

## Válasz Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora bírálatára

Hálásan köszönöm Dr. Szabó Gábornak 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 bioinformatikai eszköztár elemei között saját fejlesztésű, a versenytársakhoz képest sokkal hatékonyabb mutációkeresési algoritmust is kidolgoztak, tekintve előbbieik 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?

**Válasz:** A módszerünk alapvető új eleme a páronkénti összehasonlítás helyett a nagyszámú genomi minta együttes elemzése, amely lehetővé teszi az egyedi mintákban jelen levő szignál (mutációk) hatékony elkülönítését a tipikusan több mintában jelen levő, szisztematikus zajtól (illesztési hibák, szekvencia-polimorfizmusok). Ugyanez a megközelítés később más bioinformatikai eszközökben is megjelent, tehát nem állítom, hogy csak az IsoMut segítségével lehet pontos mutációdetektálást végezni. Maradt viszont egy fontos előnye az IsoMutnak, a sebessége, amely a számítás egyszerűségéből adódik. A program a mutáció megtalálásához egy egyszerű Fisher's exact tesztet végez minden pozícióban a referenciagenomtól legjobban eltérő és második legjobban eltérő minta read-számai között, és ezeknek a  $p$  értékeit használjuk a mutációsűrűség hangolásához. Bebizonyítottuk, hogy ez a módszer megfelelő szenzitivitással és specificitással rendelkezik, és ezért nincsen szükség komplexebb számításokra.

Az IsoMut csak az egy szekvencia-readen belül észlelhető mutációs eseményeket vizsgálja, így hatékonysága csökken a kb. 20 bp feletti inzerciók és deléciók esetében, és nem alkalmas a génátrendeződések észlelésére. Ezekhez más eszközöket használunk, amelyeket Dr. Haracska Lajos első kérdésére adott válaszomban említettem.

## 2. kérdés:

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?

**Válasz:** A checkpoint inaktiváció mellett a mutációs következmények hiánya valóban meglepő volt. A doxorubicin esetében leírtak ugyan kovalens kötést a guanin N2 atomjával, azonban a dolgozatban nem szereplő kísérleteink szerint a citotoxikus hatása egyértelműen a topoizomeráz II gátlásához köthető, kettős szál töréseket okozva. Elképzelhető, hogy a CHEK2 mutáns sejtek azért nem voltak érzékenyebbek az így indukált szál törésekre, mert a DT40 sejt vonal p53 mutáns. A mutációt nagyobb delécia okozza, tehát ez nem képes revertálni mutagenikus kezelések hatására. Így tehát a DT40 sejt vonal elsősorban a p53 mutáns daganatok modellezésére lehet alkalmas, az eredményeink klinikai relevanciáját eszerint lehet értelmezni. Érdekességgént említem, hogy a DT40 sejtek elpusztulnak, ha visszaállítjuk a p53 expressziót (Abe & Brnzei, 2014, DNA Repair 22, 153-164).

## 3. kérdés:

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

**Válasz:** Mindkét említett közleményben DT40 sejtek citotoxicitási vizsgálatát mutattuk be doxorubicinnel kapcsolatban. Az első tanulmányban 3-szoros, a másodikban 1,9-szeres megnövekedett érzékenységet mértünk a BRCA1<sup>-/-</sup> sejtekben a vad típushoz képest. Bár ezek az eredmények nem egyeznek pontosan, a tendencia hasonló, a BRCA1 mutáció enyhe érzékenységet okoz.

#### 4. kérdés:

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?

**Válasz:** Az említett kísérletekben egyórás metil-metánszulfonát (MMS) kezelést alkalmaztunk, öt óra utánkövetéssel. Az MMS adduktok (metilguanin és metiladenin) közvetlenül nem okoznak kettős száltörést (Lundin et al., 2005, Nucleic Acids Res. 33, 3799-3811). A fókuszokat nem mutató sejtek a kísérlet ideje alatt feltehetőleg nem voltak a sejtciklus S fázisában, azaz nem zajlott bennük DNS-replikáció, melynek elakadása és a replikációs villa esetleges összeomlása vezethet a H2AX foszforilációjához, a  $\gamma$ -H2AX fókuszok megjelenéséhez.

#### 5. kérdés:

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

**Válasz:** A mutációs hot-spotok lehetőségét rendszeresen vizsgáltuk, de egyetlen sejtvonal vagy kezelés esetében sem találtunk arra utaló jelet, hogy független mintákban a véletlenül várhatónál gyakrabban kerültek volna egymás közelébe mutációk.

#### 6. kérdés:

Meglepőnek találtam, hogy ICL-ekre utaló mutációs mintázatot nem talált. A Fanconi anemia 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 következtetést, miszerint az ICL-eknek ne lenne szerepe a citotoxicitásban, túlzónak vagy elhamarkodottnak érzem.

**Válasz:** A ciszplatin által okozott DNS adduktoknak csak 2-3%-a szálak közötti keresztkötés, (ICL), míg a többségük szálon belüli keresztkötés (Eastman, 1986, Biochemistry 25, 3912-3915). Így számomra nem meglepő, hogy a mutációs mintázatot is a szálon belüli GG és AG

keresztkötött dinukleotidoknál keletkező mutációk dominálják. A citotoxicitásban azonban lényeges szerepe lehet a replikációt mindenképpen akadályozó ICL-eknek, amint azt a dolgozatban is írtam: „bár a szálak közötti, ritka keresztkötéseknek komoly szerepe lehet a ciszplatin citotoxikus hatásában, a mutagenikus hatást szinte kizárólag a szálon belüli, gyakori keresztkötések okozzák”. Egy 2021-ben megjelent tanulmányunkban részletesebben elemeztük a platinaalapú kemoterápiás vegyületek toxikus és mutagenikus hatásának összefüggéseit (Szikriszt et al., 2021, Mutagenesis, *in press*).

## **7. kérdés:**

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?

**Válasz:** Két okot tudok elképzelni a chromothripsis hiányára a kísérleti mintákban. Egyrészt egy-egy kezelésből tipikusan csak három mintát szekvenáltunk, és a chromothripsis ennél ritkább lehet. Másrészt elképzelhető, hogy bizonyos sejttípusok rosszul tolerálják a genomi átrendeződéseket. Citotoxikus kezelésekre a DT40 sejtvonalat, illetve a közelmúltban a humán TK6 sejtvonalat használtuk. Mindkettő B limfocita eredetű, közel normális kariotípusú sejtvonal. A B sejt eredetű limfómákra jellemző a genomi átrendeződések alacsony szintje, így elképzelhető, hogy sejtes modelljeinkben a chromothripsisen átesett sejtek elpusztultak.

## **8. kérdés:**

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 festékhígítási proliferációs esszében a nem osztódó populációt szortolva megnézni a mutációkat a nem osztódó sejtekben is.

**Válasz:** A sejtvonalakon alapuló szekvenálás esetében a mintaelőkészítéshez egy sejtklont növesztettünk fel, majd a lehető leghamarabb izoláltuk a genomi DNS-t. Az eredeti sejtben jelenlevő mutációk klonálisak, tehát tipikusan a heterozigóta állapot miatt 1/2-es allélfrekvenciával jelentkeztek a populáció genomjában. A később keletkezett mutációk allélfrekvenciája minden sejtosztódás után feleződik, így ezeket nem detektáltuk. Az

azonosított mutációk allélfrekvencia-eloszlását fontos minőségellenőrzési lépésként használtuk, és a sejtvonalakban azonosított mutációk valóban klonálisak voltak, tehát a klónozás után keletkezett mutációkat nem észleltük.

## 9. kérdés:

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 diszkrepanciáknak az oka? Folytatva az összevetést a Cellminer adatbázissal: a 63. o.-on a BLM és FANCA közül csak utóbbi expressziója esetében találtak érzékenyítést cisplatinra a triple-emlőrák sejtvonalakat összehasonlítva (pl. a GDSC-MGH-Sanger adatbázisban).

**Válasz:** A RAD52 esetében nem látok ellentmondást. A Cellminer adatai szerint az NCI60 sejtvonal-panelen igen gyengén korrelál a fehérje expressziója az etopozid érzékenységgel, és a sejtvonalas kísérleteinkben sem mértünk szignifikáns hiperérzékenységet a RAD52 mutánsokban. A RAD52-/- sejtvonal platinavegyületekre mutatott számottevő érzékenységet, és a Cellminer adatai szerint is szignifikáns a korreláció a RAD52 expresszió és a cisplatin érzékenység között, az alacsony expresszió társul a toxicitással.

A további diszkrepanciák részben a Cellminer megközelítéséből adódnak. Az adatok forrásául szolgáló sejtvonalak már valószínűleg nem modellezik jól a származásuknak megfelelő szövettípusokat, tulajdonságaik a tenyésztés során evolválódtak. A különböző sejtvonal-panellek összetétele is erősen befolyásolhatja az eredményt, például az általunk is vizsgált FANCI gén expressziója az egyik panel esetében pozitívan, másik panel esetében negatívan korrelál a cisplatin-toxicitással (bár egyik sem szignifikáns). Véleményem szerint az azonos tumortípus mintáin alapuló elemzések kevesebb változóval, megbízhatóbban mutatják a lényeges összefüggéseket, az izogenikus sejtvonal-párok pedig egyetlen változó hatását mutatják – igaz, nem teljesen fiziológiás körülmények között.

A génmutációk hatásának vizsgálatával pedig különösen óvatossá kell lenni. A BRCA1 és BRCA2 igen nagyméretű gének, így daganatokban gyakran található bennük mutáció. Ezeknek a mutációknak a túlnyomó többsége azonban nem driver mutáció, azaz nem változtatja meg lényegesen a fehérje működését. Ráadásul a tumor szupresszor hatás elvesztéséhez a sejtben levő összes kópiában funkcióvesztéses mutációnak kell lennie, és a szekvencia alapján ennek

a kritériumnak a teljesülése egyáltalán nem triviális, csak komplex elemzéssel prediktálható (Riaz et al., 2017, Nat Commun 8, 857).

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



Dr. Szüts Dávid

Budapest, 2021.04.29.