

Válasz Dr. Szüts Dávid opponensi bírálatára

Tisztelettel köszönöm Opponensemnek az alapos munkát, amit munkásságom áttekintésébe és a doktori értekezésem bírálatába fektetett. Nagyrabecsülöm méltató szavait és a kritikai észrevételeit. A bírálatban feltett kérdéseket és megjegyzéseket a következőképpen válaszolom meg:

Megjegyzés. „A szöveg igényes, kisebb hibák is alig találhatók benne (például a 15. oldalon az „Srs1/BLM” helyesen Sgs1/BLM)”

Válasz: Ez valóban egy sajnálatos elírás, amely észrevételéért köszönettel tartozom.

Kérdés 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?*

Válasz 1: A meiózis első fázisához (meiózis I) speciális fehérjék kifejeződésére van szükség, amelyek levezénylik a genetikai rekombinációt és a homológ kromoszómák szegregációját. Ebbe a csoportba tartoznak a kromoszóma tengelyfehérjék (pl. Red1, Hop1), amelyek megfelelő időben és helyen jelennek meg a profázis I korai szakaszában. E jól körülhatárolt időbeli ablakon kívül a tengelyfehérjék egyáltalán nem expresszálódnak meiotikus sejtekben, mint ahogyan mitotikus sejtekben sem. A korai meiotikus fehérjék tehát mitotikus funkcióval nem rendelkeznek fiziológias körülmények között. Viszont bizonyos patológiás esetekben, például különféle daganatokban, megfigyelték a meiotikus fehérjék derepresszióját (pl. a HOP1 homológ HORMAD-ét), amely súlyosan veszélyezteti a genom stabilitását és a mitotikus sejtosztódás végrehajtását. Két kulcsfontosságú meiotikus fehérje, a Spo11 topoizomeráz és a Rec8 kohézin, forszírozott mitotikus expressziója például a kinetokorokok elvesztését okozta hasadó élesztőben és humán sejtekben, amely mitotikus rekombinációhoz, heterozigótaság elvesztéséhez, és a tumorokra jellemző kromoszóma instabilitáshoz vezetett (Hou Hajtong *et al.* Nature 2021). Elméleti síkon, a tumorokban kifejeződő meiotikus fehérjék gátlása új utat nyithat a tumorterápiákban – különösen, ha sikerül meggátolni a terápiás ágens bejutását az intenzív meiózist folytató csírvonalba; erre vonatkozó preklinikai és klinikai vizsgálatok azonban még nem állnak rendelkezésre.

Kérdés 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'?*

Válasz 2: A kromoszóma tengelyt, mint topológiai struktúrát, tipikusan a Rec8 meiotikus kohézinok pozíciója alapján definiálják, amely a meiózis I korai szakaszában az S fázis során expresszálódik, fő feladata a testvérkromatida kohézió kialakítása. Kromatin preparátumokon végzett mikroszkópos kolokalizációs vizsgálatokban megfigyelhető, hogy a Rec8-hoz különféle fehérjék kötődnek a DSB képződés előtt (pl. Red1, Zip1-3, Hop1, Mer2), amelyek együttesét kromoszóma tengelynek (vagy röviden „tengelynek”) hívjuk (Ziegler D and Kleckner N CSH Perspect Biol 2015). A Mer2 Cdc7/DDK-általi foszforilációja után (Murakami H & Keeney S Cell 2014) a tengelyhez további fehérjék kötődnek, köztük a Spo11 komplex (Spo11, Rec102, Rec104, Resc114, Ski8, Mei4, Mre11, Rad50, Xrs2), amely a DNS kettősszáltörések kialakítását végzi (Smith A & Roeder GS JCB 1997; Maleki S *et al* Chromosoma 2007; Lam I & Keeney S CSH Perspect Biol 2015). A mikroszkópos képeken ezenkívül jól definiálható a tengelyből kibomló kromatin hurkok tömege, amely azokat a DNS szekvenciákat hordozza, amelyeket a tengelyen lévő Spo11 komplex preferenciálisan elhasít (ún. DNS hotspot régiók; Blat *et al.* Cell 2002). A hagyományos fénymikroszkópos mérések azonban csupán annyit árulnak el a kromoszóma tengely és a DSB-k relatív helyzetéről, hogy azok antikolokalizálnak és külön kompartmentben vannak; nagyobb térbeli felbontás eléréséhez ChIP szekvenálási kísérletek szükségesek.

ChIP-seq kísérletekben statisztikai alapon meghatározták a kromatin hurkok helyzetét (a Rec8 és egyéb tengelyfehérjék átlagos genomi távolsága alapján), s e statisztikai hurkok pozitív korrelációt mutattak a Spo11 vágások (Spo11-oligok) pozíciójával (Blat *et al.*, Cell 2002; Panniza S *et al.* Cell 2011; Sun X *et al.* ELIFE 2015). A vágások szinte kizárólag nukleoszóma-mentes régiókban (NDR) történtek a hurkokon belül, amely hatékonyságát jelentősen növelte a H3K4me3 jelenléte (Borde V *et al.* EMBO J 2009; Pan J *et al.* Cell 2011; Tischfield A *et al.* Cell cycle 2012). A hurkokon belül tehát a H3K4me3-jelölt és nem-jelölt NDR-ek is elhasadnak, csak az előbbi jóval nagyobb gyakorisággal. Ennek feltételezett oka a Mer2-Spp1-H3K4me3-NDR térbeli interakció, amely kísérletes bizonyítása továbbra is megvalósításra vár. A kromoszóma tengely ezzel szemben DSB coldspot-ként viselkedik (Kougu K *et al.* Mol Biol Cell 2009; Pan J *et al.* Cell 2011), amelyre jóval kevesebb törés esik a véletlen eloszláshoz képest. Mi lehet ennek a biológiai jelentősége? A DSB végek rendkívül rekombinogének, amelyek javítását azonnal el kell végezni az intakt homológ DNS templátról. Mivel az apai és anyai homológ szakaszok mintegy „előillesztve” vannak a szinaptonémális komplex hurkain

belül, az nagyban elősegíti a gyors interhomológ rekombinációt a kromoszóma karokon. A kohézin kötőhelyek viszont elsősorban a testvérkromatidákat tartják össze a centromerikus régiókban, amelyek rekombinációja szigorúan gátolt meiotikus sejtekben (a jelenséget interhomológ torzításnak nevezzük; Schwacha and Kleckner 1997). A kromoszóma tengelyen ezért szinte egyáltalán nincs DSB képződés és nincs testvérkromatida rekombináció.

Kérdés 3. *Egy módszertani kérdés: mi az előnye a DRIVE-Seq és R-ChIP módszerekben történő RNázH1 pulldown-nak a DRIP-Seq immunoprecipitációval szemben?*

Válasz 3: Az R-ChIP módszerben V5 tag-el ellátott katalitikusan inaktív RNázH1 enzimet expresszálnak a megfelelő sejtvonalon, majd anti-V5 antitesttel immunprecipitálják az RNS-DNS hibrid tartalmú kromatin szakaszokat. A módszer előnye a DRIP-seq-hez képest, hogy az R-hurok detektálása formaldehid fixált sejtekből izolált kromatinból (és nem izolált DNS-en) történik, emiatt ez eredmény jobban tükrözi az *in vivo* állapotot. Hátránya, hogy minden egyes R-ChIP kísérlethez létre kell hozni a megfelelő stabilan transzfektált sejtvonalat, amely bizonyos sejtípusok esetén komplikált és időigényes lehet. Az RNáz H1 pozicionálásához egyéb fehérjék jelenléte szükséges (pl. RPA, Nguyen DH *et al.* Mol Cell 2017) és bizonyos R-hurok asszociált szakaszokat kevésbé ismer fel az RNáz H1 (pl. tRNS és rRNS kódoló szakaszokat), amely rontja az R-ChIP módszer szenzitivitását. A DRIP-seq módszer ezzel szemben egy nagy a szenzitivitású, egyszerű, és sok mintára skálázható eljárás. A DRIVE módszer egy *in vitro* affinitáskromatográfiás eljárás, amely az MBP-RNázH1 fúziós fehérje R-hurok kötésén alapul (Ginno *et al.* Mol Cell 2012). Tudomásom szerint azonban senki nem használta még ezt a módszert az R-hurok genomszintű vizsgálatára; az S9.6 antitestre épülő immunprecipitációs módszerhez képest nem látom előnyét a DRIVE eljárásnak.

Kérdés 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?*

Válasz 4: Tipikusan két független ChIP-seq kísérletet végeztünk, amelyből a DiffBind algoritmus segítségével határoztuk meg a differenciális ChIP kötőhelyeket. A DiffBind felhasználja az összes replikátumot és tekintetbe veszi a mintán belüli és minták között variabilitást. A kolokalizáló és különálló Spp1 / Bre2 frakciót független immunfluoreszcens mikroszkópos mérésekkel validáltuk meiotikus chromatin spread preparátumokon (24/C-D ábra).

Kérdés 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?

Válasz 5: A dinamikus Spp1 kötőhelyek vizsgálatára nem hierarchikus klaszterezést, hanem k-means, vagy másnéven k-közép klaszterező eljárást használtunk. A hierarchikus módszer előnye, hogy nem kell előre fixálni a csoportok számát, viszont egy adott csúc több klaszterbe is tartozhat a csoportok egymásba ágyazottsága miatt, amely komplikálta volna az értelmezést. A k-közép módszer egy centroid alapú csoportképző eljárás, amelyben a várható csoportok számát (k) előre definiáljuk, majd minden adatpontot hozzácsatolunk a legközelebbi centroidhoz (pl. euklideszi távolságuk alapján).

Elemzésünk során több k értékeket is kipróbáltunk (mindet sok random kezdéssel), s a nagyobb k valóban több alcsoportra osztotta az eltűnő Spp1 halmazt, mint ahogy a többi Spp1 klasztert is. A k növelésével tehát matematikailag minimalizálhatjuk az adatpontok centroidoktól mért távolságát, viszont így olyan alcsoportok keletkeztek, amelyek biológiailag szerepe nehezen értelmezhető.

Megemlítendő, hogy a k-közép klaszterezés eredményét egy független matematikai eljárással megerősítettük, amely a CHIP értékek (dúsítások) időbeli változása alapján azonosította az Spp1 kötőhelyek három dinamikai osztályát (25/A ábra). Konkrétan, vettük a sporulációs médiumban 0,2,4,6 óra között azonosított összes Spp1 kötőhelyet, majd minden kötőhelyre minden időpontban vettük a csúcsok RPKM értékeinek utolsó időponttól (6h) mért előjeles különbségét (D-érték, mint „differencia”). A D értékek alapján ezután rangsoroltuk az Spp1 kötőhelyeket, majd az eloszlás alsó (<q20), középső (q40–q60) és felső (>q80) kvantilisébe eső kötőhelyeket ábrázoltuk (25/A ábra). Az eljárás során kapott Spp1 kötőhelyek kinetikai osztályai azonosak a k-közép klaszteranalízissel kapott három csoporttal.

Kérdés 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 várnánk?*

Válasz 6: A fenti kísérleteinkben használt FRAP és FCS módszerek teljesen eltérő térbeli és időbeli felbontóképességgel rendelkeznek. Az FCS módszer miliszekundumos időskálán, szubfemtoliteres térfogatban kvantifikálja a mozgásban lévő (diffúzibilis) molekulák diffúziós idejét, amelyből meghatároztuk az Spp1 és Set1 látszólagos molekulatömegét. A nagy (1765 kDa körüli) Spp1 komplexet meg lehet magyarázni kromatinkötéssel, illetve bármely más makromolekulához történő kötődéssel. Az Spp1 bizonyítottan stabilan kötődik az elakadt replikációs villák mögött megjelenő szimpla-szálú DNS-hez (Ghaddar N *et al.* Research Square

2023), illetve a Set1 komplex részeként a SET1 mRNS-hez, Ty1 retrotranszpozon RNS-ekhez, riboszomális DNS (rDNS) intergenikus spacer-eiből származó nemkódoló RNS-ekhez, amely mind hozzájárul a COMPASS H3K4 metiltranszferáz aktivitásához (Sayou C *et al.* Mol Cell Biol 2017; Luciano P *et al.* Cell Discov 2017). A fenti FCS mérésekben vizsgált diffúzibilis frakció nem azonos a FRAP mérésekben azonosított mobilis és immobilis frakciókkal. A FRAP eljárásban perces időskálán, teljes sejtmagi térfogatban határoztuk meg a fluoreszcencia visszatérési időket. A FRAP mérések szerint az Spp1 és Set1 molekulák hasonló visszatérési kinetikát mutattak, fluoreszcencia intenzitásuk 1 percen belül elérte a telítési fázist. A FRAP jel mintegy fele azonban sosem tért vissza a kezdeti kioltást követően, ami arra utal, hogy az Spp1 és Set1 molekulák kb. 50%-a egy rendkívül rendkívül stabil (immobilis), feltehetően kromatin-kötött állapotban van jelen a sejtekben. Az immobilis frakció (amely FCS-el nem vizsgálható) magyarázata lehet például a Set1 komplex stabil asszociációja az RNS-polimeráz II C-terminális doménjéhez (CTD), amely a transzkripció elongációja során a H3K4 metiláció létrehozásához szükséges (Bae JH *et al.* Nat Comms 2020). Emellett, a H3K4 trimetiláció létrejöttéhez a Set1 komplexnek fizikai kapcsolatba kell lépnie egyéb kromatin fehérjékkel, például a H2Bub- és H3R2me-jelölt nukleoszómákkal, amely szintén hozzájárulhat a kromatin-kötött immobilis frakció kialakulásához.

Kérdés 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?*

Válasz 7: A meiotikus DNS törések létrejöttének elengedhetetlen feltétele, hogy a sejt keresztülmenjen a meiotikus S fázison. Konkrétabban, a meiotikus DSB-k mechanikusan kapcsolódnak a DNS replikációval (Borde V *et al.* Science 2000), amely molekuláris alapja a kromatin-kötött Mer2 fehérje foszforilációja a Cdc7/DDK által (Murakami H & Keeney S Cell 2014; Murakami H *et al.* Nature 2020), amely a repliszóma részeként működik. Az S fázis során foszforilálódó Mer2 ezután képessé válik a DSB komplex toborzására és a rekombináció elindítására. A H3K56 acetiláció egy tranzienst epigenetikai jel, amely legerősebben a replikatív DNS szintézis során jelenik meg meiotikus és mitotikus sejtekben. Bármely mutáció, amely befolyásolja az S fázist, befolyásolja a DNS törések keletkezését és a rekombinációt is. A cikkünk 1.C ábráján bemutatott FACS profilok kiértékelése alapján (Karányi Z *et al.* Front Cell Dev Biol 2020) az *asf1Δ* és *hst3/4Δ* mutánsok kb. hat órát késték a meiotikus S fázisban, ami

arra utal, hogy a H3K56ac hiánya, illetve többlete egyaránt negatívan hat az S fázis progressziójára. A *HIS4-LEU2* hotspot régióban mért DSB-k maximális szintje ugyan nem változott, viszont dinamikájuk jelentős késést mutatott a fenti mutánsokban a vad típusú sejtekhez képest (2.C cikkábra). Ez az eredmény összhangban van a meiotikus replikáció és a rekombináció mechanikus kapcsoltságával, illetve a H3K56 acetiláció S fázisra gyakorolt hatásával a vizsgált mutánsokban.

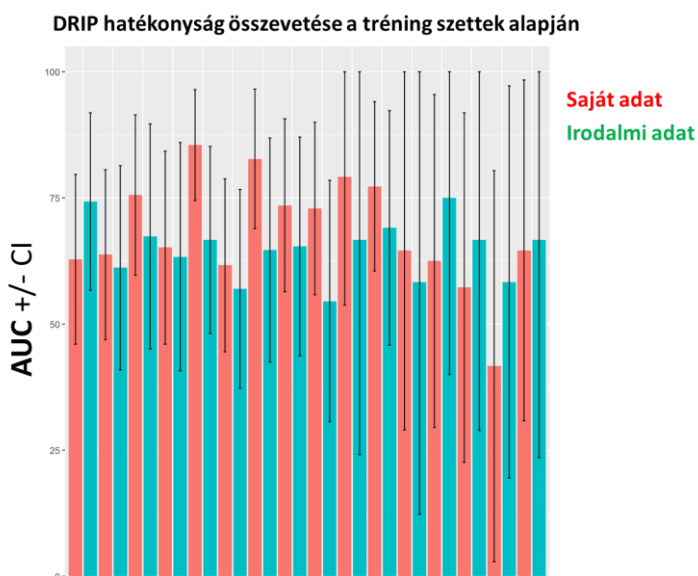
A H3K56A hiszton pontmutánssal kapcsolatos kérdést illetően, ebbe a genomi háttérbe sajnos nem sikerült bevinni a mesterséges *HIS4-LEU2* hotspot konstrukciót, mivel a hiszton mutáns törzsek létrehozása önmagában is rendkívül komplikált volt a hiszton génnek esszencialitása és multikópiája miatt. A H3K56A mutánsban a természetes *BUD23-ARE2* hotspot viselkedését vizsgáltuk, amely vad típusú sejtekben erős rekombinációs forrópontként viselkedik (8-10 %-os DSB gyakorisággal). Az Opponensnek igaza van abban, hogy a *HIS4-LEU2* hotspot vizsgálata a H3K56A mutánsban közvetlenül összehasonlíthatóvá tette volna a Southern blot eredményeket az *asf1Δ*, *hst3/4Δ*, és *rtt109Δ* adatokkal, legalábbis ebben a lókuszban.

Kérdés 8. *Az irodalomban alkalmazott és lehetséges DRIP protokollok hatékonyságának (szenzitivitás és specificitás) 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?*

Válasz 8: A ROC elemzésekben használt R-hurok tréning szettet két független forrásból, azok kombinálásával határoztuk meg. Konkrétan, az R-hurok pozitív és negatív szakaszok felét a szakirodalomból vettük (kb. 40 cikk adatai alapján), míg a másik felét saját DRIP-seq kísérletekben állítottuk elő. Kísérleteinket három sejttypusban végeztük el (Jurkat, GM12878, T CD4⁺ limfocita), kétféle genomfragmentálási módszerrel és kétféle sejtlízis hőmérsékleten, majd az adatokból egy ún. konszenzus peak szettet definiáltunk, melyek azonosan viselkedtek a kísérletekben. A konszenzus peak szett-ből ugyanannyi R-hurok pozitív- és negatív szakaszt választottunk ki véletlenszerűen, mint a szakirodalmi teszt régiókból, majd elvégeztük a DRIP-qPCR screen-t az összes osztályozó változóra. A DRIP-qPCR mérések kb. 4000 mérési pontot eredményeztek (ún. DRIP enrichment score), amelyek a ROC számítás bemenő paramétereit képezték.

A fenti módszer korántsem tökéletes, erre az opponensi kérdés is tökéletesen rámutat. Az irodalmi tréning szett egy rendkívül heterogén kísérleti halmazból származott, amely variabilitását nem fedi le a saját tréning szett. Viszont a saját tréning szett összes lehetséges kísérleti paraméterre történő beállítása minden racionális anyagi és idő keretet meghaladott

volna. Emiatt, kompromisszumos megoldásként, a két halmaz egyesítése mellett döntöttünk. Az alábbi ábra nem került be a cikkünkbe, de az opponensi felvetés miatt szükségét éreztük elvégezni az irodalmi és saját tréning szett összehasonlító elemzését. A ROC görbékől számolt AUC értékek alapján megállapítható, hogy nincs statisztikailag igazolható különbség a tisztán irodalmi és tisztán saját tréning szett alapján mért DRIP hatékonyságokban.



Kérdés 9. A növényi RNS-mediált DNS metiláció esetében mennyire sokfélék a PolIV/RDR2 és Dicer által termelt célzó siRNS-ek? Célpontjaik a PolV transzkriptek többségében megtalálhatók, vagy nem?

Válasz 9: A hagyományos szemlélet szerint a Pol IV által generált transzkriptumokból erednek a hetsiRNS-ek, melyek a Pol V által szintetizált scaffold RNS-eket ismerik fel, és ezek környezetét csendesítik. Ezen túlmenően vannak ún. csak Pol IV-függő ill. csak Pol V-függő sRNS lókuszok, minthogy bizonyítottan vannak mindkettőtől függő sRNS lókuszok is. A képet tovább árnyalja, hogy nem szükséges tökéletes szekvencia komplementaritás az sRNS - target lókusz kapcsolat során a biológiai hatás megvalósulásához. Összegezve, valószínűleg a Pol IV és Pol V közötti átmenet folyamatos mind az sRNS biogenezis, mind az RdDM effektor hatás tekintetében.

Kérdés 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 mást R-hurok kötésén keresztül?

Válasz 10: Eredményeink szerint az NDX fehérje tipikusan nem az R-hurok régiókhöz kötődik, hanem a transzpozonokat csendesítő kisRNS lókuszokhoz (Karányi Z *et al.* Nat Comms 2022). A Sun Q *et al.* eredményeket többszöri próbálkozás után sem sikerült validálni kísérleteinkben. Érdekesképpen, a cikket jegyző Dean csoport újabb munkája sem erősíti meg a Sun *et al.* cikk egyik fő eredményét, tehát a DRIP szignál csökkenését az *ndx1-4* mutánsban (Xu C *et al.* Nat Comms 2021), valamint nem említik az NDX fehérje szerepét az R-hurok mediált kotranszkripciós kromatincsendesítésben. Újabb kísérletek az Alba fehérjét írták le, mint potenciális R-hurok stabilizátort *Arabidopsis*-ban (Yuan W *et al.* Science Adv 2019); azonban e cikket is Sun Q és munkatársai jegyzik, független kísérletek pedig az Alba szerepét nem erősítették meg.

Kérdés 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?*

Válasz 11: A disszertáció 52. ábráján bemutatott túléléselemzésbe pozitív kontrollként bevontunk egy ismert onkogént (ERBB2 - HER2) és egy tumorszuppresszor gént (TP53), amelyek R-hurok asszociációval nem rendelkeznek, a rák túlélésre kifejtett hatásuk pedig bizonyítottan tekinthető. E pozitív kontrollokhoz hasonlítva az R-hurok regulátor gének csoportját, meg tudtuk ítélni számításaink biológiai relevanciáját. Az eredmény alapján az R-hurok regulátor gének hasonló mértékű (ill. négy esetben nagyobb) túlélés asszociációt mutattak, mint a pozitív kontroll rák gének.

Elemzéseinkben az adatok többszörös összehasonlításából adódó elsőfajú hibák korrekcióját a Benjamini-Hochberg féle FDR (False Discovery Rate) módszerrel végeztük. A korrekciót követően kevéssel szignifikancia határérték felett, de trendszerűen továbbra is láthatók voltak az asszociációk.

Kérdés 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?*

Válasz 12: A különféle tumorsejtvonalak kulcsfontosságú szereplői a humán tumorok molekuláris kutatásának, mivel többségük megfelelően modellezi a betegek mintákból izolált

daganatok genetikai és epigenetikai komplexitását. A számításainkhoz használt primer tumor – tumorsejtvonal párokat a CCLE, GDSC, és DepMap adatbázisok alapján választottuk ki, amelyek különféle molekuláris szignatúrák korrelációja alapján (pl. RNS-seq, hiszton modifikációk, SNV/CNV) részletesen meghatározták, hogy egy adott tumorsejtvonal mennyire specifikusan képez le egy adott primer tumort. A szinergisztikus gyógyszerkölsönhatásokat kizárólag olyan tumorsejtvonalakban kerestük, amelyek a primer tumorokkal szövettanilag és a molekuláris szignatúrák alapján igazoltan egyeztek. E tumorsejtvonalak vagy érzékenyebben reagáltak bizonyos terápiás szerekre egy adott R-hurok regulátor expressziójának függvényében, vagy éppen rezisztenssé váltak. A szignifikáns gyógyszerinterakciót mutató tumorsejtvonalakat ezután összepárosítottuk a szövettanilag egyező primer tumorokkal, amelyek túlélés-asszociációt mutattak a humán betegpopulációban (53/B ábra a disszertációban, illetve a Boros-Oláh B *et al.* DNA Rep 2019 cikkben Supplementary Table S1-panel 5). A primer daganatokkal diagnosztizált betegcsoportok R-hurok regulátor függő gyógyszerkölsönhatásait - vonatkozó adatok hiányában - közvetlenül nem vizsgáltuk.

Végezetül szeretném ismételtelen kifejezni köszönetemet Dr. Szüts Dávidnak a dolgozat elbírálásáért és a kutatómunkám iránti megtisztelő érdeklődésért. Bízom benne, hogy a kérdésekre adott válaszok alapján továbbra is megalapozottnak tartja az MTA doktori cím odaítélését.

Debrecen, 2023. augusztus 31.



Dr. Székvölgyi Lóránt