

Válasz Prof. Dr. Molnár Mária Judit bírálatára

Doktori értekezés címe:

“The role of molecular genetics in exploring the pathogenesis of multiple sclerosis”

Nagyon köszönöm az Opponensnek disszertációm gondos áttekintését, bírálatát és fontos kérdéseit.

Válasz az Opponens bevezető összefoglalójában szereplő megjegyzéseihez.

1. A disszertáció alapjául szolgáló közlemények listája a tézis végén található.
2. A disszertációt két részre bontottam, mivel a 17q11 kromoszóma régió genetikai elemzése és a kemokin molekulák expressziós vizsgálata a sclerosis multiplex (SM) gyulladásos, míg a mitochondriális genetikai és biokémiai folyamatok elemzése a neurodegenerációs folyamatokat reprezentálja. A vizsgálat alanyai (család vs. sporadikus beteg-kontrol) és a módszerek alapvető különbségei miatt is indokoltnak látszott ez a tagolás. Azonban a tanulmány végső konklúziója az SM irodalomban először általam megfogalmazott új koncepcióban integrálja a gyulladásos és neurodegenerációs folyamatokat egy mitochondriális mechanizmuson keresztül (gyulladásos sejt termékek-> oxidációs mtDNS és mitochondriális enzim károsodás ->apoptosis és neurodegeneráció) (Disszertáció 4.4 Következtetések és Tézis).
3. A célkitűzések valóban implicit módon vannak a Disszertáció Bevezető fejezetébe beépítve, melyeket azonban a tézis pontokba szedve mutat.

Válaszok az Opponens formális megjegyzéseire és kérdéseire:

A CC chemokinek szerepe a gyulladásos demyelinizációban

1. SM kritériumok: A tanulmányban szereplő sokszáz SM-es család DNS anyaga egy DNS bankból és kollaborátoroktól származott. A mintagyűjtés időigényes volt. Egy része 2001 előtt történt, amikor még a Poser kritériumokat használtuk, míg más része 2001-ben vagy azután történt, amikor a McDonald kritériumok használatára váltottunk. Emiatt szerepel kétféle kritérium a disszertációban.
2. A vizsgálat alanyainak etnikai háttere és formai kérdések: A tanulmány kizárólag fehér rasszhoz tartozó beteg és kontroll anyagot használt a genetikai homogenitás érdekében. Ez minden szekcióban, beleértve az Opponens által említett 1. táblázat jegyzékét is, fel van tüntetve. A bekötött disszertációban, valamint az MTA internetről letöltött pdf-ben nem találtam oszlopelcsúszásokat a táblázatokban. Sajnálatos módon az Opponenshez olyan változat kerülhetett, melyben az internetes elektronikus konverzió okozhatott elcsúszásokat.
3. Az SNP-k azonosítása: A 2.2.1 fejezetben 31 SNP-t tanulmányoztam, melyek rs számát (az a szám, mely alapján az NCBI SNP adatbázisban az SNP azonosítható) a 2. táblázatban részleteztem. A 2.2.2 fejezetben 326 SNP-t vizsgáltam, melyek rs számát nehéz lett volna táblázatban bemutatni. Azonban ezek közül azoknak az SNP-nek az rs számát, melyek asszociációt mutattak a betegséggel, részleteztem a 7. táblázatban. A “munka” táblázatainkban (melyeket a genotipizáláshoz és adat

elemzéshez laboratóriumi használatra készítettünk) nemcsak az SNP rs számot, hanem a kontig pozíciót, kromoszóma pozíciót, az SNP-k egymástól való távolságát és az allél variációkat is összegyűjtöttük. A részletes adatokat készséggel megtekintésre tudom bocsátani.

4. Nature 2011;476:214-219 eredményei és a dolgozat eredményei: Ezen cikk SNP vizsgálatai két génben találtak pozitív eredményt a 17q11 régió közelében. 1. Stat3 (17q21.1), mely legközelebb esik a 17q11, általunk vizsgált (CCL kemokin csoport) régióhoz. (A STAT3 egy fontos jelátvivő molekula, mely számos növekedési faktor és citokin sejt receptorhoz való kötődését követően aktiválódik a citoplazmában és gének transzkripcióját indukálja a sejtmagban).

2. RPS6KB1 (17q23.1) kissé még disztálisabban van a kromoszóma hosszú karján, mint a STAT3. (Ez egy "ribosomal protein S6 kinase", mely szerepet játszik a sejtek insulinra és mitogénre adott válaszában).

A Nature tanulmány nem jelzett SM-mel asszociálódó CCL chemokin márkereket a végső eredmények között. A különbség több okkal magyarázható. 1. A 17 kromoszómán nagyon kiterjedt linkage disequilibrium (LD) található. Ennek köszönhetően lehetséges, hogy márkerek több ezer bázispár távolságban sem függetlenek egymástól. Így a két tanulmány különbségei LD által közös alapra helyezhetők. 2. A két tanulmány alapvetően különböző betegpopulációkban történt. A Nature cikk 15 országból gyűjtött fehér beteg és kontroll mintákat vizsgált. A mi tanulmányunk kizárólag Észak-Amerikai fehér SM-es családok mintáit analizálta. 3. A GWAS (genome wide association study) genom szintű statisztikai elemzése során (a többszörös összehasonlítás korrekciója miatt) a gyenge asszociációk elveszhetnek, az óriási minta szám ellenére.

5. A CCL molekulák expressziós vizsgálatának mintái: A CCL molekulák expressziós mintázatának vizsgálata fagyasztott SM-es agymintákból történt. Tíz krónikus SM-es betegből normálisnak tűnő fehérállomány, normálisnak tűnő szürkeállomány és plakkok összetartozó triójából nyertünk RNS-t a szövetek hisztológiai verifikálását követően. Hasonlóan, összetartozó fehér- és szürkeállományt tartalmazó minta duókat nyertünk a kontrollokból (Isd. Disszertáció 2.2.4 fejezete).

Mitochondriális genetika és a neurodegeneráció mechanizmusa SM-ben

1. Betegválasztás a disszertáció 3.2.1.1 részében: Azon 53 fehér SM-es beteg, akinél az ND-4, ND-1 és ND-6 gének vizsgálata történt, részben random módon, az SM klinikán való megjelenés alapján került a tanulmányba (50 beteg), részben egy szövet banki elérhetőség és "SM" kritérium alapján (3 beteg). A kontrollok mindkét esetben etnikailag, korban és nemben is hasonló megoszlást mutattak a betegekkel. Ez a tanulmány volt az első mtDNS analízis a laboromban. Mint előtanulmányban, az első 20 betegnél szekvenálást végeztünk, mely által fedeztük fel, hogy a másodlagos LHON mutációk gyakoribbak lehetnek SM-ben. Ez vezetett a tanulmány kibővítéséhez, és

restrikciós endonukleáz szűréshez a nagyobb kohortban (majd átfogó vizsgálatokhoz). Egy fenotípus alapján történő eltorzult beteg szelekció azért sem játszhatott szerepet a minták gyűjtésében, mivel semmilyen fenotípus jegy nem asszociálódott a másodlagos LHON mutációkkal (lds. Disszertáció 3.3.1 fejezete; 17 és 18 táblázat).

2. Másodlagos LHON mutációk más autoimmun betegségekben: Egy kollaborációs tanulmányban Dr. Perl Andrással (Clinical Immunology 2008;129:31-35), megvizsgáltuk az SM-mel asszociációkat mutató SNP-eket SLE-ben. A másodlagos LHON variációk közül csak az 4917 SNP "G" allélja (ND2) mutatott asszociációt mind SM-ben, mind SLE-ben. Ezen kívül egy 9055 pozícióban levő SNP "A" allélja (ATP6) asszociálódott mindkét betegséggel. Azonban a 9055 SNP (nem LHON variáció) által is meghatározott K* haplotípus, melyet mi SM-mel asszociációban találtunk, nem volt pozitív SLE-ben. A munkánkat követően, egy Scandínáv tanulmány a 13,708 SNP-t találta SLE-vel asszociációban, de különös módon csak férfiakban (Lupus. 2009;18:309-312).

3. Másodlagos LHON variációk a patogén mtDNS mutációk hatását módosíthatják-e? Az elsődleges LHON mutációk közül a 11,778 és 14,484 mutációk (de nem a 3460 mutáció) a Kaukázoid vagy fehér mtDNS J haplocsoportban található legnagyobb gyakorisággal, melyeket másodlagos mtDNS variációk határoznak meg. Ez alapján lehetséges, hogy a patogén mutációk penetranciáját a másodlagos LHON variációk fokozzák (Am J Hum Genet. 1997;60:381-387; Am J Hum Genet. 1997;60:1107-1121; Am J Med Genet A. 2003;119A:147-151). Azonban a ma elérhető biokémiai vizsgálati módszerek és elemzések nem támogatják azt a feltételezést, hogy a másodlagos LHON mutációk tovább csökkentenék az elsődleges LHON mutációk által okozott energia metabolizmus károsodást (Brain. 2000;123:1896-1902). Így a másodlagos LHON mutációk szerepe jelenleg nem teljesen tisztázott a LHON típusú látóideg atrofia kialakulásában.

4. A SM-es és NMO-s betegek mintái, akiknél mtDNS szekvenálás történt: A betegek kiválasztásának szempontjait a 3.2.1.3 fejezet részletezi. Egy SM-es betegtől postmortem agymintát használtunk, míg a másik két SM-es beteg véréből származó perifériás mononukleáris sejteket vizsgáltunk. Mindhárom NMO-s betegtől postmortem központi idegrendszeri mintákat használtunk. Csak homoplazmikus variációkat találtunk a szekvenálás során, amit a 19. táblázat foglal össze. A 19. táblázat oszlopainak sajnálatos elcsúszása az Opponenshez jutott disszertáció változatban valószínűleg ismét az elektronikus konverzióval áll összefüggésben.

5. Az SM-es és NMO-s betegekben szekvenálással meghatározott variációk további vizsgálata. A 19. táblázat jelzi, hogy a szekvenálással talált variációkat tovább vizsgáltuk 52 újabb SM-es betegben és 63 korban, nemben és etnikus szempontból illesztett kontrollban. Egyik variáció sem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a két kohortban. Kontroll DNS mintákat nem szekvenáltunk.

6. A Complex I génjeiben talált SM asszociációk a GWAS eredményekkel hasonlítva: A Complex I NDUFS5, NDUFS7 és NDUF7 szubunitjaiban jelenlevő SNP-k és haplotípusok asszociációt mutattak SM-mel az általunk vizsgált családokban, de ezek az asszociációk nem voltak statisztikailag kimutathatóak a nagyobb, teljes genomot

vizsgáló GWAS tanulmányokban (N Eng J Med 2007;357:851-862; Nature 2011;476:214-219). A különböző vizsgálati alanyokon kívül, ennek oka statisztikai is lehet (a fent is jelzett többszörös összehasonlítás korrekciója következményeként az enyhe asszociációk elveszhetnek a GWAS-ban). Azonban érdemes megjegyezni, hogy a Complex I funkcionális jelentőségén kívül, ezen gének és SNP-k tanulmányozása azért is történt, mert olyan kromoszóma régiókban találhatóak, ahol a korábbi SM linkage tanulmányok pozitív lod score-t mutattak (Nature Genetics 1996;13:464-468; 1996;13:469-471; 1996;13:472-476).

7. Complex I-V légzési lánc enzimek funkciója SM-ben: Mi az NADH-DH (Complex I), Complex I+III, Complex II+III és Complex IV, valamint a citrát szintáz enzimek aktivitását vizsgáltuk 10 összetartozó SM-es normálisnak tűnő fehérállomány és plakk párban. A plakkok 70%-ában csökkenést találtunk az NADH-DH (Complex I) aktivitásában, és egy valószínűleg kompenzatorikus növekedést a Complex IV aktivitásában. Ez az eredmény a Complex I aktivitás károsodását jelezte a gyulladásos plakkokban (saját szöveti kontrollal összehasonlítva). Más enzimaktivitás változást nem detektáltunk (Lsd. Disszertáció 3.3.3.3 fejezete).

8. Kapcsolat az alacsony D vitamin szint és a mitochondriális funkcionális károsodás között: Ezt az érdekes kérdést tudomásom szerint direkt módon még nem vizsgálták SM-ben. Azonban kapcsolat lehetséges, mivel a citokróm P450 enzim, mely a D vitamin metabolizmusában fontos szerepet játszik, a mitochondriumba lokalizálódik. P450 27A1 és P27B1 katalizálja a vitamin-D3 25-hidroxilációját, majd a 25-OH-vitamin-D3 1alfa-hidroxilációját, rendre (Arch Biochem Biophys. 2006;445:138-146). A mitochondriális enzimek gyulladásos károsodása plakkokban potenciálisan befolyásolhatja a D vitamin metabolizmusát, de nem magyarázza meg a szisztémás D vitamin hiányt. Vice versa, prenatális D hipovitaminózis negatívan befolyásolhatja fontos agyi molekulák expresszióját, beleértve a mitochondriális energia metabolizmus enzimjeit, és ezáltal az agy fejlődését is (J Steroid Biochem Mol Biol. 2007;103:538-545). Ez viszont nem magyarázná meg, miért csak a plakkokban találtunk mitochondriális károsodást. Másrészt, filogenetikai elemzések jelzik, hogy bizonyos konzervatív mtDNS mutációk segíthették az északi klímához és alacsony UV-besugárzáshoz való alkalmazkodást az evolúció során, de ugyanazon SNP-k ma szerepet játszhatnak betegséggel való asszociációkban (Science 2004;303:223-226). A kínálkozó összefüggések alapján, az Opponens kérdése új lehetőséget vetíthet előre az SM vizsgálatában.

Az Opponens bírálatát, megjegyzéseit és kérdéseit mégegyszer nagyon hálásan köszönöm.

Tisztelettel,

Kálmán Bernadett

Dr. Kálmán Bernadett
2011.10.27.