

Válasz Dr. Haracska Lajos opponensi véleményére

Hálásan köszönöm Dr. Haracska Lajosnak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát. Köszönöm az építő megjegyzéseket, a kérdéseket, valamint azt, hogy az elért eredmények alapján alkalmasnak tart az MTA doktora cím odaítélésére.

A bírálatban feltett kérdésekre az alábbi válaszokat adom:

Kérdés 1. *A rekombinációs projekt kapcsán van-e arra bizonyíték, hogy a Mer2 az egyetlen kapcsolódási pont a hiszton metilációt közvetítő Spp1 és a kettős szálú törést katalizáló Spo1 között? Létezhetnek-e más kapcsoló mechanizmusok is a hurok forrópontok és a kromatintengely között? Ennek kapcsán meglepő, hogy az Spp1 fizikai interakciós partnereinek az azonosítására kivitelezett élesztő kettős hibrid szűrés csak két szignifikáns találatot adott, a Set1-et (amely nem volt váratlan, hiszen az Spp1 a Set1-komplex része) és a Mer2 DSB fehérjét. Egyrészt váratlan, hogy a Set1 komplex többi tagja nem került azonosításra, másrészt ez felveti annak a lehetőségét, hogy a Mer2-n kívül esetleg más, kettős hibrid megközelítéssel nem azonosítható tengelyfehérje is szerepet játszhat.*

Válasz 1: A Mer2 fehérje oldaláról megközelítve a kérdést, a legújabb adatok alapján a Mer2 közvetlenül képes kötődni a nukleoszómális hisztonokhoz (Rousova *et al.* eLIFE 2020), amely önmagában is létrehozhat hurok-tengely kapcsolatokat a kromatin hurkokon található hiszton fehérjékkel. Ezek az Spp1-től független kihorgonyzások azonban feltehetően sztochasztikusak és sokkal instabilabbak az alapmechanizmusnak tekinthető, nagyaffinitású Spp1-Mer2 interakcióhoz képest. A fenti Mer2-hiszton kölcsönhatás alapján logikusan magyarázható az a megfigyelés, miszerint Spp1 hiányában is keletkeznek DNS törések, de jóval kisebb számban és véletlenszerű helyeken, mint vad típusú sejtekben (Szekvolgyi L *et al.* Cold Spring Harb Perspect Biol 2015). Egy másik tanulmány genetikai kölcsönhatást (szintetikus letalitást) mutatott ki a MER2 és a transzkripció elongációjában és terminációjában szerepet játszó PAFIC komplex között (Zhang Y *et al.* IJMS 2020). Ez arra utal, hogy az elongálódó RNS polimeráz szerepet játszhat a DSB képződésében a meiózis során, amely függ a Mer2-től, de független az Spp1-től. Az Spp1 oldaláról közelítve a kérdést, egy 2018-as tanulmány az általunk publikált élesztő kéthibrid módszertől eltérő eljárással, TAP-tag IP/MS technikával azonosította az Spp1 interakciós partnereit (Adam C *et al.* Plos Genet 2018). Ez alapján az Spp1-TAP nemcsak a Set1-el, hanem a Set1-komplex összes tagjával kölcsönhatásba lépett (Bre2, Sdc1, Spp1, Set1, Swd1, Swd2, Swd3, Shg1), összhangban az opponensi megjegyzéssel. Ez egy lényeges eltérés

a korábbi tanulmányunkhoz képest; a különbség oka feltehetően metodikai jellegű. Viszont az új tanulmány teljes mértékben megerősítette a kulcs felfedezésünket, nevezetesen az Spp1-Mer2 interakciót meiotikus sejtekben, amely a hurok-tengely kapcsolat fizikai alapját képezi. A felsoroltakon kívül nem volt más fehérje, amely szignifikáns fehérje-fehérje interakciót mutatott az Spp1-el.

***Kérdés 2.** Az Spp1 kromatinkötődési dinamikájának vizsgálata azt mutatta, hogy az Spp1 nem minden esetben a Set1C hiszton metiláz komplex részeként fejt ki hatását, hanem – különösen a rekombináció során – a Set1C-ről leválva, attól függetlenül működik. Kérdésként merül fel, hogy az Spp1 Set1C-függő (általános) biológiai funkciója mennyiben különbözik a rekombinációban betöltött szerepétől –, esetleg az általános funkciója során is szereppel bír a különböző DNS-hurkok dinamikájának változtatásában, és ha igen, akkor milyen mechanizmust tart a jelölt elképzelhetőnek erre vonatkozólag?*

Válasz 2: Az Spp1 szerepe a DNS-hurkok dinamikájában lényegében ismeretlen. Azt lehetne vizsgálni például genomkonformáció leképezés alapú módszerekkel (Hi-C), amelyre kutatócsoportunk tett is kísérletet. Vad típusú sejtekben és különféle Spp1 hiánymutánsokban kapott előzetes eredményeink visszaigazolták az Spp1-függő kromatin interakciókat meiózisban; mindemellett úgy tűnik, hogy az Spp1-nek nincs globális hatása a kromoszóma térszerkezetre (mint pl. egy kohézinak vagy CTCF-nek), inkább lokálisan hat egy-egy rekombinációs forrópont közelében. Az Spp1 Set1-komplextől független szerepéről a közelmúltban derült ki, hogy - a meiotikus rekombinációra kifejtett hatása mellett - fontos funkciója van a DNS replikációban. Az Spp1 H3K4me3 író funkciója révén képes helyreállítani a replikációs villa mögötti nukleoszómákon a H3K4 trimetilációs jelet, olvasó funkciója révén pedig ide rögzíti a Set1C komplex tagjait (Serra-Cardona A *et al.* Science Adv 2022). A replikációs villa (patológiás) megállásakor pedig az Spp1 felhalmozódik a villa mögötti H3K4 trimetilált nukleoszómákon, amely akadályozza az Exo1 exonukleáz bekötődését és a ssDNS felhalmozódását, ezzel védi a genom stabilitását (Ghaddar N. *et al.* Research Square 2022). A fenti Spp1-mediált mechanizmusok függetlenek a Set1-komplex többi tagjától. A Set1-komplexnek szintén van egy Spp1-től független „önálló” biológiai szerepe, nevezetesen, az epigenetikus transzkripció memória kialakítása bizonyos gének területén (D’Urso, A. *et al.* eLife (2016). A fenti folyamatok nagy valószínűséggel együtt járnak a térbeli genomszerkezet szignifikáns változásaival (pl. gén hurkok, kromatin hurkok megjelenése/eltűnése révén), azonban ezen 3D struktúrák azonosítása és az Spp1 szerepének tisztázása továbbra is bizonyításra vár.

Kérdés 3. *Technikai kérdés, hogy az R-hurkok azonosítása során lehet-e különbséget tenni a regulációs funkcióval bíró R-hurkok és az éppen transzkriptálódó DNS-en jelen lévő háromszálú RNS-DNS-struktúrák között. Esetleg az R-hurok genomi régiók mennyiségi összehasonlító elemzésével lehet-e korrelációt találni egyes régiók, gének transzkripciós aktivitására?*

Válasz 3: Minden R-hurok transzkripció által jön létre, függetlenül attól, hogy a transzkripció helyén (*cisz*) vagy attól távol (*transz*) fejtik ki hatásukat. Emiatt a kérdés megválaszolása komplex megközelítéseket igényel. Először is, az NGS kísérletekben megfigyelhető R-hurkok mennyiségi változását óvatosan kell értelmezni, mivel azok számos forrásból származhatnak. Közismert, hogy az R-hurkok kialakulása rendkívül érzékeny a transzkripció perturbációjára (pl. aktinomycin D vagy α -amanitin kezeléssel, esetleg kondicionális RNAP mutációkkal az R-hurok szint jelentősen csökkenthető), mivel többségük ko-transzkripciósan (a transzkripció melléktermékeként) keletkezik. Ezért az R-hurkok térképezésekor célszerű a naszcens transzkripciót is kvantifikálni (pl. párhuzamos GRO-seq mérésekkel), hogy megbízható következtetéseket vonjunk le a regulációs R-hurkok szerepéről. A különböző minták R-hurok profiljának összehasonlításához és kvantifikálásához kívánatos valamilyen *spike-in* kontroll használata, amely lehet egy ismert mennyiségű mesterséges RNS-DNS hibrid oligó (Crossley MP *et al.* NAR 2020) vagy egy távoli fajból származó RNS-DNS hibrid-tartalmú genomi DNS preparátum. A transzkripciós R-hurkok mellett léteznek regulatórikus szereppel bíró ko-transzkripciós R-hurkok is, amelyeket szinte lehetetlen megkülönböztetni a „sima” ko-transzkripciós R-hurkoktól. E struktúrákat létrehozhatja például egy DNS törésbe „belefutó” RNS polimeráz, amely a törés helyétől visszafordulva R-hurkot szintetizál, hogy meggátolja a transzkripció folytatását a DNS lézió környezetében (Lim G. *et al.* NAR 2023; Ohle C *et al.* Cell 2016). A genetikai perturbációk / génmutációk hatását is körültekintően kell értékelni. Nevezetesen, ha egy adott gén deléciója vagy csendesítése jelentősen megnöveli az R-hurok szintet, az önmagában nem bizonyítja, hogy ez a gén gátolja az R-hurkok képződését, mivel lehet, hogy csupán a naszcens transzkripciót fokozza, amely aztán magasabb ko-transzkripciós R-hurok szintet okoz. További R-hurok szint változást okozhat a sejtciklus megváltozása; mivel számos gén sejtciklus-vezérelt (köztük ismert R-hurok regulátorok), ezért várható, hogy az R-hurkok egy része sejtciklus-függőséget is mutat. A *cisz* R-hurkok mellett jóval kevesebbet tudunk a *transz* R-hurkok keletkezéséről és abundanciájáról, amelyek távoli genomi régiókhoz hibridizálva fejtik ki hatásukat. Egy közelmúltbeli tanulmány az *APOLO* lncRNS szerepét bizonyította transzkromoszómális R-hurkok létrehozásában, amely a PRC1 komplex aktivitását

szabályozza *Arabidopsis*-ban (Ariel, F. *et al.* Molecular Cell 2020). Élesztőben a Rad51 szerepét bizonyították *transz* R-hurkok létrehozásában (Wahba L *et al.* eLife 2013), amelyet később egy másik csoport megcáfolt (Lafuente-Barquero J *et al.* eLife 2020). Ezen ellentmondások is bizonyítják, hogy az R-hurok biológia számos aspektusa kiaknázatlan, a transzkripcióval való kapcsolata pedig további magyarázatra vár.

Kérdés 4. *Az R-hurok regulátor fehérjék farmakogenomikai vizsgálataihoz olyan regulátor gének kerültek kiválasztásra, amelyek a szakirodalom szerint valamilyen R-hurok asszociációval rendelkeztek. A kiválasztott fehérjék a potenciális R-hurok regulátor funkciójuk mellett bizonyítottan szerepet játszanak a rák más aspektusában is, mint pl. a DNS-hibajavítás, a splicing vagy a hisztonmodifikáció. Hogyan lehetne azt bizonyítani, hogy ezen gének génexpressziós értékei és a ráktúlélési adatok között talált korrelációk valóban az R-hurok regulátor funkcióknak tulajdoníthatók? Hasonló kérdés merül fel az R-hurok regulátorok gyógyszerkölsönhatás-vizsgálatai során is – mennyire lehetnek R-hurok-specifikus hatásúak ezek az inhibitorok?*

Válasz 4: Annak bizonyítására, hogy közvetlenül az R-hurkok (és nem pl. az ezzel összefüggő transzkripciós változások) felelősek ezekért a jelenségekért, *in vivo* RNáz H1 overexpressziót lehet alkalmazni, amely az R-hurok-szintet fiziológias szintre csökkenti a vizsgált tumorsejtekben. Ha az RNáz H1 komplementálja a genom instabilitás jelenségeit (pl. γ H2AX akkumuláció, DNS léziók, mutagenézis) és emellett hatással van a sejtsztódásra is, akkor valószínűleg R-hurok hatásról van szó. Emellett érdemes azt is vizsgálni, hogy az RNáz H1-szenzitív DNS léziók kizárólag a stabilizált R-hurkok felett alakulnak-e ki. Az időbeli és térbeli kolokalizáció tovább erősítheti az R-hurok regulátorok szerepét a tumorsejtek proliferációjában illetve gyógyszerkölsönhatásaiban.

Végezetül ismételtlen megköszönöm Opponensem rendkívül gondos bírálói munkáját, a befektetett figyelmet és energiát. Bízom benne, hogy válaszaimat megalapozottnak találja, amely alapján továbbra is támogatja a dolgozat nyilvános vitára bocsátását és az MTA doktora cím odaítélését.

Debrecen, 2023. augusztus 31.



Dr. Székvölgyi Lóránt