

Válaszok Dr. Vékey Károly opponensi véleményére

Tisztelt Professzor Úr!

Köszönöm szépen bírálatot és a méltató szavakat! A feltett kérdésekre a következő válaszokat adnám:

Kérdés:

Proteinhálózatok vizsgálata fontos bioinformatikai feladat, mely sok fehérje közötti kapcsolatot értelmezésére szolgál. Tipikus hálózati modell például a 46. ábra, melyen ca. 100 fehérje szerepel. A dolgozatban bemutatott más esetekben azonban csak néhány, 5-10-15 fehérjéből alkotott hálózatok szerepelnek (pl. a 27,28, 29 ábrák esetén). Ilyen kevés fehérje esetén mennyire jogos a statisztikai elemzéseken alapuló proteinhálózati modell használata?

Válasz:

A protein hálózatok esetében, teljesen jogos a felvetés, ugyanis a kis elemszámú hálózatokban a statisztikai analízis nem adna valós eredményt, ezért nem is használtuk. Egyes esetekben a hálózatokat azért rajzoltuk meg, hogy a fehérjék funkciójáról, illetve a fehérjék egymás közötti interakcióiról kapjunk képet. Nagyon sok olyan szoftver áll rendelkezésre, amelyek segítségével a fehérjék funkciói vizsgálhatók, viszont a STRING DB, amellet, hogy információt nyújt az egyes fehérjék közötti kapcsolatokról, egy könnyen használható környezetet biztosít a funkcionális vizsgálatokhoz is. Ez volt az egyik ok, amiért gyakran használtuk a STRING DB hálózatrajzoló és funkcionális elemző tulajdonságait vizsgálataink során. Ilyen esetekben nem végeztünk statisztikai elemzést a hálózaton, hanem a statisztikai elemzés eredményeként kapott fehérjék hálózatát rajzoltuk meg.

Statisztikai elemzést csak olyan hálózatokon végeztünk, ahol az elemszám ezt lehetővé tette, így csak a HIV-1 transzdukció vizsgálata során kapott adatokat elemeztük így módon.

Kérdés:

Defenzinek kvantitatív vizsgálatára a jelölt MRM alapú tömegspektrometriás módszert fejlesztett, és az ezzel kapott eredményeket ELIZA módszerrel hasonlította össze. Irodalmi

eredmények alapján az MRM jóval specifikusabb (kevesebb hamis pozitív találat), sok (akár több száz) komponens vizsgálatára alkalmas, azonban sokkal drágább, mint az ELIZA. Ezek miatt az MRM-et legtöbbször akkor használják, ha az ELIZA nem ad megfelelő eredményt. Mi erről a véleménye? Jelen esetben „csak” 4 komponens vizsgálatáról volt szó. Miért volt szükség az MRM alkalmazására, ill. mi volt az előnye az ELIZA-val szemben?

Válasz:

Az MRM-alapú analízisek az esetek nagy részében módszerfejlesztést, de legalább módszeroptimalizálást igényelnek. Figyelembe véve ezt a tényt, valamint azt, hogy az antitest alapú módszerek általában érzékenyebbek, mint a rutinszerűen alkalmazott tömegspektrometriás módszerek, amikor van lehetőség antitest használatára, mindenképp az a javasolt módszer. Gyorsabb, sokszor egyszerűbb a kivitelezése, és ár-érték arányban felülmúlja a célzott tömegspektrometriás vizsgálatot. Ez vonatkozik arra az esetre, ha egy vagy két analit mennyiségét vizsgáljuk. Azonban olyankor, amikor ugyanabból a mintából több fehérje mennyiségét kívánjuk meghatározni, olyan módszer alkalmazása szükséges, amely lehetőséget biztosít több fehérje együttes vizsgálatára. Erre is vannak antitest alapú módszerek, viszont ott a gyártó által előre meghatározott és optimalizált fehérje listákból lehet válogatni. Ha nem a kínált fehérjéket, vagy nem az összes kínált fehérjét szeretnénk vizsgálni, akkor kompromisszumra kényszerülünk vagy az ár, vagy a vizsgált fehérjéket illetően. Ilyen esetekben, vagy amikor nincs megfelelő minőségű antitest, akkor jelent óriási segítséget az MRM-alapú módszerek alkalmazása. Ez jelentős flexibilitást biztosít, mert egyenként lehet a kívánt fehérjékre módszert tervezni, azt optimalizálni és egy analízis során több, MRM-el kb. 20, PRM-el akár 100 (vagy több) fehérje vizsgálatát is elvégezni.

A defenzinek vizsgálata során az volt a cél, hogy olyan célzott proteomikai módszert fejlesszünk ki, amely alkalmas az összes defenzin egyidejű vizsgálatára. Sajnos ebben a kérdésben nem jártunk teljes sikerrel, ugyanis az alfa defenzinre nem sikerült megfelelő módszert tervezni; nem találtunk megfelelő specifikus szekvenciát, amelyet felhasználhattunk volna az alfa defenzinek egyértelmű azonosítására. Így „csak” a béta defenzinek vizsgálatára alkalmas módszert hoztunk létre; módszerünkkel a béta defenzin 1, 2, 3 és 4 mennyisége egyszerre vizsgálható. A módszer kifejlesztésekor rendelkezésre állt ELISA a vizsgált defenzinre, viszont ár-érték arányban és erőforrás-ráfordítás szempontjából jobbnak bizonyult az MRM módszer. A másik előny az volt, hogy míg pl. sejtkultúrák vizsgálatoknál elegendő minta áll rendelkezésre több, egymást követő ELISA kivitelezésére, addig más

esetekben (pl. könny, verejték stb.) a mintamennyiség limitált, és nem teszi lehetővé az ismételt ELISA vizsgálatok kivitelezését. Ilyen esetekben a célzott proteomikai módszerek biztosítanak alternatívát az antitest-alapú vizsgálatokkal szemben.

Még egyszer köszönöm dolgozatom bírálatát és a feltett kérdéseket!

Debrecen, 2021. május 31.

Tisztelettel,

Dr. Csősz Éva
jelölt