

Válasz Dr. Juhász Gábor opponensi véleményére

Tisztelettel köszönöm Dr. Juhász Gábor professzor úrnak, hogy elvállalta MTA doktori értekezésem bírálatát, annak értékelésére időt és energiát áldozott. Köszönöm a kutatómunkám iránti érdeklődését és a dolgozat tartalmával kapcsolatos észrevételeit. Az opponensi bírálatban feltett két kérdésre az alábbi válaszokat adom:

Kérdés 1. *Hogyan döntötték el az R-hurkok mennyiségi meghatározásánál, hogy hol húzódjon az észlelési határ (cutoff/threshold), például S9.6 anti-RNS-DNS hibrid antitesttel való jelölés esetén? Vizsgálták-e, hogy különböző küszöbértékek választása befolyásolja-e az eredményeket és így esetleg a következtetéseket is?*

Válasz: A ROC elemzésekben megállapított küszöbértékeket tisztán matematikai alapon határoztuk meg. Konkrétan, minden egyes ROC függvényre, vettük a ROC görbét tartalmazó egységnégyzet bal felső sarkától a ROC görbéig húzott legrövidebb egyenest, majd a metszési ponthoz tartozó DRIP score értéket küszöbértékként definiáltuk. A küszöbérték az a minimális DRIP enrichment score a qPCR mérésekben, amely a valós pozitív és valós negatív eseteket a legjobban elválasztja egymástól. Ez tisztán matematikai eljárás, amely során nem mérlegeltük, hogy pl. egy adott DRIP eljárásban előnyösebb lenne-e nagyobb szenzitivitást vagy specificitást elérni. Utóbbi rendkívül fontos lehet pl. a klinikai diagnosztikai teszteknel, ahol a minél nagyobb specificitás a preferált. Ezzel szemben, a DRIP eljárások értékelésére használt matematikai küszöbértékeket „manuálisan” semmilyen módon nem változtattuk meg, azokat pirossal kiemelve az alábbi táblázat tartalmazza (egyéb ROC statisztikákkal együtt), szemléltetésképpen.

DRIP classifier	AUC	DRIP enrichment score threshold	specificity	sensitivity	accuracy	TN	TP	FN	FP	NPV	PPV
exp1	62.8	3.6	60.7	76.5	0.7	17	13	4	11	81.0	54.2
exp2	66.7	23.9	80.0	66.7	0.8	8	2	1	2	88.9	50.0
exp3	63.8	19.9	57.1	70.6	0.6	16	12	5	12	76.2	50.0
exp4	63.3	1.9	50.0	100.0	0.6	5	3	0	5	100.0	37.5
exp5	75.6	2.3	66.7	78.6	0.7	16	11	3	8	84.2	57.9
exp6	80.0	12.1	80.0	100.0	0.8	8	3	0	2	100.0	60.0
exp7	65.2	4.6	62.5	71.4	0.7	15	10	4	9	78.9	52.6
exp8	76.7	9.9	70.0	100.0	0.8	7	3	0	3	100.0	50.0
exp9	85.5	4.2	75.0	88.2	0.8	21	15	2	7	91.3	68.2
exp10	80.0	22.7	90.0	66.7	0.8	9	2	1	1	90.0	66.7
exp11	61.7	25.9	64.3	52.9	0.6	18	9	8	10	69.2	47.4
exp12	63.3	0.7	50.0	100.0	0.6	5	3	0	5	100.0	37.5
exp13	82.7	2.2	70.8	78.6	0.7	17	11	3	7	85.0	61.1
exp14	76.7	8.4	70.0	100.0	0.8	7	3	0	3	100.0	50.0
exp15	73.5	3.5	62.5	78.6	0.7	15	11	3	9	83.3	55.0
exp16	63.3	8.9	70.0	66.7	0.7	7	2	1	3	87.5	40.0

exp17	72.9	1.6	66.7	69.2	0.7	14	9	4	7	77.8	56.2
exp18	79.2	2.6	75.0	66.7	0.7	6	4	2	2	75.0	66.7
exp19	77.3	2.0	71.4	76.9	0.7	15	10	3	6	83.3	62.5
exp20	64.6	1.1	75.0	66.7	0.7	6	4	2	2	75.0	66.7
exp21	62.5	1.3	50.0	83.3	0.6	4	5	1	4	80.0	55.6
exp22	57.3	1.3	62.5	50.0	0.6	5	3	3	3	62.5	50.0
exp23	41.7	5.2	62.5	50.0	0.6	5	3	3	3	62.5	50.0
exp24	64.6	1.0	75.0	66.7	0.7	6	4	2	2	75.0	66.7

Kérdés 2. A kitekintés a 35 év feletti anyák esetében megfigyelhető kromoszóma rendellenességek egyre gyakoribb megjelenését kapcsolatba hozza a bemutatott eredményekkel, ami megragadta a figyelmet. Nekem nem világos azonban, hogy ez hogyan függhet össze az R-hurkok előfordulási arányának és a hiszton metilációs mintázat változásával. Vannak erre utaló szakirodalmi adatok?

Válasz: A női életkor előrehaladtával gyors hanyatlásnak indul az egészséges petesejtek termelése és egyre nagyobb számban keletkeznek aneuploid petesejtek. E petesejtek a megtermékenyítés során aneuploid embriót hoznak létre, amely spontán vetéléshez vagy meddőséghez vezet. A fenti defektusok elsősorban a meiózis kapcsán fellépő hibás rekombinációra és kromoszóma szegregációra vezethetők vissza. Molekuláris mechanizmusok tekintetében hibás rekombinációt okozhat az R-hurkok felhalmozódása a DNS duplaszál törések környezetében, azonban erről rendkívül korlátozottak az ismereteink; szinte kizárólag modellorganizmusokban és többnyire mitotikus rendszerekben végzett kísérletekből rendelkezünk információval.

Az RNS-függő DNS rekombináció jelenségét 1991-ben írták le pékéesztőben (Derr L *et al.* Cell 1991), az RNS-DNS hibrid (R-hurok) struktúrák szerepét pedig Fischer Tamás csoportja igazolta kísérletesen, 2016-ban. Kimutatták, hogy a homológ rekombináció során tranziens R-hurkok keletkeznek a DSB-k mellett, amelyeket az RNS polimeráz II (RNAPII) szintetizál és az RNázH1 enzim távolít el (Ohle C *et al.* Cell 2016). Később kiderült, hogy a DSB-khez asszociált R-hurkokat az RNS polimeráz III (RNAPIII) is létre tudja hozni (Liu S *et al.* Cell 2021)) illetve más enzimek is képesek eltávolítani a törések mellől (például a SETX (senataxin), AOA2 (ataxin), Rad52; Davó-Martínez, C. *et al.* Nucleic Acids Res 2023; Ngo, G. *et al.* Nature Communications 2021; Becherel, O. J. *et al.* Cerebellum 2019; Yasuhara, T. *et al.* Cell 2018; Becherel, O. *et al.* Plos Genet 2013). Ha a fiziológias R-hurkok valamilyen okból perzisztálnak, jelenlétük patológiássá válik, mivel gátolják a DSB-javítási folyamatokat, illetve részt sem vesznek abban, mivel nem természetes szubsztrátjai a javítóenzimeknek. Utóbbi „javíthatatlan” meiotikus DSB-eket a közelmúltban írták le *C. elegans* oocitákban, amelyek az R-hurkok jelenléte miatt megkerülik az apoptotikus ellenőrzési pontokat (Hicks T *et al.* Nucleic Acids

Res 2022). Apoptózis hiányában az oociták törött kromoszómákkal folytatják a meiotikus programot, amely a csíravonal mutageneziséhez vezet. Más tanulmányok a MARF1 endoribonukleáz esszenciális szerepét igazolták az oogenezisben (Yao, Q. et al. PNAS 2018; Su, Y.Q. *et al.* Science 2012), az enzim R-hurok bontó képességét azonban nem vizsgálták (amely azonban valószínűsíthető). Spermatogenezisben a SETX (senataxin) RNS-DNS hibrid helikáz fehérje szerepe igazolódott a DNS törések processzálásában (Becherel, O.J. *et al.* 2019). A fenti tanulmányok alapján a DSB-khez asszociálódó R-hurkokra a meddőség különösen veszélyes forrásaként tekinthetünk, amely indokolttá teszi a széleskörű vizsgálatukat.

A DSB-hez kapcsolt R-hurkokhoz képest valamivel többet tudunk a hiszton metiláció és a női meddőség kapcsolatáról. Ismert például, hogy a hiszton metiláció jelentős mennyiségi változásokat mutat a reprodukív életkor függvényében (Mikwar M *et al.* Mut Res 2020), illetve patológiás körülmények között (Meister S *et al.* J Reprod Immun 2022). A hiszton metiltransferázok közül a PRDM9 alapvető az emlős meiotikus program végrehajtásában. A PRDM9-által katalizált H3K4 metiláció kijelöli a meiotikus rekombináció helyét, a gén inaktiválása esetén a DNS törések nem a megfelelő helyen és számban jönnek létre (pl. promoterek helyett kódoló szakaszokban); ez az oociták és spermaticiták apoptózisához vezet. Az egyik megoldatlan kérdés, hogy vajon mi okozza a PRDM9 kondicionális esszencialitását, tehát miért függ a fajtól, nemtől és az életkortól a PRDM9 termékenységre (meiózisra) kifejtett hatása? Emberben, egérben és kutyákban leírtak olyan eseteket, amikor *prdm9*^{-/-} nullmutáns genotípus mellett fertilis fenotípus jött létre. Mi lehet a szemifertilitás oka? Potenciális magyarázat lehet, hogy a PRDM9 különféle interakciós partnerekkel együttműködve fejt ki hatását, amelyek működésképtelensége bizonyos körülmények között befolyásolja a *prdm9*^{-/-} fenotípus penetranciáját. A közelmúltban leírt HELLS fehérje például „pioneer” faktorként a megfelelő helyre pozicionálja a PRDM9-et a kromatinon (Spruce C *et al.* Genes&Dev 2019), s HELLS hiányában nincs PRDM9 aktivitás. A nemek közötti különbséget okozhatják ivar-specifikus „modifier” gének, amelyek *prdm9*^{-/-} nullmutáció mellett képesek alternatív hiszton metilációs útvonalakat aktiválni, de csak az egyik nemben. Ilyen ivar-specifikus „modifier” gén nőtény egerekben a CHK2 (Powers NR et al. Science Adv 2020).

A fenti mechanizmusok csak a felszínt „karcolják”, azok minél teljesebb feltárása és humán kísérletekben történő validálása alapvető fontosságú a meddőség molekuláris alapjainak megértéséhez és az emberi populáció szaporodóképességének fenntartásához.

Referenciák:

Mikwar, M., MacFarlane, A. J. & Marchetti, F. Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 785, 108320 (2020).

- Meister, S. et al. Epigenetic changes occur in placentas of spontaneous and recurrent miscarriages. *Journal of Reproductive Immunology* 149, 103466 (2022).
- Spruce, C. et al. HELLS and PRDM9 form a pioneer complex to open chromatin at meiotic recombination hot spots. *Genes Dev.* 34, 398–412 (2020).
- Powers, N. R. et al. Sexual dimorphism in the meiotic requirement for PRDM9: A mammalian evolutionary safeguard. *Science Advances* 6, eabb6606 (2020).
- Becherel, O. J. et al. Senataxin Plays an Essential Role with DNA Damage Response Proteins in Meiotic Recombination and Gene Silencing. *PLOS Genetics* 9, e1003435 (2013).
- Becherel, O. J. et al. Disruption of Spermatogenesis and Infertility in Ataxia with Oculomotor Apraxia Type 2 (AOA2). *Cerebellum* 18, 448–456 (2019).
- Davó-Martínez, C. et al. Different SWI/SNF complexes coordinately promote R-loop- and RAD52-dependent transcription-coupled homologous recombination. *Nucleic Acids Research* gkad609 (2023)
doi:10.1093/nar/gkad609.
- Liu, S. et al. RNA polymerase III is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Cell* 184, 1–16 (2021).
- Yasuhara, T. et al. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. *Cell* 175, 558-570.e11 (2018).
- Ngo, G. H. P., Grimstead, J. W. & Baird, D. M. UPF1 promotes the formation of R loops to stimulate DNA double-strand break repair. *Nature Communications* 12, 1–15 (2021).
- Davó-Martínez, C. et al. Different SWI/SNF complexes coordinately promote R-loop- and RAD52-dependent transcription-coupled homologous recombination. *Nucleic Acids Research* gkad609 (2023)
doi:10.1093/nar/gkad609.
- Derr, L. K., Strathern, J. N. & Garfinkel, D. J. RNA-mediated recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* 67, 355–364 (1991).
- Hicks, T. et al. R-loop-induced irreparable DNA damage evades checkpoint detection in the *C. elegans* germline. *Nucleic Acids Research* 50, 8041–8059 (2022).
- Yao, Q. et al. Ribonuclease activity of MARF1 controls oocyte RNA homeostasis and genome integrity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 11250–11255 (2018).
- Su, Y.-Q. et al. MARF1 Regulates Essential Oogenic Processes in Mice. *Science* 335, 1496–1499 (2012).
- Ohle, C. et al. Transient RNA-DNA Hybrids are Required for Efficient Double-Strand Break Repair. *Cell* 167, 1001–1013 (2016).

Végezetül ismételtlen megköszönöm Opponensemnek a bírálat elkészítésébe fektetett gondos munkáját, és hogy az értekezés bírálata során méltatta a kutatási téma fontosságát. Bízom abban, hogy elfogadja válaszaimat s továbbra is támogatja a nyilvános vitára bocsátást és sikeres védelem esetén az MTA doktora cím odaítélését.

Debrecen, 2023. augusztus 31.



Dr. Székvölgyi Lóránt