

Válasz Prof. Dr. Györfy Balázs bírálatára

Köszönöm Professzor Úr részletes, alapos bírálatát. A bírálatban megfogalmazott kritikát elfogadom. Az alábbiakban egyenként válaszolom meg Professzor Úr kérdéseit.

A GAS6 detektálására kidolgozott módszereknek mekkora az érzékenysége?

Vizsgálataink során a Gas6-et immunblotting, tömegspektrometria és ELISA módszer segítségével detektáltuk. A Gas6 mérésére szolgáló módszerek kidolgozásához szükség volt a Gas6 moláris extinkciós koefficiensének meghatározására, mert abszolút mennyiségi meghatározás ennek ismerete nélkül nem lehetséges. Ezt tisztított rekombináns Gas6 felhasználásával állapítottuk meg, $83676 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ -nek adódott. A plazma Gas6-et először immunprecipitáció-SDS-PAGE-immunblotting módszerrel detektáltuk. A detektálás során is használtunk jelerősítést, streptavidin-biotin rendszer és biotinált tormaperoxidáz formájában. A módszer érzékenységét nem kalkuláltuk, de 120 μL plazma Gas6 tartalmát, ami $\approx 2 \text{ ng}$, kimutatni volt képes. A Gas6 plazma jelenlétének bizonyítása tömegspektrométerrel történt, ebben az esetben is minőségi analízist végeztünk, célunk a protein detektálása volt. A kifejlesztett ELISA rendszer kimutatási határa 0,4 ng/mL Gas6 volt, azaz a teszt képes kimutatni 0,04 ng Gas6-et a 100 μL -es teszt térfogatban.

Történt-e BLAST keresés a primerkötődések igazolására?

Tudományos kutató, valamint diagnosztikai munkámban több száz esetben terveztem PCR reakcióban használatos oligonukleotidokat. Kezdetben kézzel, a GC=4, AT=2 fok ökölszabály szerint, a régóta ismert alap kritériumoknak megfelelően (kerülendő: repetitív szakaszok, másodlagos struktúrák, homológ, GC gazdag, purin gazdag szakaszok stb.). Mivel ez a tevékenység felőleli az elmúlt több, mint 20 évet, így nehéz számot adni retrospektíven az aktuálisan használt módszerről. Ami bizonyos, hogy minden esetben a kornak megfelelő elérhető legbiztosabb módszert választottam, amibe a BLAST analízis is beleértendő. Minden primer kombináció éles használata előtt kontroll kísérletben DNS szekvenálással igazoltuk annak specificitását. A Primer3 online eszköz használata óta, valamint az évek során nagyon megbízhatóvá vált oligonukleotid szintetizáló cégek okán ma már nincsenek primer problémáink, rendkívül ritka a nem működő primerpár.

A Roche 454 technológia mára már elavult és a bíráló nem tud róla, hogy még elérhető lenne. Mennyire érvényesek az eredmények a ma is elérhető következőgenerációs szekvenálási módszerek esetén?

Professzor Úr fontos kérdést tett fel. Mit ér egy kísérletsorozat, egy eredmény, ha már közlése idején is elavult, mert a módszer, amit elemez, már nem elérhető? Meglehetősen sok álmatlan éjszakát okozott nekem ez a publikáció, mert ezeket a kérdéseket én is feltettem magamnak. A

Roche 454 technológia, illetve a DNS szekvenáló (GS Junior) analitikai teljesítőképességének kísérletes vizsgálatát a diagnosztikai felhasználás igénye hívta életre. A megbízhatatlan, bizonyos szekvencia környezetben genotipizálni képtelen technológia korlátait ismernünk kell ahhoz, hogy megfelelő diagnosztikai stratégiát alakíthassunk ki, ugyanis diagnosztikai szempontból a minél homogénebb munkamenet kialakítása a cél, de nem mindenáron. Ebben az esetben azt találtuk, hogy a homopolimerek a piroszekvenálás módszerével nem genotipizálhatók pontosan bizonyos szám felett, így az adott exonokat Sanger szekvenálással kell vizsgálnunk. Ez a pontatlanság nem kezelhető informatikai módszerekkel, mert a kémia inherens hibája. A Roche 454 technológia kivonulásával azonban ez a potenciális hibaforrás nem tűnt el, ugyanis a rövid szakaszok szekvenálása területén a lényegesen robosztusabb és pontosabb Illumina és BGI mellett még mindig a piacon van az adott bázis(ok) beépülésekor felszabaduló protont mérő ion félvezető technológia a Thermo Fisher Scientific két műszerével (Ion GeneStudio S5 System és Ion Torrent Genexus System). Figyelembe véve, hogy ez a kémia homopolimer szempontból pontosan ugyanúgy viselkedik, mint a piroszekvenálás, a munkánk mondanivalója ma is aktuális.

A génpolimorfizmusok vizsgálata során csak egyszer említi a Hardy-Weinberg equilibriumot. A többi csoportban sem volt eltérés?

A genetikai asszociációs vizsgálatokban a kontroll csoport kiválasztása kritikus fontosságú. A kontroll csoport az általános populációt kell hogy reprezentálja, mely tagjai azonos etnikai háttérű, az adott betegségtől mentes, rokoni kapcsolatban nem álló személyekből kell álljon. Nem minden esetben van azonban lehetőség mélyreható klinikai vizsgálatok elvégzésére a kontrollok között. A fenti kritériumok - azaz a kontroll populáció homogenitása és reprezentativitása - tesztelésére szolgál a Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) vizsgálat. Meglepő, de a genetikai eset-kontroll vagy prospektív tanulmányok harmadában nem kerül sor HWE analízisre. A két molekuláris, időskori macula degenerációt (AMD) vizsgáló molekuláris epidemiológiai analízisünkben fenti kritériumoknak több módon próbáltunk megfelelni: a betegcsoport tagjainál szándékosan idősebb kontrollok beválasztása (AMD-ben nem, de minor refraktív hibában szenvedők, mely myopia, hypermetropia vagy presbyopia volt) klinikai vizsgálatot követően történt. Így a betegségtől mentességet a klinikai vizsgálatokkal igazoltuk, míg a klinikai egymás utáni megjelenés segítette a megfelelő kontroll- és betegcsoport kialakítását. A Losonczy et al (doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01687.x) publikációban elvégeztük a Hardy-Weinberg equilibrium analízist a kontroll és beteg csoportban. A kontroll csoportban nem volt eltérés a *CFH* genotípusok, míg a betegekben a *LOC387715* esetén - így pontosítva a disszertációban írtakat. A Losonczy et al (doi:10.1371/journal.pone.0050181) publikációban vizsgált összes 12 polimorfizmus esetén elvégeztük a Hardy-Weinberg equilibrium analízist a kontroll csoportban - eltérés nem volt.

A klinikai eredmények felöltésre kerültek-e valamelyik nemzetközi mutációs adatokat tartalmazó adatbázisba?

A diagnosztikai eredmények széles körben történő megismertetése több úton lehetséges, ezek különböző szintű minőségi kontrollt jelenítenek meg. Elsődleges célunk a nemzetközi publikáció volt, mely a legmagasabb ellenőrzési szintet jelenti. A klinikai laboratóriumi genetika egyik általánosan használt adatbázisa a Human Gene Mutation Database Professional

(HGMD). Ez az előfizetési adatbázis a publikált variánsokat veti alá kritikai analízisnek és teszi ezt követően hozzáférhetővé az előfizetők számára. Megvizsgáltuk a disszertációban szereplő közleményekben leírt genetikai variánsok HGMD reprezentációját és azt találtuk, hogy a HGMD 2020.4 verziószámú adatbázisban 25 általunk vagy általunk is leírt genetikai eltérés szerepel (*F5*, *KCNJ11*, *DHCR7*, *DMD*, *PKHD1*, *PKD1*, *FBN1* gének). A másik lehetőség a lókuszt-specifikus adatbázisokban történő depozíció, ezt a *DMD* c.227A>T, p.Asn76Ile eltérés esetén tettük meg (LRG_199t1: c.227A>T, LRG_199p1: p.Asn76Ile; <https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000171133>). A harmadik, egyre nagyobb jelentőségű adatbázis az NIH ClinVar adatbázisa. Ebbe professzionális genetikai ellátóhelyek tölthetik fel eredményeiket megfelelő regisztrációt követően. A korábbiakhoz hasonlóan, szintén minőségi kontrollal rendelkező adatbázis, nagy előnye, hogy a bizonytalan klinikai jelentőségű variánsok feltöltése is lehetséges. A ClinVar adatbázisba regisztráltunk és megkezdtük a variánsok feltöltését.

Végül, szeretnék Professzor Úr szövegben megjelenített kritikájára is reagálni:

"érdemes lett volna néhány technikai pontot külön is megmagyarázni (csak példaként kiragadva: a misszensz és nonszensz mutációk közötti különbség, illetve a kis és nagy deléciók illetve inzerciók közötti különbség módszertani detektálásának érzékenysége eltérhet az alkalmazott módszerek függvényében)".

Munkám során mindvégig megpróbáltam megteremteni az egyensúlyt a formai és tartalmi elemek között. Egyetemi oktatóként gyakori kérdés, amit felteszek magamnak, hogy "hol kezdjem?". Ebben az esetben talán ez nem sikerült, de mentségemre szóljon, hogy a genetikai variánsok detektálását általában minőségi analízisként végeztük, és abban az esetben, ahol mennyiségi analízis volt a cél (Koczok et al, doi.org/10.1002/pd.5319) ott a leírás részletesebb volt.

Még egyszer köszönöm Professzor Úr kérdéseit.

Tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Debrecen, 2021. 03. 10


Dr. Balogh István