

Válasz Dr. Haracska Lajos, az MTA doktora bírálatára

Hálasan köszönöm Dr. Haracska Lajosnak 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 jelölt kutatócsoportjában kifejlesztett ún. IsoMut bioinformatikai szoftver kényelmesen használható izogenikus minták pontmutációinak és rövid deléciók és inszerciók detektálására, viszont nem alkalmas nagyobb kromoszómális elváltozások, mikroszatellita instabilitás és kópiaszám-változások követésére. A pontmutációkon felül ez utóbbik is jelentős szereppel bírnak a mutagenézis folyamatában és tanulmányozásukat elősegítené egy IsoMut-hoz hasonlóan könnyen kezelhető bioinformatikai eszköz. Lát-e arra igényt és lehetőséget, hogy egy ilyen, kifejezetten izogenikus genomok összehasonlító elemzésére alkalmas bioinformatikai eszköz is elkészüljön, mely esetleg az IsoMut-tal integrált formában tudna működni?

Válasz: Az IsoMut hatékonyan észleli a rövid ismétlődő szakaszokban keletkező inzerciókat és deléciókat, azaz a mikroszatellita instabilitást, amennyiben az adott genomi helyre a szekvenálás leolvasásai jól illeszthetők. Ennek megfelelően a dolgozatban bemutatott tanulmányban megmutattuk, hogy mismatch repair deficiens MSH2 mutáns DT40 sejtekben nagyon nagy gyakorisággal keletkeznek egy-két bázispáros deléciók ismétlődő szakaszokban (Németh et al., 2020, DNA Repair 89, 102827).

A nagyléptékű átrendeződések, strukturális variációk azonosítására sok bioinformatikai eszközt fejlesztettek. Ezek jellemzően mintapárokkal dolgoznak, azaz nem képesek figyelembe venni egyszerre sok izogenikus mintát. Mi is ilyen programokat használunk, korábban a CREST, az utóbbi időben a GRIDSS szoftvert. Ezek sok fals pozitív eseményt adnak ki, amelyeket az IsoMut elve szerinti utószűrésnek vetünk alá, tehát például kizárunk olyan eseményeket, amelyeket több mintában is támogatnak readek. Egyetértek, hogy hasznos lenne az efféle utószűrést és egyéb szűrési lehetőségeket beépíteni egy strukturális variációkat azonosító bioinformatikai eszközbe.

2. kérdés

Korábban alkalmazott mutagenézis riporterrendszerek alkalmazásával feltárt adott génfunkciókhoz és DNS-károsító ágensekhez köthető mutációs mintázatok mekkora korrelációt mutatnak a dolgozatban alkalmazott genomikai megközelítéssel feltárt eredményekkel – mi az, amit el kell vetnünk és mi az, amit megtarthatunk a korábbi vizsgálatok eredményeiből? Legalább elővizsgálati szinten érdemes-e tovább alkalmazni a mutagenézis riporterrendszereket, vagy a genomikai megközelítések – különösen mivel a vizsgálat ára folyamatosan csökken – várhatóan teljesen kiszorítják majd a korábbi vizsgálati módszereket?

Válasz: A mutagenézis riporterrendszerek alapvetően egy riportergén expressziójának elvesztését vagy egy inaktiváló mutáció reverzióját jelző megjelenését mérik (forward, illetve reverz esszék). Az ilyen esszék kiválóan alkalmasak mutációs ráták összehasonlító mérésére. A forward mutagenézis esszék a mutációs spektrumok meghatározására is alkalmasak. Példakén a cisplatin (Louro et al., 2002, Environ Mol Mutagen 40, 283-291) és az ultraibolya sugárzás (Pfeifer et al., 2005, Mutation Res 571, 19-31) esetében is hasonló mutációs spektrumokat határoztak meg egér sejtekben riporter esszék segítségével, mint amelyeket később humán sejtvonalak genomszekvenálásával mértek. A forward riporter esszék limitációi közé tartozik, hogy (1) csak funkcióvesztéses mutációkat észlelnek, amely torzíthatja a mutációs spektrumot, (2) gyakran csak aktív génszakaszban vizsgálják a mutációkat, pedig a DNS-hibajavítás különbözik az átírt és nem átírt genomi régiókban, bár ennek a problémának az elkerülésére léteznek megoldások, (3) gyakran nem releváns organizmust használnak, például Ames tesztel *Salmonella typhimurium* baktériumokban vizsgálják humán gyógyszerhatóanyagok mutagenitását.

Összefoglalásul tehát véleményem szerint a riporterrendszerek továbbra is érvényesek és alkalmazhatók. A genomszekvenálás alapú mutációdetektáláshoz az áttörést az újgenerációs szekvenálás szolgáltatta, melyet megfelelő tervezés esetén riporterrendszerekben is lehet alkalmazni, megsokszorozva áteresztőképességüket és növelve a meghatározott mutációs spektrumok pontosságát.

3. kérdés

Meglepő az a következtetésük, hogy a PCNA poliubikvitilációja nem szükséges a hibatoleranciához. Mennyire mutat egyezést és mennyire különbözik ez a következtetés más kísérleti rendszerekben kapott eredményektől és a különbségeknek mi lehet az oka? Lehet-e ez

a megfigyelés DT-40 sejtvonalra specifikus, és ha igen, akkor mennyire megfelelő ez a sejtvonal az adott hibatolerancia útvonal feltérképezésére?

Válasz: Megfigyelésünk határozottan eltér a *Saccharomyces pombe* élesztő vizsgálatával kapott eredményektől, ugyanis élesztőben egyértelműen megmutatták a PCNA poliubikvitiláció szerepét a templátváltásban, amint ezt a dolgozatban is idéztem. Magasabb eukariótákban azonban nem sikerült közvetlenül megmutatni a PCNA poliubikvitiláció szerepét élő sejtekben. A PCNA poliubikvitilációt katalizálni képes HLTf és SHPRH ubikvitin ligázok csendesítése a spontán mutagenézis részleges emelkedését mutatta humán Ramos B sejtekben (Motegi et al., 2008, PNAS 105, 12411-12416), azonban mindkét fehérjének kimutatták a szerepét a transzlációs szintézis szabályozásában is, tehát ezek a hatások nem köthetők egyértelműen a templátváltás csökkenéséhez. Qin és munkatársai humán 293 sejtekben vad típusú PCNA háttérben expresszáltak PCNA-ubikvitin fúziós fehérjét, amely számottevően csökkentette a sejtek érzékenységét ultraibolya sugárzásra. A megfigyelt hibatolerancia azonban teljes mértékben REV1-függőnek bizonyult, így a PCNA ubikvitilációhoz a DT40-ben végzett kísérletekhez hasonlóan itt is csak a transzlációs szintézis szabályozását sikerült kötni (Qin et al., 2013, Nucleic Acids Res. 15, 7356-7369).

A DT40 sejtvonal annyiban nem modellezi tökéletesen a humán sejteket, hogy a madarak genomjában nincsen HLTf ortológ gén. Egyéb fontos eltérést azonban egyelőre nem láttunk a PCNA ubikvitiláció szempontjából. Valószínűnek tartom, hogy magasabb eukariótákban is van szerepe a PCNA poliubikvitilációnak a genomstabilitásban. Ez megfelelő körülmények között vagy genetikai háttérben esetleg jobban észlelhető; folytatunk ezirányú kutatásokat.

4. kérdés

HR gének hiányában fellépő mutagenikus folyamatok részletes feltérképezésre kerültek az értekezésben. Meglepő, hogy számos HR gén deficienciája jóval kisebb PARP inhibitor érzékenységet mutat, mint a BRCA1/2 gének deficienciája. Használható-e ez a megfigyelés a klinikai alkalmazhatóságán túl a hibajavító útvonalak térképezésére is? Például részt vehetnek-e a BRCA1/2 gének több útvonalban is, illetve adott vizsgált HR gének funkcióját más gének tudják-e helyettesíteni stb.?

Válasz: Egy évvel a tanulmányunk megjelenése után publikálták a TBCRC048 klinikai vizsgálat eredményeit, amely eredményeinkkel jó egyezésben azt találta, hogy a BRCA1, BRCA2 és PALB2 mutációkat hordozó emlődaganatok jól reagáltak PARP inhibitor (olaparib)

kezelésre, míg a CHEK2 és ATM mutációkat hordozó daganatok nem reagáltak (Tung et al., 2020, J Clin Oncol 38, 4274-4282) – a sejttenyészetes modellrendszerünk tehát jól prediktálta a klinikai vizsgálat eredményét. Emellett azonban valóban érdekes a fehérjék funkciójának szempontjából, hogy például a RAD51 paralóg génekben mutáns sejtvonalak miért mutatnak alacsonyabb érzékenységet PARP inhibitorokra, mint a BRCA1, BRCA2 és PALB2. A kielégítő válaszhoz további vizsgálatokra lesz szükség. Részleges magyarázatul szolgálhat bizonyos funkcionális redundancia a RAD51 paralógok között, vagy a RAD54 és a RAD54B között. Azonban mivel a RAD51 paralógok bázisszubsztitúciós fenotípusa megegyezett a BRCA1/2 és PALB2 fenotípusával, én is valószínűnek tartom, hogy a BRCA1/2 gének részt vesznek olyan útvonalban is, amelynek hiánya nem befolyásolja a bázisszubsztitúciókat, de szerepet játszik a PARP inhibitor érzékenységben.

5. kérdés

Kérem a jelöltet, összegezze véleményét, hogy az értekezésében bemutatott genomikai megközelítések milyen eséllyel kerülhetnek be a közeljövőben a rutin tumordiagnosztikába, és mire lehetne azokat biztosan felhasználni, illetve mennyiben vezethet hibás döntésekhez a rendelkezésre álló bioinformatikai eszköztár nem elég körültekintő használata.

Válasz: Véleményem szerint a tumorminták genomszekvenálása biztosan alapvető elemévé fog válni a tumordiagnosztikának. Jelenleg is számos olyan diagnosztikai tesztet alkalmaznak, amely a tumorsejtek genomi DNS-szekvenciáját elemzi. Ilyen bizonyos onkogének vagy tumor szupresszor gének szekvenciájának vizsgálata, kisebb vagy nagyobb génpanelek együttes vizsgálata, mikroszatellit instabilitás vizsgálata, teljes mutációs teher vizsgálata, genomi átrendeződések vizsgálata, kariotípus vizsgálata. A genomszekvenálás mindezeket a különböző technológiájú vizsgálatokat egy tételben elvégzi (az átrendeződéseket kivéve a teljes exom szekvenálása is megfelelő lehet). Bevezetésének visszatartó ereje egyrészt a már beállított és elfogadott vizsgálatok leváltásában rejlő tehetetlenség, másrészt az eljárás költsége. Valószínűleg további fejlődésre lesz szükség a szekvenálási technológiában ahhoz, hogy diagnosztikai eljárásként elfogadhatóak legyenek a költségek. Ráadásul a szekvenálási költségek további csökkenése mellett hamarosan a bioinformatikai elemzés válhat szűk keresztmetszetté mind anyagilag, mind kapacitást tekintve.

A genomszekvenálás a jelenleg alkalmazott tesztekhez képest extra információt is szolgáltat, elsősorban a dolgozatomban tárgyalt mutációs mintázatok tekintetében, amelyek szintén

felhasználhatók diagnosztikus célokra. Minden lehetséges molekuláris vizsgálatot azonban nem vált ki, például nem ad információt a génexpresszióról. A tumor heterogenitása is fontos prediktora lehet a daganat további evolúciójának, de erről egy szövetminta genomszekvenálása nagyon kevés információt képes nyújtani, és az eredmény nagyban függ a mintavételi módszertől.

A felhasznált bioinformatikai eszközök folyamatos fejlesztés alatt állnak, de a módszerek jól automatizálhatók, így véleményem szerint elvárhatók lesznek a megbízható eredmények. Óvatosságra inkább az eredmények értelmezésében van szükség. Már említettem a tumor heterogenitását, melynek következtében a vizsgált minta nem feltétlenül reprezentatív. Szintén fontos figyelembe venni, hogy a genomszekvenálás csak a tumor klonális vagy enyhén szubklonális genomi tulajdonságait képes észlelni, amelyek valamely múltbeli időszakban rögzültek. Ez nem probléma egy génmutáció esetén, de mutációs mintázatok tekintetében elképzelhető, hogy a daganat mutátor fenotípusa megváltozott, és a mintavételkor már nem áll fenn, de a korábban kialakult mutációk továbbra is észlelhetők. Például egy BRCA1/2 mutációt hordozó tumorban megjelenhet egy szupresszor mutáció egy másik génben, amely visszaállítja a normálishoz közeli mutációs folyamatokat és csökkentheti a célzott kezelésekre mutatott érzékenységet. Ilyen esetben a mutációs mintázat fals pozitív prediktora lenne az érzékenységnak. Az efféle problémákat legjobban a konkrét molekuláris mechanizmusok megismerésével lehet kiküszöbölni.

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



Dr. Szüts Dávid

Budapest, 2021.04.29.