönhatásokat az RNS és a fehérje molekulák között [21]. Az alkalmazott alacsony koncentráció megválasztásával és kontroll kísérletekkel igyekeztünk kivédeni a HEX egyéb, fázisszeparációra és életképességre gyakorolt negatív hatását [22], [23]. A hipotézisünk igazolást nyert, ugyanis ismételt UV-kezelés során jelentősen csökkent az asszembliszómákban tárolt *SGS1*, *RAD10* és *RAD14* szintje, emellett pedig az A549 sugárrezisztens adenokarcinóma sejtek citoplazmájában transzmissziós elektron mikroszkópiával azonosított nagyszámú, gyűrű alakú riboszóma csoportok, melyek feltehetően asszembliszómák, száma is jelentős csökkenést mutatott HEX kezelés hatására [4]. Ismételt 1 x Gy irradiációt követően jelentősen csökkent az A549 sejtek túlélése a kontrollhoz képest, ami arra utal, hogy kimerültek az asszembliszómákban tárolt komponensek, ezáltal pedig a sejtek a hatékony stresszválasz kialakítására képtelenek voltak [4].



5. ábra. Csoport kép (balról jobbra haladva): Gombás Bence György, Dr. Villányi Zoltán, Németh-Szatmári Orsolya, Vastag Bence.

Eredményeink arra utalnak, hogy az asszembliszómák fázisszeparációval alakulnak ki, bizonyítottuk az evolúciós konzerváltságukat, illetve a DNS hibajavítási folyamatokban és a stresszválaszban betöltött szerepüket [4], [9]. Távlati célunk közt szerepel az asszembliszómák hozzájárulásának pontosabb felderítése a tumoros sejtek által produkált rezisztenciák kialakulásához, és ebből eredően terápiás célpontként való alkalmazásuk vizsgálata [4], [9], [24].

Irodalomjegyzék

- [1] O. O. Panasenko és mtsai., „Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assemblies”, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, köt. **26**, sz. 2, o. 110–120, febr. 2019, doi: 10.1038/s41594-018-0179-5.
- [2] O. Németh-Szatmári és mtsai., „Phase-separated ribosome-nascent chain complexes in genotoxic stress response”, *RNA N. Y. N*, köt. **29**, sz. 10, o. 1557–1574, okt. 2023, doi: 10.1261/rna.079755.123.
- [3] B. Van Treeck és R. Parker, „Principles of Stress Granules Revealed by Imaging Approaches”, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, köt. **11**, sz. 2, o. a033068, febr. 2019, doi: 10.1101/cshperspect.a033068. [4] T. Nissan és R. Parker, „Analyzing P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Methods Enzymol.*, köt. 448, o. 507–520, 2008, doi: 10.1016/S0076-6879(08)02625-6.

- [5] S. Jain, J. R. Wheeler, R. W. Walters, A. Agrawal, A. Barsic, és R. Parker, „ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure”, *Cell*, köt. **164**, sz. 3, o. 487–498, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2015.12.038.
- [6] A. Hubstenberger és mtsai., „P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons”, *Mol. Cell*, köt. **68**, sz. 1, o. 144–157.e5, okt. 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.003.
- [7] D. Teixeira, U. Sheth, M. A. Valencia-Sanchez, M. Brengues, és R. Parker, „Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs”, *RNA N. Y. N*, köt. **11**, sz. 4, o. 371–382, ápr. 2005, doi: 10.1261/rna.7258505.
- [8] A. Khong, T. Matheny, S. Jain, S. F. Mitchell, J. R. Wheeler, és R. Parker, „The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules”, *Mol. Cell*, köt. **68**, sz. 4, o. 808–820.e5, 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.015.
- [9] B. G. Gombás, O. Németh-Szatmári, B. Nagy-Mikó, és Z. Villányi, „Role of Assemblysomes in Cellular Stress Responses”, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, köt. **16**, sz. 2, o. e70009, márc. 2025, doi: 10.1002/wrna.70009.
- [10] Z. Villanyi és mtsai., „The Not5 Subunit of the Ccr4-Not Complex Connects Transcription and Translation”, *PLoS Genet.*, köt. **10**, sz. 10, o. e1004569, okt. 2014, doi: 10.1371/journal.pgen.1004569.
- [11] I. Gupta és mtsai., „Translational capacity of a cell is determined during transcription elongation via the Ccr4-Not complex”, *Cell Rep.*, köt. **15**, sz. 8, o. 1782–1794, máj. 2016, doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.055.
- [12] Y. Luo, Z. Na, és S. A. Slavoff, „P-Bodies: Composition, Properties, and Functions”, *Biochemistry*, köt. **57**, sz. 17, o. 2424–2431, máj. 2018, doi: 10.1021/acs.biochem.7b01162.
- [13] A. R. Guzikowski, Y. S. Chen, és B. M. Zid, „Stress-Induced mRNP Granules: Form and Function of P-bodies and Stress Granules”, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, köt. **10**, sz. 3, o. e1524, máj. 2019, doi: 10.1002/wrna.1524.
- [14] C. J. Decker és R. Parker, „P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation”, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, köt. **4**, sz. 9, o. a012286, szept. 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a012286.
- [15] „Membraneless organelles in health and disease: exploring the molecular basis, physiological roles and pathological implications | Signal Transduction and Targeted Therapy”. Elérés: 2025. március 5. [Online]. Elérhető: <https://www.nature.com/articles/s41392-024-02013-w>
- [16] S. Gangloff, J. P. McDonald, C. Bendixen, L. Arthur, és R. Rothstein, „The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase”, *Mol. Cell. Biol.*, köt. **14**, sz. 12, o. 8391–8398, 1994, doi: 10.1128/mcb.14.12.8391-8398.1994.
- [17] S. Prakash és L. Prakash, „Nucleotide excision repair in yeast”, *Mutat. Res.*, köt. **451**, sz. 1–2, o. 13–24, jún. 2000, doi: 10.1016/S0027-5107(00)00037-3.
- [18] O. Németh-Szatmári és mtsai., „Phase separated ribosome nascent chain complexes paused in translation are capable to continue expression of proteins playing role in genotoxic stress response upon DNA damage”, 2022. március 16., *bioRxiv*. doi: 10.1101/2022.03.16.484567.
- [19] J.-Y. Hwang, S. Smith, és K. Myung, „The Rad1-Rad10 complex promotes the production of gross chromosomal rearrangements from spontaneous DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Genetics*, köt. **169**, sz. 4, o. 1927–1937, ápr. 2005, doi: 10.1534/genetics.104.039768.
- [20] D. A. Sinclair, K. Mills, és L. Guarente, „Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast sgs1 mutants”, *Science*, köt. **277**, sz. 5330, o. 1313–1316, 1997, doi: 10.1126/science.277.5330.1313.
- [21] R. Düster, I. H. Kaltheuner, M. Schmitz, és M. Geyer, „1,6-Hexanediol, commonly used to dissolve liquid-liquid phase separated condensates, directly impairs kinase and phosphatase activities”, *J. Biol. Chem.*, köt. **296**, o. 100260, 2021, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100260.
- [22] Y. Itoh és mtsai., „1,6-hexanediol rapidly immobilizes and condenses chromatin in living human cells”, *Life Sci. Alliance*, köt. **4**, sz. 4, o. e202001005, ápr. 2021, doi: 10.26508/lsa.202001005.
- [23] Y. Gao, X. Li, P. Li, és Y. Lin, „A brief guideline for studies of phase-separated biomolecular condensates”, *Nat. Chem. Biol.*, köt. **18**, sz. 12, o. 1307–1318, dec. 2022, doi: 10.1038/s41589-022-01204-2.
- [24] B. Nagy-Mikó és mtsai., „Predictive Potential of RNA Polymerase B (II) Subunit 1 (RPB1) Cytoplasmic Aggregation for Neoadjuvant Chemotherapy Failure”, *Int. J. Mol. Sci.*, köt. **24**, sz. 21, o. 15869, 2023, doi: 10.3390/ijms242115869.