

Dr. Székvölgyi Lóránt

„Új dimenziók a genomszerkezet kutatásban”

című MTA doktori értekezésének bírálata

Készítette: Dr. Szüts Dávid

A téma jelentősége

Dr. Székvölgyi Lóránt doktori disszertációjában az utóbbi tizenöt évben kisebb részben Franciaországban, nagyobb részben Magyarországon végzett tudományos munkája eredményeit foglalja össze. Tizenkét megjelent közlemény képezi a dolgozat alapját, melyekben négy esetben ő az első szerző, hét esetben pedig a senior szerző. A közlemények közül több a tudomány legrangosabb folyóirataiban jelent meg, mely jól tükrözi a bemutatott kutatás magas színvonalát – itt kiemelendők a megosztott első szerzős *Science* (2013), valamint senior szerzős *Genome Research* (2017) és *Nature Communications* (2022) közlemények. Az utóbbi években megjelent közlemények kiterjedt hazai szerzőgárdával rendelkeznek, amely mutatja a Székvölgyi Lóránt által felállított tudományos műhely sikerét.

A dolgozat tárgya a genom szerkezet-funkció összefüggéseinek vizsgálata két különböző területen. A meiotikus rekombináció pontos szabályozása kritikus fontosságú a sikeres meiózis szempontjából, azonban a rekombinációt indító kettős DNS száltörések kialakításáért felelős folyamatok csak részben voltak ismertek. A bemutatott eredmények lényeges előrelépést jelentettek különféle kromatin módosításoknak, valamint az ezekért felelős vagy ezekhez kötő fehérjéknek a rekombináció iniciációjában betöltött szerepe megértésében. A genom 'DNS-en felüli' struktúrájának másik fontos eleme a DNS-RNS hibrid szakaszok, úgynevezett R-hurkok kialakulása. Az R-hurkok azonosítása és feltérképezése lényeges új aspektusát tárja fel a genom stabilitásának és funkcionális működésének. A dolgozatban bemutatott munka metodikusan építkezve, nagy precizitással vizsgálta az R-hurkok biológiáját és kereste klinikai relevanciájukat a rákos megbetegedések lefolyásának és kezelésének területén. Összességében, Székvölgyi Lóránt kutatása a genom szerkezeti és funkcionális aspektusainak legidősebb tudományos kérdéseiben ért el számottevő előrelépést.

A dolgozat formai értékelése

A dolgozat szöveges része kb. 90 oldal terjedelmű, mely 3 táblázatot és 53 ábrát is tartalmaz. A disszertáció hagyományos felépítésű: 24 oldal bevezetés, 2 oldal célkitűzések, 16 oldal részletes anyagok és módszerek, valamint 40 oldal eredmények és megvitatásuk fejezetet tartalmaz.

A szöveg igényes, kisebb hibák is alig találhatók benne (például a 15. oldalon az „Srs1/BLM” helyesen Sgs1/BLM). Kiváló magyar tudományos nyelvhasználatot mutat, gondosan alkalmazott magyar kifejezésekkel úgy a módszerek (pl. pulzáltatott erőterű gélelektroforézis, fluoreszcencia-visszatérés fotoelhalványodás után), mint a tudományos koncepciók (pl. lefüzött hurok-tengely) területén. A rövidítések esetében nagyrészt az ismert angol verziókkal találkozhatunk, amely önmagában hasznos, de helyenként nem magától értetődő a magyar feloldással való kapcsolat azonosítása.

Megjegyzések az értekezéssel kapcsolatban

A dolgozat első fejezete egy kiváló, tiszta, érthető, informatív, olvasmányos bevezetés a kromatin tulajdonságaiba. Kitér a kromatin szerkezeti felépítésére, alkotóelemeire, módosításaira, valamint mindezek szerepére a génexpresszió szabályozásában. Bemutatja továbbá az R-hurkok gyorsan fejlődő tudományterületét, és kapcsolatukat a homológ rekombinációhoz. Külön ismerteti a kromatin vizsgálatának főbb módszereit, amely jó háttérrel biztosít saját módszerfejlesztési eredményeinek bemutatásához.

A munka több merőben különböző kísérleti modellrendszer is felhasznált, úgymint a *Saccharomyces cerevisiae* élesztő, *Arabidopsis thaliana* lúdfű, valamint humán sejttenyészetek. A részletes módszerleírásokat több publikált tanulmány eredményinek ábrákkal illusztrált ismertetése követi. Általában rendkívül igényesen, több módszerrel is vizsgált egy-egy jelenséget, és az eredmények tipikusan igen meggyőzően összeváltak (itt példaként említhetők az Spp1 lokalizációját és mobilitását vizsgáló kompetíciós és FRAP kísérletek). Az eredmények leírása jól összefűzi a külön megjelent tanulmányokat, azonban a disszertáció alapját képző közlemények közül az indolamin-2,3-dioxigenáz tumorbiológiában betöltött szerepét ismertető összefoglaló tanulmányra nem támaszkodik.

Új tudományos eredmények

Az értekezésben részletezett kutatások új fő tudományos eredményeinek a következőket tartom:

1. Részletesen feltárta a Set1C hiszton metiláz komplex, valamint annak Spp1 alegysége szerepét a meiotikus rekombináció mechanizmusában.
2. Leírta a H3 hisztonfehérje lizin 56 acetilációjának szerepét a meiotikus rekombináció finomhangolásában.
3. Fejlesztést hajtott végre a DNS-RNS hibrid 'R-hurkok' azonosításának és genomi térképezésének területén.
4. Megmutatta az NDX fehérje növényi RNS-függő DNS metilációhoz kapcsolt szerepét a heterokromatin homeosztázisában.
5. Farmakogenomikai vizsgálatokkal megmutatta, hogy bizonyos humán R-hurok regulátor fehérjék expressziós szintje számos tumortípusban asszociációt mutat a túléléssel, valamint kihasználható lehet a tumorsejtek kemoterápiás kezelésekkkel szembeni érzékennyé tételére.

Kérdéseim

1. A kromoszóma tengelyfehérjék (Red1, Hop1 stb) csak meiózisban kolokalizálnak a DSB-javítás fehérjéivel, vagy rendelkeznek-e esetleg mitotikus funkcióval is? Avagy az aberráns expressziójuk tumorsejtekben hozzájárulhat-e mitotikus rekombinációhoz, amely például heterozigóta állapotvesztéshez vezethet?
2. A tethered loop-axis (lefűzött hurok-tengely) jelenségben a kettős száltörések valóban preferáltan szemben vannak a tengely kötőhellyel, vagy bárhol lehetnek a hurkon, csak nem az 'alján'?
3. Egy módszertani kérdés: mi az előnye a DRIVE-Seq és R-ChIP módszerekben történő RNázH1 pulldown-nak a DRIP-Seq immunoprecipitációval szemben?
4. Általános kérdésem, hogy tipikusan hányszor ismételték a ChIPseq méréseket, és hogyan kezelték az elemzésekben a variabilitást? Például az Spp1 és a Bre2 ChIP-seq csúcsok részleges elkülönülése ill. kolokalizációja mennyire volt reprodukálható?

5. A 25. ábrán az Spp1 klaszteranalízis esetében a megjelenő/kontans/eltűnő kategóriák hogyan voltak elkülönítve? A kategóriák megfelelnek hierarchikus klaszterhatároknak? Az eltűnőkön belül mintha két fő klaszter látszana, ezeknek lehet-e valami funkcionális jelentősége?
6. Mely egyéb fehérjék lehetnek a megfigyelt nagy (1765 kDa körüli) Spp1 komplexben? Lehet-e ezt a nagy méretet kromatinkötéssel magyarázni, a kromatin-kötött fehérjét nem az immobilis frakcióban váránk?
7. Mi lehet az oka, hogy a meiotikus DSB-k a H3K56 acetiláció hiányában (*asf1* mutáns) és megnövelt szintje mellett (*hst3/4* mutáns) egyaránt és hasonlóan kevésbé tűnnek el? Miért lehet továbbá, hogy a HIS4-LEU2 konstrukcióban nem csökkentek a DSB-k az *asf1* mutánsban, míg egy endogén lókuszban harmadára csökkentek a H3K56A mutánsban? Tesztelték-e a DSB szint változását azonos lókuszban a különböző mutációk mellett?
8. Az irodalomban alkalmazott és lehetséges DRIP protokollok hatékonyságának (szenzitivitás és specifitás) módszeres összehasonlításakor mi biztosította, hogy jó a tréning szett? Ha jól értem, ez saját DRIP-Seq adatokra támaszkodott, de azok melyik protokollal készültek? Ez nem befolyásolta a protokollok értékelését?
9. A növényi RNS-mediált DNS metiláció esetében mennyire sokfélék a PolIV/RDR2 és Dicer által termelt célzó siRNS-ek? Célpontjaik a PolIV transzkriptek többségében megtalálhatók, vagy nem?
10. Említi, hogy *Arabidopsis* kísérleteikben “az R-hurok szint mérsékelt növekedését valószínűleg az NDX mutáció indirekt hatása okozza”. Ez azt jelenti, hogy kísérleteik nem validálták a Sun et al. (2013)-féle megfigyelést, miszerint az NDX egy R-hurok stabilizálásán keresztül szabályozza a COOLAIR nem kódoló RNS kifejeződését? És szabályozhat-e bármi más R-hurok kötésén keresztül?
11. A Kaplan-Meier görbék nagy betegszám esetén igen gyakran mutatnak szignifikánsnak tekintett p értékeket. Kérdésem, hogy vizsgálták-e, vajon az R-hurok kötő fehérjék génjeinek expressziója gyakrabban mutat-e szignifikáns túlélési hatást, mint más géncsoportok, ideértve akár véletlenszerűen választott, tumorban expresszálandó humán géneket? Hogyan kezelték a többszörös összehasonlításból adódó egyes típusú statisztikai hibákat?

12. A farmakogenomikai elemzések esetén láttak-e szövettípus szerinti korrelációt a vizsgált R-hurok regulátor gének sejtenyészetes drogérzékenységi asszociációi, valamint daganatos túlélési asszociációi között? Más szóval, látszik-e, hogy a különböző szövettípusokból származó sejtvonalak specifikusan modellezik az adott szöveti daganatokat?

Összegzés

Székvölgyi Lóránt egy rendkívüli igényességgel elkészített, egyedi módszerfejlesztéseken alapuló, nemzetközi visszhangot kiváltó eredményeket tartalmazó doktori értekezést nyújtott be. Különösen jelentősnek tartom, hogy munkája alapot teremtett a kromatin strukturális és funkcionális tulajdonságainak sokszintű vizsgálatára. Mindezek alapján javaslom az értekezés nyilvános vitára bocsátását és a doktori cím odaítélését.

Budapest, 2023. július 14.



Dr. Szüts Dávid

az MTA doktora