

A dolgozat gondos munka, fogalmazásmódja világos, magyarul is gördülékeny, jó szakmai olvasmány. Az olvasó többnek, tájékozottabbnak érzi magát elolvasása után, mint előtte - hasznosan töltötte idejét. Megjegyzés: tovább könnyítette volna a bíráló feladatát, ha a tézisekben foglaltak és a közlemények kapcsolata jobban követhető – vagyis ha a fő megállapítások egy-egy közleményhez köthetők, ahol utána lehet nézni a részleteknek. Összesen két fogalmazási pontatlanságot vagy elírást észlelt a bíráló. (10. o.: “Egyes sejtek funkcionyeréses jellegű változása, vagy a 14. O.-on a gén és fehérje nevében a kisbetűs/nagybetűs írásmód cseréje.)

A dolgozat gondolatébresztő, kérdéseket provokáló - annak minden fejezetében. Ezért kérdéseimet, megjegyzéseimet az egyes fejezetekre vonatkozó reflexióim keretében teszem fel. Az – összességében egyértelműen pozitív - opponensi értékelés végén pedig további, általánosabb, vagy a munkához kevésbé direkt módon kapcsolódó kérdéseket teszek fel.

A Bevezetés mintegy 20 oldal terjedelmű, nagyon világos, lényegretörő áttekintést ad a mutagenesis okairól, a hibajavító és hibaelkerülő útvonalakról, a mutagenesis vizsgálati módszereiről, a daganatok mutációs mintázatairól és azok terápiás jelentőségéről. Hiányoltam viszont a talán minden “kanonikus” mutagenetikus mechanizmusnál gyakoribb téves ribonukleotid beépülés majd eltávolítás mutagén hatásának taglalását. Ugyancsak idetartozónak vélem a topoizomeráz-hasítási komplexek okozta enzim-DNS adduktok TDP-k és más enzimek általi reparálásának folyamatait – utóbbiakra csak nagyon vázlatosan utal egy későbbi alfejezetben. Nem tudom, mennyire általánosan elfogadott, hogy a gammaH2A.X fókuszoknak a hibajavítást és az ellenőrzési pont (checkpoint) működést összehangoló jelentősége lenne.

A DNS-hibajavítás hiányát kiaknázó tumorterápiák c. alfejezetben említi a BRCA mutáns sejtek fokozott érzékenysége PARP inhibitorokkal szemben. Összevetve ezt a tapasztalatot a Cellminer adatbázis adataival (<https://discover.nci.nih.gov/cellminercdb/>), nem igazán érhető tetten ez a fokozott érzékenység.

A módszerek c. fejezet az alkalmazott kísérleti rendszerekről és metodikákról ad imponáló képet, kb. 8 oldalnyi terjedelemben. Homológ génkiütés, szintetikus DNS lézió keresztüli DNS replikáció vizsgálata élő sejtben, CRISPR/Cas9-alapú in vivo kettős száltörés javítási esszé és az újgenerációs szekvenáláshoz csatlakozó bioinformatikai know-how teljes vertikuma szerepel itt, a mutációs mintázatok analíziséhez szükséges kifinomult bioinformatikai kelléktárral együtt. Egy metodikai megjegyzést itt teszek: az alkalmazott viabilitási teszt nem teszi lehetővé a citotoxicitás sejtenkénti analízisét, tehát nem biztosítja azt a lehetőséget, hogy a haldokló vagy halott sejteket elkülönítve, azkban szelektíve tanulmányozzák egy frissen megjelenő mutáció szerepét.

A bioinformatikai eszköztár elemei között saját fejlesztésű, a versenytársakhoz képest sokkal hatékonyabb mutációkeresési algoritmust is kidolgoztak, tehintve előbbieket jelentős fals-positív hozamát. A bioinformatikában járatlan, vagy maximum felhasználói szintű ismeretekkel rendelkező olvasó számára megközelíthető-e, hogy mi az új elv/elem a doktori címre Pályázó megközelítésében? Nem túl mióp-e a megközelítés: mekkora mérettartományban észleli a rutinszerűen alkalmazott algoritmus a génátrendeződéseket?

Az eredmények és megvitatásuk fejezet majdnem 50 oldalnyi, ebben kiváló nemzetközi folyóiratokban 2012 óta megjelent közleményei anyagát foglalja össze. Ezek közül kimagaslik egy társszerzős Ann. Oncol. közlemény, a BLM helikázzal kapcsolatos eredményeivel, ill. egy 2016-os és egy 2019-es Genome Biology közlemény. Előbbiben nyolc, klinikai gyakorlatban alkalmazott citotoxikus ágens által a kitűnő modellnek bizonyult DT40 sejtvonalban kiváltott mutációs spektrumát határozta meg, a spontán mutációs ráta jellemzésén túlmenően. A Gemcitabine, 5-fluorouracil, hydroxyurea, doxorubicin, paclitaxel – és mint a tézisekben részletesen kifejti, a PARP inhibitorok - nem bizonyultak mutagénnek, míg a cisplatin esetében postterápiás daganatképződés jelentős esélyére utaló magas mutációs rátát diagnosztizált. A cisplatin-okozta mutációk megjelenését egyszál-keresztkötéseknek tulajdonította. Ebben a közleményben BRCA2 mutációt revertáló cisplatin indukálta mutációkról is beszámol – a tézisekben ennek az érdekes és fontos megfigyelésüknek az ismertetésére nem tér ki.

Az újabb Genome Biology közleményükben a HR útvonal valószínű főszereplői kiütése nyomán megfigyelhető mutációs szignatúrákat jellemezték a DT40 sejttes modellben, teljes genom szekvenálós kutatási program keretében, CRISPR/Cas9 generálta dupla száltörések reparációja nyomán észlelt mutációs változásokkal összehasonlítva. Egyik fontos – a DNS hibajavítás és az ellenőrzési pontok hierarchikus viszonyát definiáló - megállapítása, hogy a HR-t érintő inaktivációkhoz képest a checkpoint

inaktivációnak nem voltak mutációs következményei. Meglepően és a klinikai gyakorlat számára is fontos szempontot szolgáltatva, a vizsgált DNS-károsító citotoxikus ágensek vagy PARP-inhibitorok sem mutattak ezekben a sejtekben nagyobb aktivitást. Ez meglepő az anthraciklinek esetében azért is, mert az interkalációt követően pl. a doxorubicin kovalens kötést létesít a DNS-sel. Felmerül az a kérdés is, hogy ezek a jelenségek mennyire HR-specifikusak - vajon az ATR/CHK1 útvonal esetében is ezt tapasztalták volna, a p53 kifejeződését indukálva a DT40 sejtekben? Hasonlóképpen a brca2 cisplatin kezelés során megfigyelt revertáló mutációjára, nem változhatott-e a p53 státusz is a DT40 cisplatin kezelése során?

Részletesen ismerteti a tézisek a rendkívül izgalmas, 2019-es Int. J. Cancer közleményben foglaltakat is. Egy nem dohányzásos eredetű tüdő adenocarcinoma retrospektív analízisét végezték el, a primer ill. metasztatikus daganatos szövetekből vett minták teljes genom szekvenálása segítségével felderítve a mutációk kialakulásának kórtörténetét és összefüggését a terápiás lépésekkel.

A brca1-/-, p53-/- egértörzs esetében elvégzett vizsgálatok során a Doxorubicin érzékenység 3x-os növekedését tapasztalták brca1-/- egerekben. Nincs ez ellentmondásban a DT40 sejteken tapasztaltakkal (ld. 2019-es Genome Biology cikk)?

A mutagenézis részletes bioinformatikai analízisét taglalja a következő fejezet, majd a szignaturákból levonható mechanisztikus következtetéseket. Az ezt követő alfejezetben a PCNA poliubikvitinációjának jelentőségét firtató kutatásairól ír és azt a megállapítást teszi, hogy a monoubikvitináció elegendő a releváns hibakerülő útvonalak működéséhez.

A BRCA-státusz és a gammaH2A.X fókuszok megjelenésének összefüggéséről szóló következő alfejezetben foglaltak megerősítik a felfogást, miszerint azok mind a replikációs stressz, mind a kettős száltörések kapcsán szerepet játszanak. A 80. O.-on azt írja, hogy a gammaH2A.X megemelkedett szintje nem minden sejtben jelenti a fókuszok megjelenését. Vajon mi zajlik ezekben a fókusz-negatív sejtekben?

A következtetések és kitekintés fejezettel ill. az új eredmények összefoglalásával zárul a disszertáció. Előbbiben kiemeli azt az általános tapasztalatát, hogy a mutagénikus jelenségek hátterében állhat egy-egy javító útvonal hiánya, az ilyenkor aktiválódó alternatív útvonalak

belépése, vagy egy hibaelkerülő folyamat maga. Utóbbi fő pontjait rövidítve itt megismétlem, azokkal egyetértve, jelentőségüket nagyra értékelve:

1. Teljes genom szekvenálások adatok több, a mutagenézis témakörében releváns sejtvonalon.
2. Új bioinformatikai platform kifejlesztése a genomszekvenálás mutagenézis-esszéként való felhasználásához.
3. A legfontosabb kemoterápeutikumok mutációs spektrumának jellemzése és általa a daganat evolúció követése.
4. A legfontosabb kemoterápeutikumok mutagén hatásának kvantitatív jellemzése keretében megállapította, hogy a ciszplatin jelentős mutagén hatással rendelkezik, szemben a PARP gátlószerekkel.
5. Munkája jelentősen hozzájárul ahhoz, hogy a mutációs spektrumok analízise bevonódjon a klinikai tumordiagnosztikai gyakorlatba.
6. Több fontos megállapítást tett a TLS UV toleranciában betöltött szerepére vonatkozóan és a PCNA ubikvitiláció szerepéről a sérült DNS replikációjában.

A rövidítések és az idézett irodalmak jegyzékét ill. a köszönetnyilvánítást a disszertáció alapját képező 13 saját közlemény felsorolása követi, a disszertáció végén. Ezek össz impact faktora kb. 94. Zömükben a pályázó utolsó szező, három közlemény esetében pedig megadja a cikkhez való hozzájárulását.

További kérdések:

A spontán mutációk eloszlása a genomban mutatott-e hot-spotokat?

Meglepőnek találtam, hogy ICL-ekre utaló mutációs mintázatot nem talált. A Fanconi anémia útvonal - számos más géntermékkel (pl. SMC5/6-tal) koordinációban - felelős az ICL reparációért, a DT40 sejtekben is (PMC7001510). Ezek az alkalmazott sejt-panelben nem lettek kiütve, tehát valószínűsíthető, hogy ezeket a léziókat az összes vizsgált DT40 sejtfeleség reparálni tudta. Másik lehetőség, hogy azok a sejtek, melyek az ilyen léziókat nem élték túl, nincsenek reprezentálva a

vizsgált sejthalmazban. Vagyis azt a következtetését, miszerint az ICL-eknek ne lenne szerepe a citotoxicitásban, túlzónak vagy elhamarkodottnak érzem.

A daganatok kezelése során – pl. ciszplatin alkalmazása esetén – gyakori esemény a chromothripsis, melynek nyomán egy lépésben rengeteg génátrendeződés következik be. Minek tulajdonítja, hogy ilyen eseményeket nem észleltek?

A szekvenálásokhoz megfelelő számú sejt felnövesztésére volt szükség, így egy-egy ilyen minta szükségszerűen új mutációkat is halmoz, azokon kívül, amelyek a kiindulási sejtben megvoltak. Ezeknek vajon mekkora a hozzájárulása a kapott eredményekhez? Esetleg érdekes lenne egy festékhigítási proliferációs esszében a nem osztódó populációt szortolva megnézni a mutációkat a nem osztódó sejtekben is.

A rad52 kifejeződés és az etopozid toxicitás a CellminerCDB-ben (ld. a linket fentebb) egymással korrelál. Ez ellentmondásban látszik lenni azzal, hogy a rad52 mutáció etopozid érzékenységet okozott a DT40-es kísérletekben (61. o.). Továbbá, a brca1,2 kifejeződés mértéke sem korrelál az olaparib aktivitással a Cellminer szerint. Mi lehet ezeknek a diskrepanciáknak az oka? Folytatva az összevetést a Cellminer adatbázissal: a 63. o.-on a BLM és FANCA közül csak utóbbi expressziója esetében találtak érzékenyítést ciszplatinra a triple- emlőrák sejtvonalakat összehasonlítva (pl. a GDSC-MGH-Sanger adatbázisban).

A doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak találom és azt gondolom, hogy Szüts Dávid a terület kutatói közösségének nemzetközileg is magasan jegyzett szereplője. A pályázó tevékenysége a DNS hibák keletkezésével, a hibajavítással és hibaelkerüléssel kapcsolatos hazai kutatások magasszínvonalú mezőnyében méltán tart számot a doktori címre.

A doktori munka tudományos eredményeit elegendőnek tartom az MTA doktori cím megszerzéséhez és a nyilvános védé kitűzését javaslom.

Debrecen, 2021. Január 12.

Dr. Szabó Gábor

Debreceni Egyetem, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet