

SZAKMAI ZÁRÓ BESZÁMOLÓ

az Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP) ösztöndíjának támogatásával a
2021/2022 tanévben végzett munkáról

A pályázó adatai

Név	Székelly Mihály
Pályázat típusa (alap, mester, doktorandusz, doktorvárományos)	mester
Pályázat kódja	ÚNKP-21-2-DE-I-362
Szerződés egyedi azonosítója	RH/1225-181/2021
Neptun kód	GY8C0M
Lakcím	4032 Debrecen, Bán Imre utca 32.
Adóazonosító jel	8487040810
Kutatási program címe (a beadott pályázat szerint)	A miozin foszfatáz által szabályozott protoonkogén jelátviteli pályák vizsgálata
Témavezető neve	Dr. Lontay Beáta

Tájékoztató

A beszámolóban szakmai értékelést kell tartalmaznia a támogatás céljának, a kutatási tervnek a megvalósulásáról (maximális terjedelem: 2 oldal). Az elkészült előadás, publikáció, tanulmány, fénykép, video a szakmai záró beszámoló mellékletét képezi (akár papír alapú, akár digitalizált adattárolásra alkalmas eszközön (pl. CD, DVD) történő benyújtással). A szakmai beszámolóban a szerződésben vállalt feladat teljesítésére, ezen belül értelemszerűen - a feladat jellegétől függően -, az alábbiakra kell kitérni:

- *Rendezvény esetében:* az eredeti műsorterv (ütemterv, forgatókönyv stb.) teljesítése, eredménye, foto-, médiamegjelenés a fellépők/előadók neve, szervezete, a résztvevők köre, a megjelentek pontos vagy becsült létszáma, a műsortervtől való eltérés oka, ez mennyiben befolyásolta a tervezett eredményt, mivel helyettesítették az elmaradt előadást/bemutatót, a közönség miként fogadta az előadásokat/bemutatókat, a rendezvénynek milyen volt a társadalmi, szakmai visszhangja. Rendezvénysorozat esetén, vagy ha a rendezvény nem kifejezetten csak a minisztérium ügykörébe tartozó témával foglalkozott, kimutatást kell készíteni arról, hogy mely előadások/bemutatók foglalkoztak a minisztérium ügykörébe tartozó kérdésekkel.

- *Tanulmány készítés esetén:* ismertetni kell röviden a tanulmány kidolgozásának szükségességét és hasznosíthatóságát, tartalmának rövid összefoglalását, kiemelve a következtetéseket és javaslatokat, megjelölve a kidolgozáshoz szükséges saját kutatási eredményeket és a forrásul felhasznált szakanyagokat, továbbá, hogy az elkészített tanulmány hol kerül publikálásra. Csatolni kell a tanulmányt, a szerződésben meghatározott példányban, továbbá – amennyiben a szerződésben ez előírásra került - csatolni kell a kedvezményezett nyilatkozatát arról, hogy az elkészült tanulmányt a minisztérium felhasználhatja, szabadon terjesztheti.

- *Felmérés, vizsgálat esetén:* ismertetni kell röviden a felmérés, vizsgálat tárgyát, terjedelmét, szükségességét, az eredmények hasznosításának területeit, rövid összefoglalóban az eredményeket, a következtetéseket és javaslatokat, továbbá, hogy az elkészített anyag hol kerül publikálásra. Csatolni kell az elkészült anyagot, a szerződésben meghatározott példányban, továbbá csatolni kell a kedvezményezett nyilatkozatát arról, hogy az elkészült anyagot a minisztérium felhasználhatja, szabadon terjesztheti.

A beszámolókat a támogatás tárgyától függően megfelelő részletességgel kell összeállítani – dokumentumokkal, fényképekkel, egyéb audio-vizuális eszközökkel illusztrálni azt. A támogatásból megvalósult program eredményét ki kell emelni a beszámolóban.

A szakmai záró beszámolót alap-, mester (osztatlan), doktori és doktorjelölti ösztöndíjak esetén a témavezetőnek jóváhagyólag kiadmányoznia szükséges.

Szakmai beszámoló

1. A pályázat keretében végzett kutatómunka leírása; szakmai értékelés a kutatási terv megvalósulásáról (max. 2 oldal)

A daganatos halálozások világ szinten a második leggyakoribb halálokat képezik, a legjelentősebb közülük a tüdődaganat. A rosszindulatú daganatok kialakulásában jelentős szerepet játszik a normál sejtciklus és a génexpresszió fenntartásáért felelős enzimek túl, illetve alulműködése, melyet a bennük kialakuló mutációk mellett azok eltérő poszttranszlációs módosítása, például foszforilációja, vagy metilációja okoz.

UNKP kutatómunkám során munkacsoportunk célja volt egy ilyen, a génexpresszió fenntartásában jelentős szerepet játszó enzimnek, a protein arginin metiltransferáz 5-nek (PRMT5) a vizsgálata, és annak jelentős szabályozójának, a miozin foszfatáznak (MP), és szubsztrátjának, a H4 hiszton fehérjének elemzése. Az említett fehérjék poszttranszlációs és génexpressziós szintű változásait egészséges és daganatos humán tüdőszöveti mintákban vizsgáltuk.

A célkitűzés megvalósításához először a humán tüdődaganat szövetbank bővítésére volt szükség. Ez a Debreceni Egyetem Klinikai Központjának Mellkassebészeti Tanszékevel történő kollaborációban valósult meg, jelenleg 43 egyénből származó minta áll rendelkezésünkre. Egy betegből 3-3 egészséges és daganatos szöveti mintát vettünk. Egy pár mintát RNS later-be helyeztünk, majd genomi DNS-t és RNS-t preparáltunk belőlük. Egy másik pár mintát folyékony nitrogénben fagyasztottunk, majd lizálást és fehérjemérési esszé követően Western blot fehérjeanalízist végeztünk. A harmadik pár mintát fagyasztottuk, későbbiekben metszést és festést követően ezeket konfokális mikroszkóppal tervezzük vizsgálni.

RNS later-be helyezett szövetdarabokat Trizol és TissueLyser segítségével homogenizáltunk, majd RNS-t és genomi DNS-t preparáltunk. Az így kinyert RNS-sel célunk a fehérjék expressziós szintjének vizsgálata volt, ehhez kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakciót használtunk. A PRMT5 és a MP szabályozó alegységének, a MYPT1 vizsgálatakor is hasonló eredményeket kaptunk, nem tapasztaltunk ugyanis szignifikáns változást a tumoros mintákban az egészséges mintákhoz képest.

Folyékony nitrogénbe helyezett mintákat RIPA puffer és TissueRuptor segítségével homogenizáltuk, majd BCA fehérjemérési esszé segítségével meghatároztuk az egyes szövetlizátumok fehérjetartalmát. Ezt követően Western blot analízissel vizsgáltuk a tumoros és kontroll minták közötti fehérje expressziós, illetve poszttranszlációs módosításbeli változásokat. Szemikvantitatív Western blot-ot végeztünk, mivel így kiküszöbölhettük, hogy a mintafelvételkor kialakult különbségek, és az eltérő fehérje expressziós szintekből fakadó különbségek befolyásolják eredményeinket. PRMT5, MYPT1, H4 és retinoblasztóma fehérjére specifikus, továbbá a PRM5 és a MYPT1 szabályozó helyei ellen termeltetett antitesteket használtunk fel.

Először a PRMT5 fehérjeszintű relatív expresszióját vizsgáltuk, ebben nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést. Ezután az enzim aktivitását vizsgáltuk azáltal, hogy az őt szabályozó, aktiváló Thr80 aminosav oldallánc foszforiláltsági szintjét vizsgáltuk. Itt szignifikáns növekedést tapasztaltunk, tehát a PRMT5 aktivitása daganatos szöveti mintákban szignifikánsan magasabb volt, mint az egészséges szöveti mintákban.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az enzim aktivitásának növekedése milyen hatással volt szubsztrátjának, a hiszton 4 fehérjének módosulására. A H4 fehérje expressziójának vizsgálatakor nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. A H4 fehérje 3-as arginin oldalláncának vizsgálatakor azonban azt tapasztaltuk, hogy annak szimmetrikus dimetiláltsági szintje szignifikánsan emelkedett, tehát a PRMT5 enzim aktivitás növekedése megfigyelhető volt annak szubsztrátján is.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a hiszton fehérjék módosulása okozott-e génexpressziós szintű változást a tumoros mintákban, ezért a retinoblasztóma tumorszuppresszor fehérje relatív expresszióját vizsgáltuk. Ekkor pedig azt tapasztaltuk, hogy a fehérje szintje a daganatos mintákban szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll mintákhoz képest, tehát a hiszton fehérjék fokozott szimmetrikus dimetilációja a retinoblasztóma tumorszuppresszor géncsendesítéséhez vezethetett.

Ezt követően vizsgáltuk a PRMT5 szabályozását a miozin foszfatáz által. Először a MP szabályozó alegységének, a MYPT1-nek az expresszióját vizsgáltuk, amiben nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a daganatos és egészséges minták között. A MP aktivitását ezután annak szabályozó aminosav oldalláncának, a Thr696-os gátló foszforilációs helynek analízisével vizsgáltuk. A Thr696 ellen termeltetett specifikus antitestekkel pedig szignifikáns foszforiláltsági szint növekedést, tehát szignifikánsan csökkent aktivitást mutattunk ki, amely eredmény megmagyarázza a PRMT5 aktivitásnövekedését ezekben a mintákban.

Összefoglalva tehát a miozin foszfatáz csökkent aktivitása a PRMT5 aktiváló foszforilációs helyének magasabb foszforiláltsági szintjét eredményezi, a PRMT5 aktivitásnövekedése pedig hisztonfehérjék fokozott szimmetrikus dimetiláltságát vonja maga után. Ez pedig többek között a retinoblasztóma tumorszuppresszor fehérje expressziójának szignifikáns csökkenését eredményezi, ami pedig végső soron tumorképződéshez vezet.

Sikerült tehát tüdődaganatban azonosítani az általunk feltételezett proto-onkogén jelátviteli útvonalat. Reményeink szerint a PRMT5 Thr80-as foszforilációja tüdődaganat markerként is szolgálhat a későbbiekben, ennek a jelátviteli pályának a többi elemével, illetve poszttranszlációs módosításaival együtt.

Az eredmények és a betegek adatainak vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy a PRMT5 aktivitásnövekedése korrelált a beteg stádiumával, illetve a daganat grádusával is.

Vállalásaimat teljesítettem, hiszen az ösztöndíjas időszakban Lontay Beáta témavezetőm felügyeletével a kutatócsoportja munkájába bekapcsolódva kutatási tevékenységet végeztem, illetve az ösztöndíjas időszak alatt a fogadó felsőoktatási intézmény számára a tudományos kutatási munkám eredményeit hozzáférhetővé tettem. Továbbá az ösztöndíjas időszak alatti két félévben súlyozott tanulmányi átlagom 5.0 volt. Továbbá Tudományos Diákköri Konferenciára (TDK) dolgozatot készítettem és egyetemem TDK-konferenciáján bemutattam a 2021/2022. tanévben, valamint az intézményi ÚNKP rendezvényen is ismertettem. Továbbá igazolni tudom aktív hallgatói jogviszonyomat.

2. Eredmények összesítése

Tudomány-népszerűsítő cikkek száma	-
TDK-dolgozatok száma	1
Hazai konferencia-előadások száma (az ÚNKP konferencián kívül)	3
Nemzetközi konferencia-előadások száma	1
Benyújtott (de még nem elfogadott) tudományos közlemények száma	-
Elfogadott (de még nem megjelent) tudományos közlemények száma	-
Megjelent tudományos közlemények száma	-

3. A pályázati időszakban megjelent publikációk felsorolása (az elkészült előadás, publikáció, tanulmány, fénykép, video a szakmai záró beszámoló mellékletét képezi – digitalizált adattárolásra alkalmas eszközön (pl. CD, DVD) vagy e-mailen történő benyújtással).

Hungarian Molecular Life Science Conference	Eger	2021. november 5-7.	poszter
Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi 2021/2022. évi Tudományos Diákköri Konferenciája	Debrecen	2022. február 23-25.	I. helyezett előadás
III. Semmelweis Tehetségkonferencia	online	2022. február 19.	poszter
XVI. Sántha Kálmán Tudományos e-Kerekasztal	online	2022. április 2.	előadás
EMBO Workshop: Reversible phosphorylation, signal integration and drug discovery	Vouliagmeni, Görögország	2022. május 22-26.	poszter

Beszámoló az ösztöndíjon felül biztosított kutatási támogatás felhasználásáról

4. Pénzügyi beszámoló¹

Kiadás megnevezése	Tervezett (Ft)	Megvalósított (Ft)
1.1. anyagköltség, készletbeszerzés		
1.2. szellemi tevékenység költségei, szakértői, előadói díjak		
1.3. szállítási, utazási költségek		
1.4. egyéb szolgáltatás vásárlása		
1.5. egyéb dologi kiadások		
1. Dologi kiadások összesen (1.1.+1.2.+1.3.+1.4.+1.5.)		
2. Felhalmozási kiadások (immateriális javak, tárgyi eszközök beszerzése)		
3. Intézményi általános költség (50 %)		
ÖSSZESEN (1.+2.+3.)		

5. Pénzügyi beszámoló szöveges indoklása (nagyobb tételek, beszerzés szükségességének indoklása)

A támogatás a kutatás céljaival összhangban teljes összegben felhasználásra került.

Debrecen, 2022. július 6.



témavezető aláírása



ösztöndíjas aláírása

Mellékletek:

- az elkészült előadás, publikáció, tanulmány, fénykép, video, stb., valamint az aláírt szakmai beszámoló szkennelve digitalizált adattárolásra alkalmas eszközön (pl. CD, DVD)
- témavezetői szakmai értékelés
- témavezetői konzultációs lap
- doktorvárományosok esetében igazolás az értekezés benyújtásáról

¹ A tervezett összegeket az eredeti, aláírt költségterv szerint kell megadni. A végösszeg az alapképzés, mester- (osztatlan) képzés kategóriában 5 hónapra – 200.000 Ft; 10 hónapra – 400.000 Ft