

Válasz Dr. Puskás László opponensi véleményére

Tisztelt Bíráló!

Köszönöm szépen a bírálatot és a megjegyzéseket! Mindvégig törekedtem a megfelelő magyar nyelvezet használatára, ennek ellenére sajnos nem sikerült minden esetben a népszerűbb külföldi eredetű szó helyett a magyar forma használata. Teljesen jogos a megjegyzés, és elnézést kérek a magyartalan szavak használatáért!

A proteóm és proteom formákat illetően mindkét forma használatos. Mivel viszonylag kevés magyar nyelvű munka születik proteomika témakörben nehéz valamelyik forma dominanciáját megállapítani, gyakorlatilag mindkét forma fellelhető a magyar nyelvű művekben. Hosszú távon azonban, azt hiszem nem kérdéses, hogy a genomhoz és transzkriptomhoz hasonlóan a proteom forma lesz a domináns.

Kérdés:

Nem derült ki a bíráló számára, hogy az Alzheimer-kór diagnosztikájára tervezett könny fehérje tartalmának vizsgálata pontosan mire irányult. Bár a Célkitűzés fejezetben diagnosztikus és prognosztikus biomarkerek azonosítása volt megjelölve, ez az Eredmények részben nem lett kifejtve, a kis mintaszámból valószínűsíthető, hogy már diagnosztizált betegek elemzése zajlott egy időben.

Válasz:

Elnézést, a nem egyértelmű megfogalmazásért! Munkám során a már diagnosztizált Alzheimer kórban szenvedő betegek vizsgálatát végeztük. Ez azt jelenti, hogy diagnosztikus és nem feltétlenül prognosztikus potenciális biomarkereket azonosítottunk.

Kérdés:

Ellentmondásosak a könnymintákkal végzett előkísérleti és a további gélelektroforézis során kapott fehérje koncentrációra kapott eredmények. Amíg a termelődött könny koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a betegek esetében, addig az SDS-PAGE kísérletben pontosan az ellenkezője látszik, és pontosan az ellenkezőjét is interpretálják: „két sáv kivételével a betegektől származó mintákban a fehérje sávok statisztikailag szignifikáns módon csökken ...” - 21. ábra. Mindezekből az a gyanú támad, hogy valamilyen technikai hibáról van szó (ránézésre minden fehérjéből arányosan kevesebb látszik, és ahogyan várható

egy eltérő mintafelvitelnél a nagyobb koncentrációban jelenlévő fehérjéknél kisebb a különbség a telítődés számítása miatt), és nem valós különbségeket detektáltak. Ezek egyike sem specifikus változás.

Válasz:

Igen, ezzel a problémával többször szembesültünk: annak ellenére, hogy azonos fehérje mennyiséget viszünk fel a gélre, a betegminták esetében a kontrollok mintáihoz képest a gélsávok intenzitása alacsonyabb. Igen valószínű, hogy peptidek, vagy kis fehérje molekulák vannak jelen a könnyben, amelyek az összfehérje mérés és az SDS-poliakrilamid gélelektroforézis eredményei közötti eltérést okozzák. Próbálkoztunk a könnyfehérjék méret szerinti szűrésével, de sajnos igen komoly fehérje veszteségekkel kell számolni a pár mikroliternyi könny kihígításakor, majd a hígított minta szűrését követő bepárlás során. A direkt emésztés és tömegspektrometriás analízis szerint a 10%-os gélen nem detektálható kis móltömegű, antimikrobiális és immunmodulátor szereppel rendelkező fehérjék (pl. az S100 fehérje család több tagja) általában nagyobb mennyiségben fordulnak elő a cukorbetegektől származó könnymintákban, mint az egészséges donoroktól származó mintákban. Sajnos nem áll rendelkezésre Alzheimer kóros betegről származó könny, ezért a bíráló által felvetett kérdésre nem tudok egyértelmű választ adni. Azonban a diabéteszes könnyeken végzett eddigi vizsgálataink alapján, ahol az SDS-PAGE során megfigyelt jelenség ugyanúgy felfedezhető, mint az Alzheimer kóros betegektől származó minták vizsgálatánál, kizárnám a technikai hiba lehetőségét. A rendelkezésemre álló adatok alapján úgy gondolom, hogy a gélen nem látható, de mennyiségileg több kisméretű, főleg antimikrobiális és immunmodulátor fehérje jelenléte okozhatja a látott jelenséget.

Kérdés:

Mivel az Alzheimer-kór komplex betegség, több alcsoportra is osztható, valamint a kórlefolyás nagy nemi és korbeli különbségeket mutat, ezért az alkalmazott beteg és kontrollszám nagyon alacsony, statisztikai elemzésre nem alkalmas. Egy, a későbbiekben is használható potenciális biomarker azonosításkor rendkívül fontos az eredmények validálása (lehetőleg kettős-vak kísérleti tervezéssel) nagyobb számú betegeken/kontrollokon, más centrumokból származó mintákon, más embercsoportokon. Mindaddig félrevezető és véleményem szerint nincs értelme ROC analízist és biomarker kombinációk eredményeit kalkulálni.

Válasz:

Sajnos igen komoly akadályokba ütköztünk a mintagyűjtés során, így annak ellenére, hogy tervben volt, nem tudtuk kiterjeszteni Alzheimer kórral kapcsolatos vizsgálatainkat a korai állapotokra, és nem tudtunk nagyobb mintaszámú betegeket sem bevonni. Erre az egyik lehetőség a nyugat-európai biobankok anyagának vizsgálata lenne, de azok nem tartalmazznak könnymintákat. Teljesen jogos a felvetés a ROC statisztikát illetően; adataink csak tájékoztató jellegűek, és azt a célt szolgálják, hogy felhívják a figyelmet arra, hogy érdemes ezekkel a potenciális biomarkerekkel foglalkozni. Tekintve, hogy ez az egyik legdinamikusabban idézett publikációnk, a szakma nagy érdeklődésére tart számot és amint lesz rá lehetőség, mindenképp szeretnénk validálni, de legalább ellenőrizni eredményeinket.

Kérdés:

A normál verejték tömegspektrometriás elemzésekor összekeverték az egyes emberek mintáit, hogy megfelelő mennyiséget kapjanak. Diagnosztikai célú alkalmazáskor természetesen egyedi mintákat fognak használni. Sikerült-e a módszert olyan érzékennyé tenni, hogy az egyedi emberek mintáit is lehessen használni? Tervezik-e ezt a Debreceni Egyetemen adaptálni ezt a módszert? Lehet-e tudni, hogy milyen egyedi szórások vannak és hogy a kor és a nem hogyan befolyásolja az egyes fehérjék szintjét?

Válasz:

Biomarkerek vizsgálata során minden esetben a cél az egyedi minták elemzése. Egy korábbi kutatás során gyűjtöttünk verejtékmintákat, de az akkor rendelkezésre álló analitikai rendszerünk nem volt kellően érzékeny az egyedi minták vizsgálatának kivitelezésére. A jelenleg rendelkezésünkre álló nagy érzékenységgű tömegspektrometriás rendszer segítségével megvizsgáltuk a korábbi mintákat, és az egyedi verejtékmintákban a különböző keratin formákon kívül 43 fehérjét tudtunk azonosítani. Vizsgálataink azt mutatják, hogy az egyedi verejtékminták analízise lehetséges, és hamarosan elkezdjük a korábban 1. típusú cukorbetegségben szenvedő gyerekektől gyűjtött egyedi minták tanulmányozását.

Nincsenek saját adataink a kor és nem fehérje szintre gyakorolt hatását illetően, viszont irodalmi adatok alapján jelentős különbségek figyelhetők meg a férfiak és nők verejtékfehérjei között. Egy kutatás 562 verejtékfehérjét azonosított, amely nemtől függetlenül mindkét csoport mintáiban jelen volt, míg 298 fehérje bizonyult nem specifikusnak (Yu és mtsai. J Proteomics 2017). A nemhez hasonlóan a kor is egy fontos változó a verejték fehérje összetételét illetően:

egy kutatás, amely a verejték gyulladásos markereit vizsgálta azt találta, hogy az idősök verejtékében nagyobb mennyiségben voltak jelen a vizsgált citokinek, mint a fiatalok mintáiban (Hladek és mtsai. J Immunology Methods 2018). Az egyedi szórások jelentősek. Saját adataink azt mutatják, hogy 60-80 % az eltérés (CV%) az egyes donorok mintáiban levő fehérjék mennyisége között.

Kérdés:

Hogyan értékeli az irodalomban megtalálható számos biomarker adat megbízhatóságát (reprodukálhatóság és érzékenység szempontjából) és összehasonlíthatóságát. Milyen stratégiákat, módszereket, kísérleti tervezést tart előnyösnek a hibák minimalizálására és a megbízhatóság növelésére.

Válasz:

Ez egy nagyon fontos, ám ugyanakkor nagyon komplex kérdés. Igen nehéz a biomarker kutatási adatok összehasonlítása, ugyanis a különböző kutatócsoportok többféle stratégiát alkalmaznak a biomarkerek vizsgálata során, eltérő a mintagyűjtés, a vizsgálatba bevont populáció stb. Ha nem vért, vagy vizeletet vizsgálunk, akkor figyelni kell a mintagyűjtés módja mellett a mintagyűjtés időpontjára is. Mindemellett ügyelni kell arra, hogy többé-kevésbé homogén donor csoportokat alkossunk, megfelelő kontrollokat vonjunk be és mindenek felett megfelelő legyen a mintaszám. Ha a fenti faktorok figyelembe vételével dolgozunk, általában jó a reprodukálhatóság, de még ilyen esetekben is előfordulhat, hogy a vizsgálat elején ígéretesnek tűnő fehérje a validálás során nem bizonyul megfelelőnek és el kell vetni. Az irodalomban publikált sok potenciális biomarker közül csak nagyon keveset lehetett validálni, és még kevesebb felelt meg a különböző hatóságok (pl. FDA) által támasztott nagyon szigorú elvárásoknak.

Ennek egyik oka a klasszikus, ún. trianguláris stratégia alkalmazása. Viszonylag kis csoportonkénti mintaszám vizsgálatával indul, majd a felfedezés további lépcsőin több és több donor bevonásával szélesítik az analízisek számát, ezzel párhuzamosan pedig csökkentik a vizsgált fehérjék számát. A probléma kiküszöbölésére az utóbbi években az ún. rektanguláris stratégiát javasolják (Geyer és mtsai. Mol.Syst.Biology 2017). Ez a stratégia kétlépcsős, és mind a felfedezés, mind a validálás stádiumában nagyszámú donort vonnak be; gyakorlatilag mindkét szinten megismétlik a vizsgálatokat más-más, de kellően nagyszámú donor bevonásával. Így lehetővé válik, hogy kevesebb, de megbízhatóbb potenciális markert

azonosítsanak. Azok a fehérjék, amelyek mindkét vizsgálatban megfelelőnek bizonyultak a csoportok elkülönítésére, biomarkerként használhatók.

Az irodalomban közölt adatok döntő többsége, akárcsak a mi csoportunk által publikált adatok, trianguláris stratégia alkalmazásával születtek, ennek minden előnyével és hátrányával. Igen valószínűnek tartom, hogy néhány éven belül trianguláris stratégiával végzett vizsgálatok eredményét nem lehet majd publikálni a rangos szakmai folyóiratokban, és publikálási előnybe kerülnek olyan munkacsoportok/szervezetek, amelyek nagymennyiségű (több ezres) mintaszámhoz férnek hozzá és azokat tudják vizsgálni.

Az érzékenység nagyban függ attól, hogy milyen tömegspektrometriás rendszeren történik a vizsgálat. Az utóbbi években elterjedt tömegspektrometriás rendszerek már kellőképpen érzékenyek a különböző minták mélyanalízisére, és a kis mennyiségben levő fehérjékről is gyűjthető adat.

A már meglevő eredmények összehasonlítása nem egyszerű. Az egyes kísérletek eredményeként kapott biomarkereket el lehet fogadni, bizonyos határok között lehet használni – habár a saját nyálproteomikai eredményeink is mutatják, hogy a tajvani és a hazai vizsgálatok eredményei eltérők voltak –, de a különböző kutatócsoportok által létrehozott kvantitatív adatokat is tartalmazó fehérje vagy génlistákat nem lehet egy az egyben összehasonlítani. Egy frissen közölt tanulmányunkban Alzheimer kórban elhunyt betegek agyából származó minták vizsgálati eredményeit töltöttük le proteomikai adatbázisokból, de csak az egyes csoportok által szignifikánsnak ítélt fehérjéket vizsgáltuk tovább, mert nem sikerült olyan matematikai modellt találni, amely képes a különböző kísérleti beállítással létrehozott adatok együttes elemzésére.

Összegezve, a szakirodalomban közölt biomarker adatok összehasonlítása nem megoldott, az összehasonlíthatóság nagymértékben függ az alkalmazott módszerek kompatibilitásától. A reprodukálhatóság általában jó, viszont az érzékenység az alkalmazott analitikai rendszertől függ. Most már egyre inkább elérhetők a nagy érzékenységű tömegspektrometriás rendszerek és a keletkezett adatokat standardizált és ellenőrzött módon fel lehet tölteni publikusan hozzáférhető adatbázisokba (pl. ProteomeXchange), jelentősen növelve a keletkezett adatok megbízhatóságát és újrahasznosíthatóságát.

Mindent egybevetve, sajnos nem ideális a biomarker azonosítás területén jelenleg uralkodó állapot. Úgy gondolom, hogy ez jelentősen meg fog változni a közeljövőben: egyrészt a rektanguláris stratégia térhódításával, másrészt pedig az adatstandardizálási programok révén. Példa erre az ELIXIR-Proteomics által koordinált több európai kutatócsoportot - köztük a mi csoportunkat is - magába foglaló közös munka (ELIXIR-Proteomics Community-led

Implementation Study 2019 „Increasing the translational value of public proteomics datasets: Automatic metadata-driven reanalysis in cloud infrastructures”).

Még egyszer köszönöm a feltett kérdéseket és a dolgozatom bírálatát!

Debrecen, 2021. május 31.

Tisztelettel,

Dr. Csósz Éva
jelölt