

NÉMETH-SZATMÁRI ORSOLYA, NAGY-MIKÓ BENCE, GOMBÁS
BENCE GYÖRGY, MOLNÁR ÁRPÁD, KOLBERT ZSUZSANNA,
VÖRÖS ANDRÁS, VILLÁNYI ZOLTÁN:

A Transzlációs szabályozás Kutatócsoport munkája a Szegedi Tudományegyetemen

Összefoglalás

A Transzlációs szabályozás Kutatócsoport két éve alakult a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszéken Dr. Villányi Zoltán egyetemi adjunktus vezetésével. Kutatásaink célkeresztjében egy újonnan felfedezett sejtalkotó, az asszembliszóma áll. Az asszembliszómák riboszómákat tartalmaznak, belőlük kilógó félkész fehérjékkel. Mivel ezek a fehérjék még nem nyerték el végső alakjukat, ezért funkciójukat sem, születőben lévő fehérjéknek, szaknyelven naszcens fehérjéknek hívjuk őket. Az asszembliszómák legfőbb funkciója, hogy a bennük lévő géntermékeket védjék a sejtek riboszóma-minőségellenőrzési rendszere elől, mely a transzlációban elakadt riboszómák felszabadításáért felel. Az asszembliszómák jelentőségéről eddigi ismereteink, a proteaszóma, azaz a sejtek fehérjebontásért felelős komplexének két alegysége, az Rpt1 és Rpt2 (Regulatory particle triple A 1 és 2) fehérjeinek egymás közelében megvalósuló fehérjeszintézisére korlátozódtak. Az asszembliszómák a nevüket erről a folyamatról kapták, hogy bennük a proteaszóma szoban forgó két szomszédos fehérjeje képződésük közben szerelődik össze. A tanszékünkön elért eredmények igazolták, hogy az asszembliszómák jelentősége ezen a proteaszóma összeszerelési lépésen jócskán túlmutat. Olyan géntermékekre bukkantunk bennük, amik, ha kifejeződnek stresszhatás nélkül, károsak, mert akkor is a DNS javításába kezdenek, ha arra nincs szükség. Ugyanakkor félkész állapotban, az asszembliszómákban tárolva probléma nélkül képesek gyorsan reagálni, és javítani a DNS károsító hatások által okozott hibákat, hiszen, hogy funkciójukat elnyerve bevetésre kerülhessenek, csak megkezdett képződésüket kell befejezni a riboszómákon. Ez azért fontos, mert a DNS károsodás akár a hibajavításban szerepet játszó géneket is érintheti, ráadásul stresszhelyzetben a gének átírása és a fehérjeszintézis kezdeti lépései egyaránt általános gátlás alá kerülhetnek. Ez az írás kutatócsoportunk eddigi eredményeit és kutatási stratégiáit foglalja össze.

Kulcsszavak: Asszembliszóma, fázisszeparáció, DNS-hibajavítás, Sgs1, Rpb1, fehérje aggregáció

Bevezetés

Számunkra a kutatás nem versengésen, hanem együttműködésen alapul, amit az élővilágban lejátszódó molekuláris folyamatok megismerése, és ebből kiindulva elsősorban a gyógyászati és mezőgazdasági gyakorlatban is alkalmazható új eljárások, termékek létrejöttében való közreműködés motivál. Fejeztünk is egy csapatmunka eredményeként jött létre. Az egyes részeket a kutatási irányokban dolgozó munkatársaink írták. Először bemutatjuk a pékélesztő-moddellel elért eredményeinket, amik igazolták, hogy az asszembliszómákban a DNS-t károsító hatások kivédésében szerepet játszó géntermékek várják, hogy stressz hatására befejeződhessen a translációjuk. Ezt követően egy, a Patológiai Intézetben Dr. Vörös András egyetemi adjunktussal folytatott, emlőtumorkemorezisztenciájának megértését célzó együttműködés eredményeit foglaljuk össze. A muslica-modellrendszer használatának előnyeire is felhívjuk a figyelmet, bepillantást nyújtva a DNS károsító hatások és az asszembliszómák kapcsolatának felderítését célzó kutatásainkba. Végezetül pedig bemutatjuk legfrissebb együttműködésünket, amit a Növénybiológiai Tanszéken Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsanna csoportjával indítottunk útjára, hogy kiderítsük a növényi sejtek stresszválaszában van-e jelentősége az asszembliszómáknak.

Az asszembliszómák fehérjeszintézisben veszteglő riboszómákból álló sejtalkotók

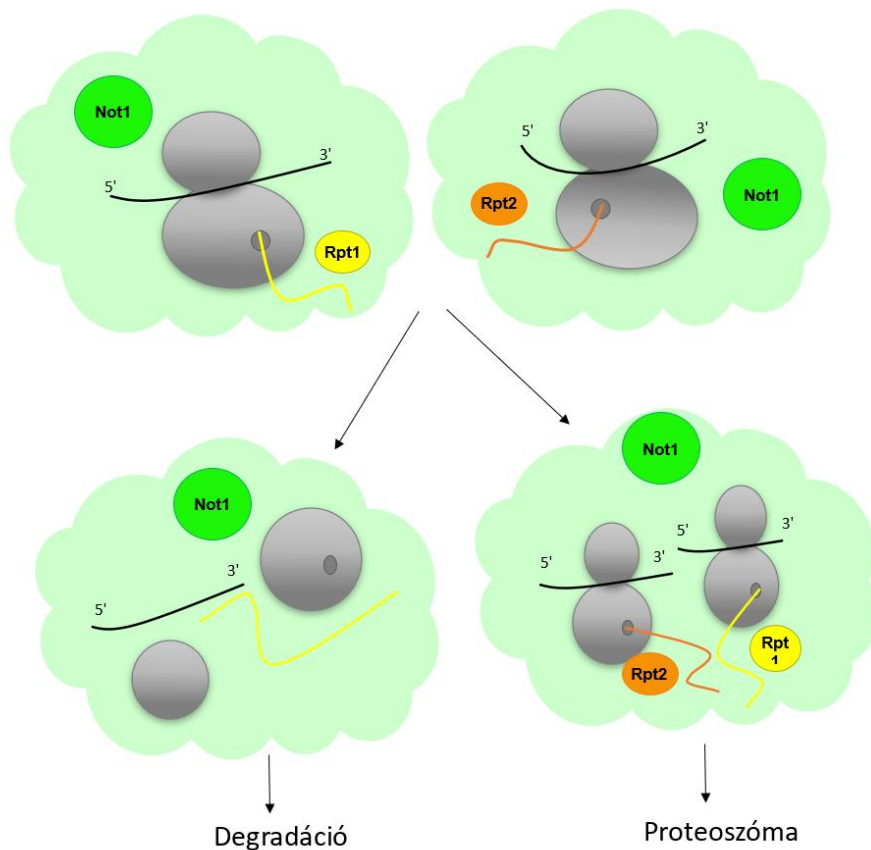
A gének az öröklődés egységei, a DNS-nek olyan jól meghatározott szakaszai, amelyek valamilyen fehérjeféleség képződését kódolják. A sejttaggal rendelkező eukarióta élőlények a génkifejeződést bizonyos gének DNS-ről hírvívő RNS-re (mRNS) történő átírásával, vagyis a transzkripcióval indítják, melynek helyszíne a sejttag, majd a folyamat a citoplazmában ér véget az mRNS-ek alapján a riboszómákon történő fehérjeszintézissel (transzláció), és végül az érett fehérjék komplexekké rendeződésével. A fehérje-komplexek több fehérje

alegységből álló struktúrák, melyek a sejteket alkotó összes fehérje, a proteom kulcsfontosságú szerveződési egységei. Az eukarióta sejtek citoplazmája egy gélszerű, túlszűfolt közeg, mely különféle makromolekulákból, sejtservecskékből, sejtvasz-hálózatokból és sejt plazmából áll (Shamipour és mtsai. 2021). Könnyen belátható, hogy a sejtek számára nagy kihívást jelent, hogy a fehérjék feltekeredése és a komplexek összeszerelése hibamentesen menjen végbe ebben a tömött térben, ugyanis a fehérjék gyakran érintkeznek más makromolekulákkal, ezért versengés alakul ki a kötőpartnerekért (Schwarz és Beck, 2019). A sejteknek hatékony stratégiát kellett kidolgozniuk a hibamentes összeszerelődés biztosítására, ugyanis a hibás kölcsönhatások a fehérjék kicsapódásához, és fehérjebomláshoz vezetnek. Ilyen hatékony módszer a fehérjeszintézissel egyidőben történő összeépülés, szaknyelven: a kotranszlációs összeszerelődés is, mely során a translációval egyidőben történik egy komplex két fehérjealegységének összeépülése (Duncan és Mata, 2011). A kotranszlációs összeszerelődés lehetővé teszi a fehérjék közötti szoros kölcsönhatást, illetve a komplexek alegységeinek azonos mennyiségben történő (sztöchiometrikus) előállítását is (Györkei és mtsai. 2019).

A proteaszóma egy konzervdobozra emlékeztető sok fehérjéből álló komplex, aminek a belsejében található egy fehérjét bontó egység. Mivel ez az egység minden fehérjét lebont, ami az útjába kerül, ezért a proteaszóma belsejében helyezkedik el, ezáltal valósítva meg a fehérjék szabályozott lebontását, vagyis csak azokkal a fehérjékkel kerül kapcsolatba, melyek a sejt számára már nemkívánatosak. Az elmúlt években került napvilágra, hogy a proteaszóma Rpt1 és Rpt2 szabályozó alegység fehérjék (*Regulatory particle triple-A 1 és 2*) is kotranszlációval szerelődnek össze (1. ábra) (Panasencko és mtsai. 2019). Amennyiben ezeket a szomszédos fehérjét külön termeltetjük, akkor nem oldhatók, illetve a külön termeltetett fehérjék interakciójának igazolására szolgáló kísérletben sem mutattak kölcsönhatást (Fu és mtsai. 2001; Barrault

és mtsai. 2012). Mindez arra utal, hogy ezek a fehérjék hatékonyan kizárólag képződésük közben szerelődnek össze, ellenkező esetben a fehérjék olyan alternatív konformációt vehetnek fel, mely gátolja a kölcsönhatásukat, valamint a proteaszómába való beépülésüket. Az Rpt1 és Rpt2 fehérjék esetében az összeszerelődés helyszínéül olyan granulomok szolgálnak, melyek tartalmazzák a Ccr4-Not (*C*arbon *c*atabolite *r*epressor *4* – *N*egative *o*n *T*A**T**A-*l*ess) komplex legnagyobb alegységét, a Not1-et is (Panasenکو és mtsai. 2019). Ezeket a granulomokat Not1 tartalmú asszembliszómáknak nevezték el (NCA), mivel különböznek a többi, már ismert citoplazmatikus granulumtól, mint a P-testek vagy a stressz granulomok.

A Ccr4-Not komplex egy több alegységből álló komplex, amely minden eukariótában jelen van, és a génexpresszió minden lépésének finomszabályozásában részt vesz, a sejtmagban lejátszódó hírvivő RNS-ek (mRNS-ek) termelésétől, azok riboszómákon történő kifejeződésén át, a citoplazmában történő lebontásukig (Collart, 2016). Az asszembliszómákban azonosították a komplex legnagyobb alegységét, a Not1-et, melynek pontos funkciója nem ismert, ám az bizonyos, hogy nélkülözhetetlen az asszembliszómák kialakításához (Panasenکو és mtsai. 2019) és a DNS templátról az mRNS-ek átírását végző RNS polimeráz II legnagyobb alegységének (Villanyi és mtsai. 2014), valamint a SAGA sejtmagban működő génkifejeződést szabályozó komplex alegységeinek a kotranszlációs összeszerelődéséhez is (Kassem és mtsai. 2017).



1. ábra: Sematikus modell az Rpt1 és Rpt2 tartalmú asszembliázómák kotranszlációs összeszerelődéséről (Panasenko és mtsai. 2019): Fehérjekárosító stresszhatásra (hő, nehézfém) a proteasómát felépítő mRNS-ek indukálódnak és a transzlációjuk megkezdődik. Felső panel: az *RPT1* és *RPT2* mRNS-ek esetében, a transzláció megakadását követően a naszcensfehérje-riboszóma-komplexek Not1-tartalmú asszembliázómákká rendeződnek. A naszcens fehérjék rendezetlen, riboszómából kilógó részei, a granulumok felszínén várják az interakciós partner megjelenését, majd kotranszlációsán összekapcsolódnak és a transzláció folytatódik, végső soron pedig beépülnek a proteasómába, és ellátják funkciójukat (alsó, jobb oldali buborék). Amennyiben nem történik meg az interakció a naszcens Rpt1 és Rpt2 között, képződésük egymástól elszeparálva valósul meg (alsó, bal oldali buborék), mely hibás fehérjék előállításához, és végső soron ezek lebomlásához vezet.

A sejtek kifinomult gépezetet fejlesztettek ki annak biztosítására, hogy a fehérjék a megfelelő sorrendben menjenek keresztül a különböző érési lépéseken. A riboszómák megtorpanása azonban megszakítja ezt a folyamatot, és aberráns naszcens fehérje termékek előállításához vezethet, melyek toxikusak a sejt számára. A riboszóma minőségellenőrzési mechanizmusa (RQC) koordinálja ezeknek az aberráns termékeknek a lebomlását: a translációban veszteglő mRNS-t lebontja, a riboszómákat pedig újrahasznosítja (Collart és Weiss, 2020). Ezért meglepő, hogy az asszemblizómák képesek megbújni az RQC minőségellenőrzési folyamatai elől, noha a translációban veszteglő riboszómákat tartalmaznak. E jelenség hátterében feltehetően a fehérjék fázisszeparációja áll.

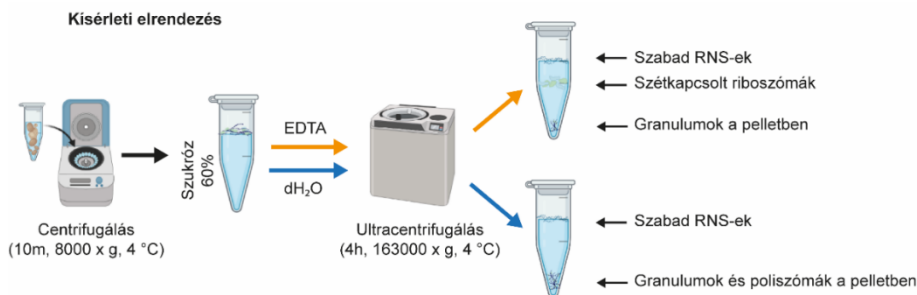
A sejtek zsúfolt molekuláris színterek, ahol különböző, olykor egymással ellentétben álló folyamatok zajlanak, így ezeket időben és térben el kell különíteni (Owen és Shewmaker, 2019). A sejtben belül szerveződött sejtszervecskék egy része lipid membránnal határolt, ám léteznek membrán nélküli organelumok (MLO-k) is, amelyek folyadék-folyadék fázisszeparációval (LLPS) jönnek létre (Alberti, 2017). Az LLPS egy olyan biológiailag szabályozott folyamat, mely során specifikus makromolekulák (fehérjék, nukleinsavak) membrán nélküli sejtszervecskébe rendeződnek, elhatárolódva az őket körülvevő környezettől. Ezek a struktúrák folyadék cseppként viselkednek, képesek összeolvadni, deformálódni és átrendeződni, hasonlóképpen a húsleves tetején úszkáló zsírcseppekhez, azzal a fontos különbséggel, hogy ez esetben nem zsírok, hanem RNS-ek és fehérjék, vagy csak fehérjék különülnek el a sejtplazma többi részétől. Az MLO-k összetevői nagyobb affinitást mutatnak egymáshoz, mint a környezet molekuláihoz, ezáltal a kialakuló két fázis között a fázisszeparált molekulák eltérő koncentrációban lesznek jelen (Owen és Shewmaker, 2019). Az LLPS vizsgálatához 1,6-hexándiolt használnak, mely egy alifás alkohol és képes a fázisszeparáció megbontására, ugyanis gátolja a

fehérje-fehérje és fehérje-RNS molekulák közötti gyenge kölcsönhatásokat (Kroschwald és mtsai. 2017).

Kutatócsoportunk célja az Rpt1 és Rpt2 tartalmú asszembliszómákhoz hasonló struktúrák azonosítása és azok jellemzése (2. ábra). Pilóta kísérleteinket *Saccharomyces cerevisiae*-n, pékélesztőn végeztük, mely egy egysejtű eukarióta. Ez egy rendkívül közkedvelt modellorganizmus a molekuláris biológiában, mivel egyszerű életciklussal rendelkezik, könnyen tenyészthető, a géneinek felépítése és szabályozása jól feltérképezett. Vizsgálataink első fázisában arra a kérdésre kerestük a választ, hogy melyek lehetnek azok a géntermékek, melyek az Rpt1 és Rpt2 fehérjék képződésénél megismert transzlációs szabályozás alatt állnak, egészen pontosan asszembliszómákban tárolódnak. Ennek vizsgálatához bioinformatikai elemzéseket végeztünk, mely során megvizsgáltuk és rangsoroltuk az összes ismert élesztő fehérjekomplex alegységeit azon kritériumok alapján, melyekről tudjuk, hogy meglétük nélkülözhetetlen az asszembliszómák létrejöttéhez. Először is rangsoroltuk a fehérjéket különböző algoritmusok segítségével a riboszómákból először kibukkanó végük (amino-, vagy N-terminálisuk) rendezetlensége alapján, mivel ezek megléte szükséges ahhoz, hogy az általunk vizsgált membrán nélküli citoplazmatikus granulumok kialakuljanak (Panasenko és mtsai. 2019). A legjobb találatok közül kizártuk azokat, amelyek N-terminálisának első 25 aminosava nem tartalmaz lizint. Ennek oka, hogy amint a szakirodalomból ismert, az asszembliszómák stabilitásához nélkülözhetetlen az N-terminálison végbemenő poszttranszlációs módosítás, a monoubiquitináció, amely lizin aminosavakon valósul meg (Panasenko és mtsai. 2019). Az ubiquitin egy, a fehérjék funkciójára hatással lévő jelmolekula. Harmadik szűrőként pedig a rendezetlen N-terminálisú fehérjéket kódoló mRNS-en kerestünk olyan szakaszokat, amelyekről ismert, hogy a transzláció megakadásához vezetnek, ami az asszembliszómák kialakulásához szükséges

(Ghoneim és mtsai. 2018). Meglepődve tapasztaltuk, hogy a legjobb találataink között olyan fehérjék dúsultak fel, melyek a környezeti stresszválaszban játszanak szerepet. Ezen találatok közül választottunk ki néhány jelöltet további vizsgálatokhoz. Legrészletesebben az Sgs1-et (*Slow growth suppressor 1*) vizsgáltuk, amely egy DNS helikáz ami egy háromtagú komplex részeként szerepet játszik a DNS általában külső hatásra (pl. radioaktív sugárzás) létrejött kettős szálú törésének javításában (Gravel és mtsai. 2008; Mimitou és Symington, 2008).

Kiderült, hogy UV fényvel besugározva a sejteket, az EDTA jelenlétében cukoroszlopon keresztül pelletálódó asszembliszómák *SGSI* mRNS tartalma jelentősen lecsökken és ezzel párhuzamosan a poliszómákon megnő. Azaz az asszembliszómákban várakozó *SGSI* mRNS UV fény hatására folytatja a translációját. Annak tisztázása, hogy ezt az átmenetet közvetlenül az UV fény vagy a DNS hibák jelenléte vonja-e magával, további kutatásokat igényel. Azonban a sejtek stresszválaszának megértésében mindenképpen áttörést jelentő felfedezés, hogy egy képződésében gátolt, de arra előkészített, DNS hibajavításban szerepet játszó fehérje befejezi a translációját UV sugárzás hatására. Élesztővel folytatott kísérleteink fontos eredménye, hogy a folyadék-folyadék fázisátmenetet gátló 1,6-hexándiol kezelésre az *SGSI* mRNS mennyisége lecsökken az asszembliszómákban, ami arra utal, hogy az asszembliszómák folyadék-folyadék fázisszeparációval jönnek létre. Ez az ismeret későbbi kísérleti stratégiáink megtervezésében rendkívül fontos fegyverténynek bizonyult.



2. ábra: Folyamatábra a riboszómák és az asszembliázómák tisztítási módszeréről. Az asszembliázómák tisztítása a riboszómák két alegységét szétkapcsoló Etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) jelenlétében végzett 60%-os cukoroszlapon történő ultracentrifugálással történik. Az élesztő sejteket exponenciális fázisig növesztjük, majd a sejtlyázátumot centrifugáljuk. Az asztali centrifugálás során (10 perc, 8.000 x g, 4°C, ahol a g nehézségi gyorsulás) megszabadulunk a sejttermelékektől, a fehérje aggregátumoktól és ülepítjük a stressz granulumokat és a P-testeket. A felülúszót a 60%-os cukoroszlóp tetejére rétegezzük, majd EDTA jelenlétében vagy anélkül ultracentrifugáljuk őket (4 óra, 163.000 x g, 4°C). Az EDTA megfelelő koncentrációban alkalmazva szétkapcsolja a riboszóma kis és nagy alegységét, ennek eredményeképp az ülepítést követően a pelletben, vagyis a nehéz frakcióban megjelenő RNS nem lehet más, mint EDTA-rezisztens granulumban tárolt mRNS, mivel csak azok képesek átjutni a sűrű cukoroszlapon, míg a szétkapcsolt riboszómák a cukoroszlópban maradnak, a riboszómákból kiszabadult mRNS-ek pedig a felülúszóban. Ezzel szemben, ha a kísérletet EDTA jelenléte nélkül végezzük el, a pelletben nemcsak a granulumokban tárolt mRNS-ek lesznek jelen, hanem az mRNS-ek által összekötött riboszóma füzérekhez (szaknyelven: poliszómákhoz) kapcsolódtak is, mivel a riboszómákat nem kapcsoljuk szét, így a poliszómák – mivel sűrűségük elég nagy hozzá - képesek lesznek átjutni a cukoroszlopon. A centrifugálást követően a különböző frakciókból RNS-t tisztítunk és fehérjét izolálunk, és különböző módszerekkel vizsgáljuk a frakciókat (pl: az mRNS-ek jelenlétét és mennyiségük meghatározását szolgáló RT-qPCR módszerrel, vagy a fehérjék kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas Western blotlall).

Asszembliszómák lehetséges szerepe a kemorezisztenciában

A korábban leírtak alapján egyértelműen következtethetünk arra, hogy az asszembliszómáknak jelentős szerep jut a sejtet érő stresszek, különösen a DNS károsító hatások elleni védekezésben. A daganatok kezelésére széleskörben alkalmazott kemoterápiás szerek számos esetben célozzák a DNS-t, tehát genotoxikus stressznek tekinthetők, a sugárterápiához hasonlóan. Az ilyen terápiás megközelítések esetében számos esetben jelenik meg a daganat terápiával szembeni rezisztenciája. A kemorezisztenciák hátterében állhat a sejt megnövekedett stressztűrő képessége, ennek oka lehet az, hogy a tumorsejt asszembliszómákat halmoz fel, segítségükkel fenntartja a génkifejeződést akkor is, ha a gének átírása a sejtmagban gátolt, sőt feltételezzük, hogy olyan fehérjék képződése fejeződik be segítségükkel, amik segíthetik a mérgeanyagok semlegesítését. Ez azért is lehetséges mert a tumorsejtek sok esetben éppen azoknak a sejteknek a leszármazottai, amik olyan proteotoxikus vagy genotoxikus stresszhatásoknak voltak kitéve, mint például a dohányfüstben lévő káros anyagok. Nem ismeretlen tehát számukra a DNS-t vagy a fehérjéket érő stresszhatás. Ezt támasztják alá a kutatócsoportunk által végzett kísérletek, melyekben röntgensugárzásnak tettünk ki tüdőtumor eredetű A549 sejteket. Ebben a kísérletben kimutattuk, hogy a fázisszeparációt gátló, asszembliszómákat feloldó 1,6-hexándiol kezelés csökkenti a sejtek túlélését ismételt besugárzás esetén.

Asszembliszómák vizsgálata humán sejtvonalakon

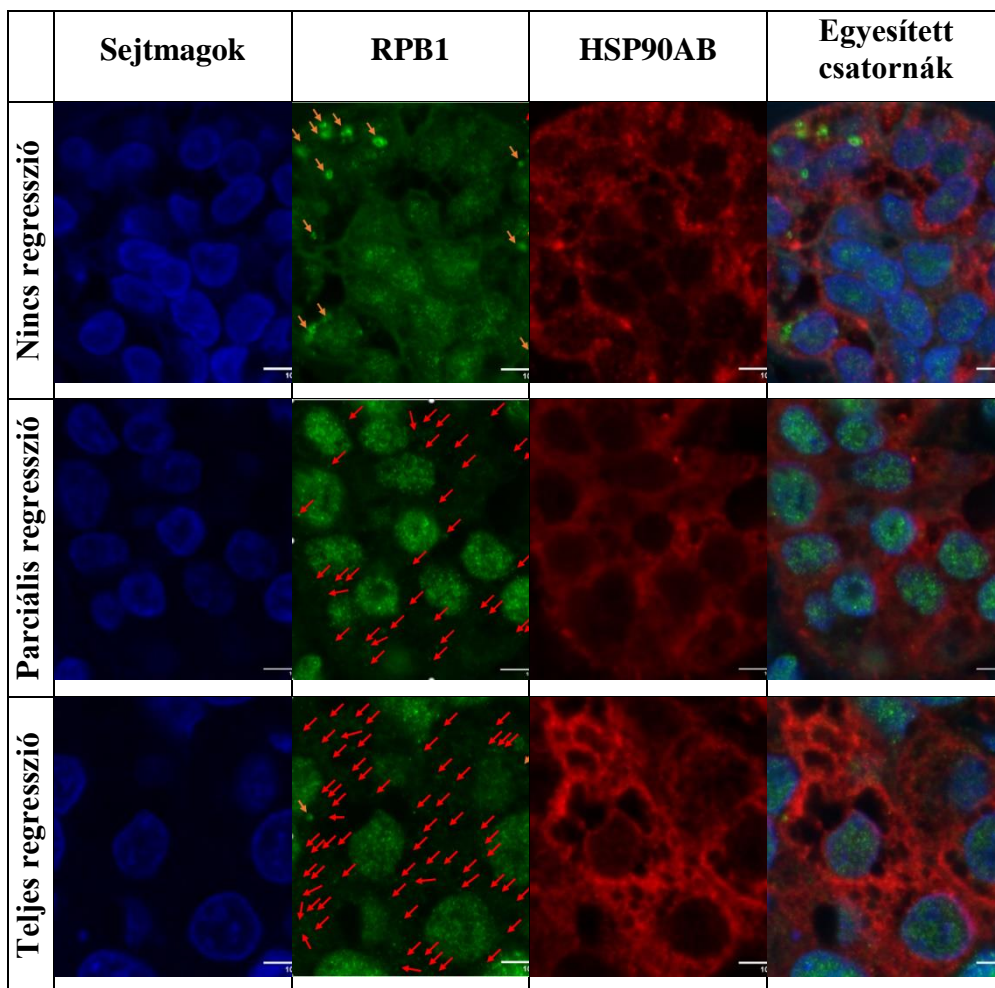
Kutatócsoportunk A549, Du145, Colo320, HeLa, és MCF7 humán sejtvonalakon végzett kísérleteket. Ezek során kimutattuk, hogy a humán sejtek tartalmaznak olyan ultracentrifugálással ülepíthető riboszóma tartalmú struktúrákat, amik ellenállnak az EDTA riboszómákat szétkapcsoló hatásának, és megtalál-

hatók bennük aggregációra hajlamos fehérjék mRNS-ei is. Az így készített pelletek és a sejtekben aggregálódott fehérjék tömeg-spektrometriai analízise során 139 olyan fehérjekomplex alkotóit azonosítottuk, melyeket még nem vizsgáltak fázisszeperáció szempontjából. Ezen komplexek közt nagyszámban voltak jelen olyanok, melyek egyes tagjainak mennyisége lecsökkent a mintákban, ha a fázisszeperációt gátló 1,6-hexándiollal kezeltük a sejteket. Továbbá a komplexeket alkotó fehérjék mRNS-ei is érzékenyek voltak az 1,6-hexándiol kezelésre. Ezen felül sugárterápiának ellenálló A549 sejtekben transzmissziós elektron mikroszkópiával megfigyeltünk olyan köralakú, riboszómákat tartalmazó struktúrákat, melyek mérete megfelel az asszembliszómák feltételezett és korábbi kísérletek alapján számított 100 nm körüli méretének. Átlagosan 8-9 riboszómát tartalmaznak. Ezek a riboszóma gyűrűk szintén 1,6-hexándiol érzékenyek. Mivel az asszembliszómák elsődleges szerepét a stresszválaszban sejtjük, a sejteket Röntgensugárzásnak tettük ki 1,6-hexándiol jelenlétében vagy pedig anélkül. Ezen kísérlet eredményei alapján az egyszeri besugárzás esetén nincs különbség az 1,6-hexándiol kezelt és kontrol sejtek életképessége között, kétszeri besugárzás esetén azonban a hexándiol csökkenti a sejtek túlélését a kontrolhoz képest. Ez a jelenség feltételezhetően annak tudható be, hogy az első sugárdózis után kialakuló asszembliszómákat feloldjuk az 1,6-hexándiol kezeléssel és így a sejtek védtelenebbek lesznek a második sugárdózissal szemben. A kísérlet egyben felveti egy stresszhatásra kialakuló molekuláris memória létezését, ami az asszembliszómákon keresztül valósulhat meg.

Az Rpb1 aggregáció diagnosztikai szerepe

A daganatos megbetegedések egyik legelterjedtebb kezelési módszere a kemo-terápia, melynek egyik változata az úgynevezett neoadjuváns terápia. Neoadjuváns kezelést lokálisan előrehaladott tumorok esetén alkalmaznak. Célja a könnyebb operálhatóság, de előfordul a tumor teljes regressziója is. A terápiára

adott válasz alapján 3 csoportba sorolhatjuk a betegeket: teljes regresszió esetén a daganat eltűnik, részleges vagy más szóval parciális regresszió esetén a daganat mérete lecsökken, így könnyebben operálhatóvá válik, egyes betegek nem mutatnak semmilyen választ a kezelésre, ebben az esetben nem beszélhetünk regresszióról. Malignus emlődaganat mintákon végeztünk immunfestést. A minták a neoadjuváns kezelés előtt vett biopsziák voltak. Az RPB1 fehérje aggregációját követtük nyomon. Az RPB1 az eukarióta RNS polimeráz II legnagyobb alegysége. Ennek a komplexnek a feladata az mRNS-ek szintézise. Az Rpb1 fehérje éréséhez a Ccr4-Not komplex toborozza a dajkafehérjéket (Villanyi és mtsai. 2014), amennyiben a fehérjék helyes konformációját és összeszerelődését biztosító dajkafehérje hálózat elemeiből hiány áll fenn, szintén hibás, oldhatatlan, könnyen kicsapódó fehérjék képződhetnek (Juszkiewicz és Hegde, 2018). Ezen tulajdonságai alapján választottuk ki az RPB1-et, mint a sejtek dajkafehérje kapacitásának vizsgálatára alkalmas indikátor fehérjét. Vizsgálataink során azt figyeltük meg, hogy azon betegek mintáiban, akik nem mutattak megfelelő választ a kezelésre, a többi betegcsoporthoz képest jelentősen gyakrabban láttunk nagyméretű citoplazmatikus RPB1 aggregátumokat.



3. ábra: Rpb1 aggregáció típusai kemoterápiára különbözőképpen reagáló emlőtumorokban. Az ábrán a kemoterápiára adott háromféle válasz alapján besorolt páciensekből származó 1-1 kezelés előtti minta látható. Kékkel a sejtmagok, zölddel a RPB1 fehérje, pirossal a HSP90 dajkafehérje került ábrázolásra. A piros nyilak kisebb, a sárga nyilak nagyobb méretű citoplazmatikus RPB1 aggregátumokat jelölnek. A fehér mércék 10 μ m-esek.

A nagyobb Rpb1 aggregátumok jelenléte a kemoterápiára rosszul reagáló tumorok esetében arra utal, hogy ezekben a tumorsejtekben a fehérjeszintézis pontossága feltehetően leromlott és a dajkafehérje rendszer nem látja el megfelelően a feladatát (3. ábra). Ennek következtében hibás fehérjék képződnek,

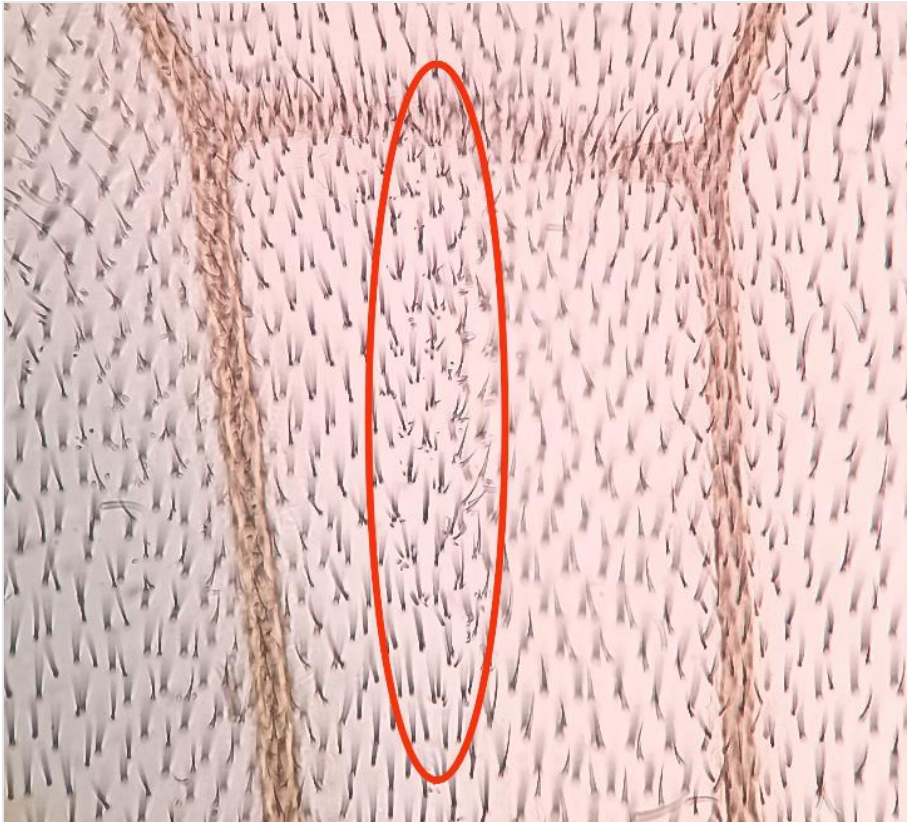
melyek közt olyan fehérjék is lehetnek, amiknek szerepük lenne a programozott sejthalál kiváltásában, így pedig a tumor regressziójában. Az aggregálódott RPBI arra utalhat, hogy a regressziót nem mutató betegek esetében a tumor kisebb mértékben támaszkodik a transzkripcióra és a túléléséhez szükséges fehérjék szintéziséhez, és a génkifejeződésüket későbbi lépések - mint amilyen például a transláció - megváltozott szabályozásával kompenzálják. Ezeknél a betegeknél érthető módon az alkalmazott kemoterápiás szerek, mint például a doxorubicin vagy az epirubicin a DNS-be épülve gátolja ugyan a DNS másolását (replikációt) és az mRNS szintézist, de ez nem jelentős hatás esetükben, mert vélhetően eleve fel vannak készülve a transzkripció hiányára az osztódásukra, és növekedésükre korlátozó génműködésük fenntartásához. Leánysejtjeikben a kemoterápiás szerek toxikus dózisa pedig jelentősen lecsökkenhet. Egy ilyen jelenség korábbi ismereteink alapján nagy valószínűséggel köthető az asszembliszómákhoz.

SMART (Somatic Mutation And Recombination Test)

A következőkben bemutatott, ecetmuslicán (*Drosophila melanogaster*) elvégzett tanulmány elméleti alapjait Szabad János Genetikai Mozaikok C. könyvének e módszerre vonatkozó leírása (Szabad, 2019), valamint Graf és munkatársai (Graf és mtsai. 1984), illetve Würgler és munkatársai (Würgler és mtsai. 1985) által írt tanulmányok adták. Tudva, hogy a mitotikus rekombináció a kettős-szálú DNS-törések indikátora, a muslica kiváló marker mutációi, valamint a szárnykezdemények fejlődésének ismerete lehetővé tette az ún. SMART eljárás kidolgozását. A SMART módszerrel nem csak valamely fizikai, kémiai, biológiai tényező DNS-törő hatását lehet kimutatni, hanem meg lehet mérni annak erősségét is. A módszer elvi alapja a következő. Az *mwh* (*multiple wing hairs*) recesszív mutáció homozigóta formában olyan szárnysejteket hoz létre, amikből a vad típusú, egy hosszú szárnyszőr helyett három

kisebb szőrszál jön létre. Az *flr* (*flair*) mutáció pedig egy megégett szőrszállra emlékeztető képletet hoz létre a szőrszál helyén homozigóta formában. Hogy egyszerűen megállapítsuk egy mutagén hatás indukál-e mitotikus rekombinációt, azaz okoz-e kromozómatörést, a következőket kell tennünk: Először is készítsünk *mwh/flr* transzheterozigóta lárvákat. Ezek a lárvák ugyan hordozzák a mutációkat, mégis vad fenotípusúak, mivel az egyik szülőtől örökölt, ép gének funkciói „pótolják” a mutációk által elvesztett funkciókat. Mivel az *flr* és az *mwh* mutációk ugyanazon a kromozómán lévő különböző génekben vannak (ugyanakkor az egyik az apai, a másik az anyai oldalról jön, tehát a lárvák transzheterozigóták), a DNS-hibajavítása miatt rekombinációval homozigóta állapotba kerülhetnek, és ezzel olyan utódsejtek is létrejöhetnek, ahol vagy az egyik, vagy a másik tulajdonság nyilvánul meg. Ezért, ha kiteszük őket a vizsgált hatásnak, hogy aztán a kikelő muslicák szárnyaiból tehát preparátumot készítsünk, rajtuk a vad típusú háttéren mozaikfoltokat fogunk találni, amennyiben a vizsgált hatás rekombináción alapuló DNS hibajavítást idéz elő. A mikroszkóp alatt a sok vad típusú, egy szőrszálat tartalmazó szárnysejttől szinte szempillantásra elkülöníthetők a három (*mwh*), vagy a megégett (*flr*) szőrszálakra emlékeztető képleteket tartalmazó mozaikfoltok, ikerfoltok (4. ábra). (Stern, 1936; Lindsley és Zimm, 1992; Hoffmann, 1994).

Az ismertetett eljárás akkor működik megfelelően, ha viszonylag sok sejt ér az általunk választott hatás. Olyan lárvák kezelésére van tehát szükség, amelyekben a szárny-imágókorongok már több ezer sejtből állnak, de a sejtek még osztódnak. Ennek tudatában a kezelésre a pete lerakása utáni 96. óra körüli időpont a legmegfelelőbb. A kikelő muslicák szárnyaiból preparátumot kell készíteni, így vizsgálhatóvá válik, hogy az adott hatás okozott-e módosulást a DNS-ben. (Graf és mtsai. 1984).



4. ábra: Az ikerfolt a transzheterozigóta *mwh/+; flr/+* ecetmuslica szárnyán (kromozómatörés homológ rekombinációval történt javítására utal). A fehér mérce 20 μm -t jelöl. Amennyiben a mozaik foltok gyakorisága meghaladja a kontroll értékét, megállapítható, hogy a vizsgált hatás DNS-törést okoz. Az események gyakoriságát, a mutagén hatás erősségét az $f=(n*m)/(N*C)$ összefüggéssel mérhetjük, amelyben n a mozaik foltok, N a vizsgált szárnyak száma, m a mozaikfoltok átlagos mérete, C pedig az egy szárnyat alkotó sejtek száma (kb. 30000). A SMART módszer egyszerű, olcsó és érzékeny. Rutinszerűen alkalmazzák környezeti hatások kromozómatörő képességének vizsgálatára. A foltméret (m) kiszámításához csak az *mwh*, és az ikerfoltok *mwh* részét vetjük figyelembe. Azért, mert az *flr* foltok csak nagy kiterjedésű mozaikfoltokon felismerhetőek, a kisebbeken az *flr* mutáció az érintett géntermék hosszú élettartalma miatt nem mutatkozik meg.

Gének, muslicák és keresztezések (törzsek)

Csoportunk az 1,6-hexándiol mutagén hatását vizsgálja (Röntgen-sugárzással kiegészítve, illetve nélküle). A keresztezésünkből kikelő lárvákat kilencvenhat

órák állapotban tettük ki az alább részletezett kezeléseknél. Négy csoportot hoztunk létre: kontroll csoport, 1000 rad Röntgen-sugárzásnak kitett csoport, 1,6-hexándiollal (25 V/V%) kezelt csoport, illetve mindkét kezeléssel átesett csoport. Mindegyik keresztezés kétféle utódot hoz létre, azaz a marker-heterozigóta (*mwh flr+* / *mwh+ flr*) és a balanszer-heterozigóta (*mwh flr+* / *mwh+ TM3,Ser*) muslicákat. A domináns *Ser* (serrate) marker lehetővé teszi a két genotípus szárnyainak megkülönböztetését, a *TM3* a „balanszer-kromoszómára” utal, amely több inverziót tartalmaz, megakadályozva ezzel a rekombinációs eseményeket. A szárnyakat mikroszkóp tárgylemezeken rögzítettük és 400-szoros nagyítással megvizsgáltuk. Feljegyeztük az egyesfoltok és az ikerfoltok gyakoriságát és méretét. Az egyes-foltok (többnyire *mwh*, ritkán *flr*) különböző típusú mutációkból (deléciók, pontmutációk, specifikus kromoszóma-rendellenességek stb.) vagy rekombinációból származhatnak abban az esetben, ha a két markergén között mitotikus átkereszteződés zajlik le. Ikerfoltok (egy *mwh*-s és egy *flr*-es területből) mitotikus rekombinációval állnak elő, a *flr* marker és a 3. kromoszóma centromerje között. (Stern, 1936; Lindsley és Zimm, 1992; Spanó és mtsai. 2001).

A muslicákat 25°C-on, 30 ml-es fiolákban (10 ml standard muslica táptalajjal) tároltuk, kétnaponta átráztuk őket új fiolába az esetleges fertőzések elkerülése érdekében. A kontroll csoport és az 1,6-hexándiollal kezelt csoport vizsgálatával és összehasonlításával következtetni tudunk az 1,6-hexándiol mutagén hatásának meglétére (vagy hiányára), illetve annak erősségére, míg a fennmaradó két csoport eredményeiből további következtetések vonhatók le mind az asszembliszmák, mind az 1,6-hexándiol mutagén/toxikus hatásának tekintetében.

Előzetes eredményeink szerint az 1,6-hexándiol önmagában jelentősen nagyobb halálozási aránnyal járt a lárvák körében, mint Röntgen-kezelés mellett. Ebből arra következtethetünk, hogy az 1,6-hexándiol hatására feloldódó

asszembliszómákból „felszabaduló”, normál esetben kettős-szálú DNS-törés esetén aktiválódó DNS-hibajavító fehérjék DNS-törés hiányában az ép DNS-t módosítják, ezzel sok esetben visszafordíthatatlan károsodást okozva. Ellenben, ha Röntgen-sugárzással kiváltjuk a kettős szálú DNS-törést, akkor az 1,6-hexándiol által az asszembliszómákból felszabadított DNS-hibajavító fehérjék jelenléte indokolttá válik és segíti a túlélést. A kizárólag 1,6-hexándiollal kezelt csoportban a túlélők valószínűleg a populáció azon egyedei közé tartoznak, amelyek rendkívül ellenállóak az 1,6-hexándiollal szemben, ugyanis rajtuk mozaikfolt egyáltalán nem volt detektálható. A mutációs rátát tekintve a kontrolltól két nagyságrenddel magasabb értéket produkált mind a Röntgenkezelt, mind a kettős-kezelt csoport, ám a Röntgen-kezeltéknél magasabb a rekombinációs frekvencia.

Kísérleti eredményeinket a besugárzott lárvákból izolált asszembliszómák *BLM* (*Bloom syndrome protein*) mRNS-ének mérésével egészítettük ki. A *BLM* gén az ecetmuslicában (*DmBlm*) az élesztőben lévő *SGS1* gén megfelelője, szaknyelven ortológja (Kusano és mtsai. 1999). A besugarazott lárvák asszembliszómáiban a *BLM* mRNS mennyisége lecsökken a nem kezelt lárvákhoz képest. Úgy tűnik tehát, hogy az asszembliszómák a muslicák szárnysejtjeiben éppen úgy reagálnak a DNS károsító hatásra, mint az élesztősejtjeikben. Annyi a különbség, hogy az ecet muslicák megfigyelésével szemet gyönyörködtetőbb fenotípusokat is nyomon tudunk követni, mint amilyen a letalítás/halál.

A fázisszeparáció és az asszembliszómák szerepe a növényekben

A növényvilág jelentős szereppel bír a földi élet történetében, s jelenleg is a bioszféra egyik alapkövének tekinthető. Az állatvilággal ellentétben a magasabbrendű növények helyhez kötött életmódot folytatnak, s a környezetükben megtalálható károsító hatásokra csupán szervi, szöveti, vagy akár sejtszintű

mechanizmusokkal tudnak válaszolni. A sejtszervecskék mellett fázisszeparált szemcsék is számottevő szereppel bírnak a sejtben zajló biokémiai folyamatok térbeli és időbeni szerveződésében. A makromolekulák kölcsönhatásaiból dinamikus kialakuló apró részecskék pontos funkciója még ismeretlen, de jelenleg is aktív kutatás tárgyát képezi a növénybiológiában.

Az eukarióták között számos olyan szemcsét különböztethetünk meg, melyek evolúciósan konzerváltak tekinthetőek, s megtalálhatóak a növényi sejtekben is. Ilyenek többek között a sejtmagvacska és más sejtmagi struktúrák, a P-testek, stressz granulomok (Xu és mtsai. 2021). Felfedezésre kerültek ellenben olyan részecskék, melyek tulajdonságai és szerepe jelentősen különböznek más élőlényektől. A növények egyik legjellemzőbb tulajdonsága a légköri szén-dioxid átalakítása szerves szenné. Ebben kulcsfontosságú a Rubisco (*Ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz*) enzim. Az enzim karboxiláz aktivitása során történik a szén-dioxid megkötése, de a reakció lejátszódhat ellentétesen is. A karboxiláz aktivitás fenntartásához egy térben magas $\text{CO}_2:\text{O}_2$ arányra van szükség, különben a reakció mindkét irányba lejátszódik (Bar és mtsai. 2019). A fotoautotróf tengeri egysejtűek képesek a napfény energiáját felhasználva szerves molekulák gyártására. A bennük található pirenoid test, egy fázisszeparált szén-dioxid megkötésére képes szemcse. A szerkezete folyadékszerű (Rosenzweig és mtsai. 2017), s egy protein köré szerveződik (Mackinder és mtsai. 2016), így fenntartja a Rubisco enzim működését. A prokarióta cianobaktériumokban található karboxiszómák szerepe hasonló a pirenoid szemcséhez, s ezekről is bizonyítást nyert a folyadékcsepp szerű fázisszeparáció (Wang és mtsai. 2019).

A mag csírázása szempontjából az egyik legjelentősebb környezeti tényező a víztartalom. A hidratáció megkezdésekor a fehérje gyorsan fázisszeparált szemcsékbe szerveződik a citoplazmában, s ha a környezet víztartalma alacsony, leállítja a csírázást, s a fehérje a kiszáradás során ismét szétszóródik

a citoplazmában. Ez a reverzibilis folyamat magyarázatot adott a magvak víztartalom érzékelésére, mely igen sokáig ismeretlen volt (Ouyang és mtsai. 2020). Az irodalomban említésre kerülnek még ezen kívül más életfolyamatok is, ahol a fázisszeparáció fontos szereppel rendelkezik, mint például a fény vagy hőérzékelés, a hormon jelátvitel vagy a pollenfal szintézis. Összességében kijelenthető, hogy jelentős szabályozó mechanizmusról beszélhetünk. Az asszembliszómák vizsgálata során, amennyiben a fázisszeparációra ható anyagokkal dolgozunk, mindenképpen észben kell tartani, hogy a föntebb említett folyamatok is érintve lesznek. Ezért a fázisszeparáció gátlásának lehetőségét kihasználó kísérleteinkben mindig az asszembliszóma izolátumok összetételében bekövetkező változásokra kell fókuszálnunk, hogy ne adjunk esélyt téves következtetések levonására.

A növények helyhez kötött életmódjuk során a környezet káros hatásaival szemben sokkal védtelenebbek, mint a helyváltoztatásra képes élőlények. Adott a kérdés, hogy a fázisszeparáció szerepet játszik-e a stressz kivédése során? Az előbb említett, embrióban megtalálható protein segít érzékelni a vízhiányt, így elkerülve a kiszáradást. Az eukarióta stressz granulumok káros hatás során létrejövő citoplazmatikus mRNS és protein csoportosulások, melyek szabályozzák a stressz választ, így segítve a növények túlélését (Kosmacz és mtsai. 2019). Növényekben nem tartalmaznak riboszómákat, csupán a transzláció megkezdéséhez szükséges fehérjéket. Stressz helyzetben ez előnyös a sejtnak, hiszen, ha a mRNS szintézis meg is szűnik, a védelemben szerepet játszó fehérjék szintézise akkor sem áll le teljesen. Hasonló szereppel bírhatnak az asszembliszómák, de velük kapcsolatban még nem rendelkezünk irodalmi adatokkal. A kutatásaink során sikerült kimutatni ezen sejtalkotókat lúdfűben, s mennyiségüket a hőkezelés erőteljesen befolyásolta. Az összetételük és szerepük még kérdéses, de a stressz granulumokkal ellentétben már összeállt, transzláció közben megakadt mRNS-t és riboszómákat tartalmaznak. Mivel a

transzláció már megkezdődött, így környezeti hatásra sokkal gyorsabb reakcióra adnak lehetőséget. Stressz helyzetben gátlás léphet fel a transzkripció vagy transzláció megkezdése során egyaránt. Az asszembliszómák ilyen feltételek mellett is képesek a védelemben szerepet játszó fehérjék transzlációjára, lehetőséget biztosítva a sejt túlélésére. Más eukarióta élőlényekben az UV, a hő és a nehézfémek káros hatásainak kivédéséhez járulnak hozzá. Valószínűsíthető, hogy ez a hatás a legtöbb élő és élettelen forrásból származó stressz során létrejöhet. A növények számára a sejtszintű védelmi mechanizmusok jelentik sokszor a védelem első és egyetlen vonalát, így a jelenlétük már önmagában is fontos. Ez az új mechanizmus lehetővé teszi a sejtek számára a gyorsabb és pontosabb választ a környezetre, mely segítheti a túlélést.

Ez a sejtalkotó a növénybiológia szempontjából még ismeretlen, de az asszembliszómák kimutatása már önmagában is egy fontos mérföldkő. Ez a kísérleti eredmény betekintést nyújt a stresszválasz egy új, eddig ismeretlen részletébe, melynek valószínűleg jelentős szerepe van a növényekben. A lejátszódó folyamatok pontos feltérképezése és leírása jelenleg még nem lehetséges, de a kutatásunk segíthet fényt deríteni erre a mechanizmusra is.

Összefoglalás

Kutatócsoportunk eddig valamennyi vizsgált eukarióta élőlényben azonosította az asszembliszómák jelenlétét. Élesztő, muslica és humán tumorsejtvonal modelleken azt is igazoltuk, hogy az asszembliszómák egy evolúciósan konzervált funkciója, hogy DNS károsító hatásokra gyors és biztonságos válasszal szolgálhasson a sejt. Véleményünk szerint a felfedezés kemoterápiára rezisztens tumorok diagnosztikai módszerrel történő kiszűrésében, és stressztűrő növények és állatok nemesítésében hasznosulhat, de számtalan egyéb területen is elképzelhető előrelépés az asszembliszómákkal kapcsolatosan egyre bővülő ismereteink következményeként.

Köszönetnyilvánítás

A kézirat alapjául szolgáló kutatásokat a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíja (BO/902/19 Dr. Villányi Zoltán részére) valamint a Nemzeti Kutatási, Innovációs és Fejlesztési Minisztérium alábbi forrásainak támogatása tette lehetővé: (OTKA-K135303 Ördögné Dr. Kolbert Zsuzsanna részére), GINOP-2.3.2-15-2016-00020, GINOP-2.3.2-15-2016-00038, ÚNKP-19-4-SZTE-118, ÚNKP-20-5-SZTE-671, ÚNKP-21-5-595-SZTE.

Irodalom

- Shamipour, S., Caballero-Mancebo, S., Heisenberg, C. P. (2021). Cytoplasm's got moves. *Developmental Cell*, 56(2), 213-226.
- Schwarz, A., Beck, M. (2019). The benefits of cotranslational assembly: a structural perspective. *Trends in Cell Biology*, 29(10), 791-803.
- Duncan, C. D., Mata, J. (2011). Widespread cotranslational formation of protein complexes. *PLoS genetics*, 7(12), e1002398.
- Györkei, Á., Szatmári, O., Villanyi, Z. (2019). A génkifejeződés körkörös szabályozásától, fázisátmeneten keresztül, a genotoxikus hatások elleni védelemig. *BIOKÉMIA: A MAGYAR BIOKÉMIAI EGYESÜLET FOLYÓIRATA*, 43(2), 4-25.
- Panasenko, O. O., Somasekharan, S. P., Villanyi, Z., Zagatti, M., Bezrukov, F., Rashpa, R., ... Collart, M. A. (2019). Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assemblysomes. *Nature structural molecular biology*, 26(2), 110-120.
- Barrault, M. B., Richet, N., Godard, C., Murciano, B., Le Tallec, B., Rousseau, E., ... Peyroche, A. (2012). Dual functions of the Hsm3 protein in chaperoning and scaffolding regulatory particle subunits during the proteasome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(17), E1001-E1010.
- Fu, H., Reis, N., Lee, Y., Glickman, M. H., Vierstra, R. D. (2001). Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *The EMBO journal*, 20(24), 7096-7107.
- Collart, M. A. (2016). The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 7(4), 438-454.
- Villanyi, Z., Ribaud, V., Kassem, S., Panasenko, O. O., Pahi, Z., Gupta, I., ... Collart, M. A. (2014). The Not5 subunit of the ccr4-not complex connects transcription and translation. *PLoS genetics*, 10(10), e1004569.

- Kassem, S., Villanyi, Z., Collart, M. A. (2017). Not5-dependent co-translational assembly of Ada2 and Spt20 is essential for functional integrity of SAGA. *Nucleic acids research*, 45(3), 1186-1199.
- Collart, M. A., Weiss, B. (2020). Ribosome pausing, a dangerous necessity for co-translational events. *Nucleic acids research*, 48(3), 1043-1055.
- Owen, I., Shewmaker, F. (2019). The role of post-translational modifications in the phase transitions of intrinsically disordered proteins. *International journal of molecular sciences*, 20(21), 5501.
- Alberti, S. (2017). Phase separation in biology. *Current Biology*, 27(20), R1097-R1102.
- Kroschwald, S., Maharana, S., Simon, A. (2017). Hexanediol: a chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments. *Matters*, 3(5), e201702000010.
- Ghoneim, D. H., Zhang, X., Brule, C. E., Mathews, D. H., Grayhack, E. J. (2019). Conservation of location of several specific inhibitory codon pairs in the *Saccharomyces sensu stricto* yeasts reveals translational selection. *Nucleic acids research*, 47(3), 1164-1177.
- Gravel, S., Chapman, J. R., Magill, C., Jackson, S. P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes development*, 22(20), 2767-2772.
- Mimitou, E. P., Symington, L. S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature*, 455(7214), 770-774.
- Zhu, Z., Chung, W. H., Shim, E. Y., Lee, S. E., Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell*, 134(6), 981-994.
- Juszkiewicz, S., Hegde, R. S. (2018). Quality control of orphaned proteins. *Molecular cell*, 71(3), 443-457.
- Szabad, J. (2019). *Genetikai mozaikok*. JATEPress.
- Graf, U., Würgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis*, 6(2), 153-188.
- Würgler, F. E., Graf, U., Frei, H. (1985). Somatic mutation and recombination test in wings of *Drosophila melanogaster*. *Progress in Mutation Research*, 5, 325-340.
- Stern, C. (1936). Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 21(6), 625.
- Hoffmann, G. R. (1994). Induction of genetic recombination: consequences and model systems. *Environmental and molecular mutagenesis*, 23(S2), 59-66.
- Lindsley, D. L., Zimm, G. G. (2012). *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic press.

- Spanó, M. A., Frei, H., Würigler, F. E., Graf, U. (2001). Recombinogenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, 16(5), 385-394.
- Kusano, K., Berres, M. E., Engels, W. R. (1999). Evolution of the RECQ family of helicases: A drosophila homolog, Dmblm, is similar to the human bloom syndrome gene. *Genetics*, 151(3), 1027-1039.
- Xu, X., Zheng, C., Lu, D., Song, C. P., Zhang, L. (2021). Phase separation in plants: New insights into cellular compartmentalization. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(11), 1835-1855.
- Bar-On, Y. M., Milo, R. (2019). The global mass and average rate of rubisco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(10), 4738-4743.
- Rosenzweig, E. S. F., Xu, B., Cuellar, L. K., Martinez-Sanchez, A., Schaffer, M., Strauss, M., ... Jonikas, M. C. (2017). The eukaryotic CO₂-concentrating organelle is liquid-like and exhibits dynamic reorganization. *Cell*, 171(1), 148-162.
- Mackinder, L. C., Meyer, M. T., Mettler-Altmann, T., Chen, V. K., Mitchell, M. C., Caspari, O., ... Jonikas, M. C. (2016). A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(21), 5958-5963.
- Wang, H., Yan, X., Aigner, H., Bracher, A., Nguyen, N. D., Hee, W. Y., ... Hayer-Hartl, M. (2019). Rubisco condensate formation by CcmM in β -carboxysome biogenesis. *Nature*, 566(7742), 131-135.
- Ouyang, M., Li, X., Zhang, J., Feng, P., Pu, H., Kong, L., ... Zhang, L. (2020). Liquid-liquid phase transition drives intra-chloroplast cargo sorting. *Cell*, 180(6), 1144-1159.
- Kosmacz, M., Gorka, M., Schmidt, S., Luzarowski, M., Moreno, J. C., Szlachetko, J., ... Skirycz, A. (2019). Protein and metabolite composition of *Arabidopsis* stress granules. *New Phytologist*, 222(3), 1420-1433.

