

Válasz Dr. Boros Imre, az MTA doktora bírálatára

Hálasan köszönöm Dr. Boros Imrének értekezésem értékelését, észrevételeit és kérdéseit, és a sikeres védés esetén az MTA doktora cím megítélésére tett támogató javaslatát.

Az értekezésem bírálatában tett kérdéseire a következő válaszokat adom.

1. kérdés:

A spontán mutációk kialakulásának analízisére létrehozott program szükségességét a tumorgenomok analízisére általánosan használt rendelkezésre álló programok hiányosságaival indokolta. Mi az a különbség, a daganat minták és sejt klónok összehasonlítása esetén, ami az utóbbi esetben a hibás adatokat okozza a korábbi programok használatakor. A disszertációban említi a korábbi és az Önök által kifejlesztett program hatékonyságát gépi időt tekintve. Készült direkt összehasonlítás a két program között azonos minták feldolgozásával az eredményt tekintve is. Ha igen, akkor ennek ismerete befolyásolja-e valamilyen tekintetben a korábbi – általánosan használt - programmal nyert adatok validitását?

Válasz: A daganatok genomjának elemzésekor általában egy tumormintát egy azonos betegből származó normál mintához hasonlítanak, így a korábbi programokat is erre a feladatra fejlesztették. Az általunk fejlesztett IsoMut nevű program nem párosával hasonlítja össze a mintákat, hanem sok izogenikus mintát hasonlít egyszerre, és ezáltal éri el a kiváló zajszűrést. Mintapárok esetén ilyen szintű zajszűrésre nincsen lehetőség, ezért szolgáltatnak sok fals pozitív mutációt az ilyen elven működő, tumorgenomok elemzésére fejlesztett eszközök. Ezt a problémát más bioinformatikusok is felismerték, és bizonyos programok esetén van lehetőség több normál minta egyidejű felhasználására. Teszteltük is példaként a MutTect2 program 'panel of normals' funkcióját, melyet izogenikus adatokon használva az IsoMuthoz hasonló szenzitivitás és specificitás érhető el, ámbar sokkal nagyobb gépidő-igénnyel. Az IsoMut precizitása tehát nem befolyásolja a tumormintákon más programmal nyert adatok validitását, hiszen az adattípus határozza meg a megfelelő mutációdetekciós program kiválasztását. Az IsoMutot teszteltük tumorgenomokon, és jól működik bizonyos speciális esetekben, de tumor-normál mintapárok elemzésére alapvetően nem alkalmas.

2. kérdés

Adataiban nem tér ki, illetve csak érintőlegesen a mutációk spektrumára genom topologia, kromatin környezet, transzkripció aktivitás, replikációs idő és hasonló szerkezeti, funkcionális jellemzőket tekintve. Készült erre vonatkozó elemzés pl. a citosztatikumokkal indukált mutációs spektrumok tekintetében? Ha igen, vannak megfigyelhető jellegzetességek?

Válasz: A disszertációban összefoglalt tanulmányokban csak kis mértékben vettük figyelembe a genom nagyobb léptékű, epigenetikai vagy funkcionális jellemzőit. A citosztatikumok vizsgálatánál figyelembe vettük a transzkripció hatását a mutagenézisre. Megmutattuk, hogy a génekben alacsonyabb a mutációk gyakorisága, mint az intergénikus szakaszokon, és a mutációsűrűség fordítottan arányos a génexpresszió szintjével. A cisplatin esetén megmutattuk, hogy génekben a nem átírt DNS szálra eső léziók gyakrabban vezetnek mutációhoz. Megfigyeléseink a transzkripcióhoz kapcsolt hibajavítás (TCR) szerepére utalnak a vizsgált DNS-károsító szerek mutagenikus hatásának elhárításában.

A közelmúltban azonban a kérdésben felvetett genomi tulajdonságok teljes tárházának vizsgálatát felvettük a repertoárunkba. Vizsgáljuk a citozin metiláció hatását egész genom biszulfid szekvenálással, a kromatinmódosítások szerepét ChIP-Seq adatok felhasználásával, a mutációk eloszlását a replikációs időnek megfelelően valamint a replikáció szálát tekintve, tágabb szekvenciakontextusokat, G-kvadruplex formáló szakaszok elhelyezkedését és egyéb genomi jellemzőket.

3. kérdés

Számomra ismételten nehézséget okoz a megfigyelt mutációs frekvencia - amit kísérletei alapján is irodalmi adatokkal összehangban 10 a mínusz tizediken per bp /sejtosztódás értékűnek talált – és daganatokban megjelenő egyes driver mutációk gyakorisága közötti összefüggés közvetlen megteremtése. Tudna segíteni annak a tapasztalati ténynek a molekuláris értelmezésében, hogy léteznek tumorokra jellemző gyakori driver mutációk?

Válasz: Ha feltételezünk egy gyakori onkogén driver mutációt, amely egy adott tumortípus 20%-ában jelen van és ez a tumortípus az emberek 5%-ában alakul ki, akkor kb. 10^8 sejtosztódásra van szüksége a spontán mutagenézisnek a kérdéses bázissubsztitúció kialakításához. A szövetet felépítő sejteknek az élet során tipikusan minimum 50 osztódáson kell átesnie (Derényi & Szöllősi, 2017, Nat Commun 8, 14545), tehát egy kb. 2 millió őssejttel rendelkező szövetben várható a megfigyelt driver mutáció kialakulása. Ez nem egy

elképzелhetetlenül nagy szám, például a vastagbélhámiban kb. 10 millió mirigy (kripta) helyezkedik el, és mindegyikben van legalább egy összejt.

A számítás azonban többféle irányban is módosításra szorul. Csökkenti a daganat kialakulásának az esélyét, hogy nem csak egy driver mutációra van szükség, hanem tipikusan legalább háromra (Tomasetti et al., 2015, PNAS 112, 118-123). Növeli viszont a daganat kialakulásának az esélyét, hogy egy adott szövetben a spontán mutációs rátánál egy-két nagyságrenddel több mutáció is kialakulhat környezeti hatások következtében, illetve hogy a tumor szupresszor génekben bekövetkező driver mutációk sok különböző genomi pozíciót is céllozhatnak.

Összességében a szükséges számítások túl sok bizonytalan tényezőt tartalmaznak, azonban számomra reális az ismert mutációs ráták mellett a daganatok megfigyelt kialakulása.

Ismételten köszönöm Dr. Boros Imre bírálatát és értekezésem elfogadását támogató véleményét. Bízom benne, hogy a kérdéseire adott válaszaimat is megfelelőnek találja.



Dr. Szüts Dávid

Budapest, 2021.04.29.