

Válaszok Prof. Dr. Prohászka Zoltán egyetemi tanár opponensi véleményére

Tisztelettel köszönöm Prof. Dr. Prohászka Zoltán egyetemi tanárnak, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálatát. Kérdéseire és kritikai megjegyzéseire az alábbiakban válaszolok:

1. a. *A TNFSF15 gén polimorfizmusainak vizsgálatánál ellenőrizte-e a HW egyensúlytól való eltérést, és amennyiben eltérés mutatkozott, véleménye szerint ez befolyásolhatta-e 44. oldalon megfogalmazott következtetéseit? Ha volt eltérés, mi lehetett ennek az oka?*

A TNFSF15 gén polimorfizmusainak vizsgálatánál a kontroll csoportban a genotípus eloszlások valóban eltértek a Hardy-Weinberg egyensúlytól. Pontosan nem tudjuk, mi állhat ennek hátterében. Természetesen felmerülhet mintavételezésből eredő hiba, ugyanakkor, mivel mismatch hibákról van szó, valószínűbb, hogy szelekció vagy funkció hiányában történő allélvesztés áll a háttérben. A Hardy-Weinberg egyensúlytól való eltérés miatt véleményem szerint indokolt volt a genotípus frekvenciákkal, és nem allélfrekvenciákkal történő számítás, így feltehetően az egyensúlytól való eltérés nem befolyásolta jelentősen a 44. oldalon megfogalmazott következtetéseket.

- b. *A 7-8. táblázatban bemutatott eredményekkel kapcsolatban saját értékelése is felhívta a figyelmet a következőre: "a haplotípus alacsony gyakorisága miatt a statisztikai tesztek megbízhatósága viszonylag alacsony volt". Nem a statisztikai teszt megbízhatósága alacsony ebben az esetben, hanem a vizsgálat statisztikai ereje. Történt-e power számítás, ha igen, milyen eredményt adott?*

Egyetértek a bírálóval, hogy az értékelés során helyesebb lett volna a vizsgálat statisztikai erejének alacsony voltát említeni. Power számítás nem történt.

- c. *A 8. táblázatban feltüntetett %-os értékek nem adják ki a 100%-ot, miért nem került feltüntetésre és elemzésre az összes bevont személy?*

Korábbi irodalmi adatok szerint a TNFSF15 gén 5 SNP-je esetén mind kaukázusi mind távol keleti mintákban az általunk is vizsgált 3 haplotípus alakul ki leggyakrabban.(1-3) Ezért végeztük el saját munkánk során csak ennek a 3 haplotípusnak a vizsgálatát.

- d. *A 9. táblázatban $7 \times 3 \times 2$ p értéket, azaz 42 statisztikai teszt eredményét mutatta be, miért nem alkalmazott korrekciót a többszörös összehasonlításból eredő lehetséges torzítás kompenzálására? Ha alkalmazna korrekciót, véleménye szerint ez befolyásolná-e az ERAP1 SNP-kkel kapcsolatos eredményeinek az értékelését?*

Egyetértek a bírálóval, hogy a többszörös összehasonlításból eredő lehetséges torzítás kompenzálására korrekció alkalmazása szükséges. Elvégeztük az adatok elemzését Benjamini-Hochberg féle FDR (False Discovery Rate) módszerrel. A korrekciót követően a teljes populációban észlelt statisztikailag szignifikáns különbségek továbbra is szignifikánsak maradtak, azaz a teljes populáció tekintetében az ERAP1 SNP-kkel kapcsolatos következtetéseink nem változtak. A korai-késői relációban az eltérések kevéssel szignifikancia határérték feletti eredményeket mutattak, ugyanakkor trendszerűen továbbra is láthatók voltak az asszociációk. Mivel ezt részben az alcsoportok alacsonyabb elemszáma magyarázhatja, vélhetően az elemszámok növelésével ezek szintén szignifikáns asszociációt jelentenének.

e. A 11. táblázatban bemutatott esélyarányokról nem ítélt meg, hogy alátámasztják-e az 51. oldalon megfogalmazott új eredményt ("Saját eredményeink szerint a HLA-C pozitív személyekben az rs27524 ERAP1 SNP jelenléte 2,33-szorosra növelte a PsA kialakulásának esélyét....", valamint a következő mondat is, és ugyanez az új megállapítások szakasz 2. pontjában is). A 11. táblázatban bemutatott összehasonlításból (lábjegyzetben: "HLA-C poz/ERAP1 poz személyek összehasonlítva a poz/neg személyekkel") és esélyarányokból (fenti analízis külön-külön a PsV és PsA csoportokban?) nem ítélt meg az összehasonlítás, elemzés menete pontos menete, nem kerültek pontosan feltüntetésre a vizsgált csoportok, a konkrét esetszám, vagyis hogy szerepeltek-e az elemzésben a HLA-C neg /ERAP1 neg személyek, és a kontrollcsoport is elemzésre került-e.

A HLA-C igen erősen asszociált mind a psoriasis mind az arthritis psoriatica kialakulásával. Ugyanakkor a kontroll csoportban is jelentős számban fordultak elő HLA-C egyének, akikben a HLA-C jelenléte ellenére nem alakult ki psoriasis. Feltételezhető tehát, hogy a HLA-C mellett más genetikai hatások is érvényesülhetnek a fogékonyság meghatározásában, melyek a HLA-C hatását erősíthetik vagy gyengíthetik. Ebben a vizsgálatban ezért az ERAP1 SNP-k psoriasisra és arthritis psoriaticára való fogékonyságot befolyásoló hatását a HLA-C rizikó allél jelenlétében kívántuk megvizsgálni, azaz az ERAP1 hajlamosító hatását a HLA-C pozitív populáción belül elemeztük. Az elemzésbe így csak a HLA-C pozitív (heterozigóta vagy homozigóta ritka allél hordozó, lásd 9. Táblázat) betegeket és kontrollokat vontuk be. A kontroll csoportban 73 HLA-C pozitív személy, a psoriasis vulgaris csoportban 124 (ezen belül 86 korai és 38 késői), az arthritis psoriatica csoportban 62 (ezen belül 41 korai és 21 késői) HLA-C pozitív beteg szerepelt. Az elemzés során tehát a HLA-C pozitív PsV és PsA alcsoportokat hasonlítottuk össze a a HLA-C pozitív kontroll alcsoporttal, és vizsgáltuk meg az adott ERAP1 SNP-k asszociációját a betegségekkel. Így az elemzésben a HLA-C negatív személyek nem szerepeltek. Eredményeink szerint ebben a HLA-C pozitív populációban az ERAP1 rs27524 SNP esetén a ritka allél jelenléte 2,33-szorosra növelte a PsA valószínűségét, míg az rs27525 SNP esetén a ritka allél jelenléte csökkentette a PsA kialakulásának valószínűségét.

2. A 7. ábrán nem került feltüntetésre a megfigyelt részesedési arányok varianciája, így pusztán a szövegben (55. oldal) közölt p értékek alapján nehéz következtetést levonni. Mi került összehasonlításra mivel (7 vizsgált hullámhossz tartomány, beteg-egészséges, férfi-nő)? Milyen tesztet végezett, mi volt az elemzés hipotézise?

A 7. ábrán feltüntetett értékek a 6. ábrán grafikusán, illetve a 12. táblázatban numerikusan feltüntetett eredményekből származtatott relatív értékek, azaz azt mutatják meg, hogy az amid-I fehérje szerkezetek teljes integrált területéhez viszonyítva mekkora az adott sáv integrált területe (amennyiben a teljes területet 100%-nak vesszük). A 6. ábrán és a 12. táblázatban az integrált területekre vonatkozó eredmények varianciája ($\pm$ SD) is feltüntetésre került, ugyanakkor az ebből származtatott relatív értékeknél ezt már nem tettük meg. Minden esetben az egészséges minták esetén kapott értékeket hasonlítottuk össze a psoriasisos értékekkel, külön csoportban szerepeltek a férfiak és a nők eredményei (férfi vs. nő összehasonlítás nem történt). Null hipotézisünk az volt, hogy az egészséges és a psoriasisos minták vizsgálata során mért értékek nem különböznek egymástól. A vizsgálatok során Student-féle T próbát alkalmaztunk, a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

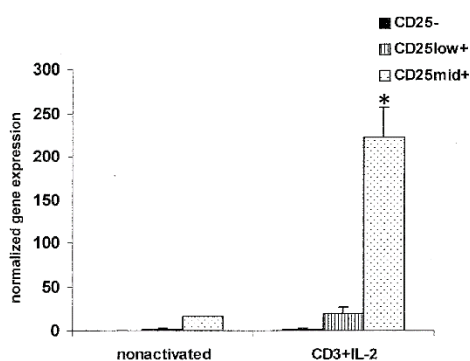
3. a. A GARP mRNS expressziót CD4⁺/CD25⁻ és CD4⁺/CD25⁺ T sejtekben bemutatja a 17. és a 18. ábrán is. Mindkét esetben a 18s-RNS-hez képest normalizált értékek vannak feltüntetve, mégis jelentős (a kezeletlen kontrollban is) eltérés van az expresszió mértékében a két kísérlet között. Mi magyarázhatja ezt?

A 17. ábrán CD4⁺CD25⁻ effektor T sejtekkel és CD4⁺CD25⁺ Treg-ekkel, míg a 18. ábrán csak CD4⁺CD25⁺ Treg sejtekkel végzett kísérletek láthatók (a 18. ábra feliratában hibásan szerepelnek a CD4⁺CD25⁻

sejtek). A 18.A ábra tartalmazza a 18sRNS-hez normalizált mRNS expressziós eredményeket (a B ábra a kezeletlen kontrollhoz mért relatív expressziót mutatja). A 17. ábrán tehát a bal oldali, zöld oszlopok a $CD4^+CD25^-$ sejtek eredményeit, a jobb oldali, kék oszlopok a $CD4^+CD25^+$ sejtek eredményeit ábrázolják, míg a 18. ábrán csak $CD4^+CD25^+$ sejtekkel végzett kísérletek eredményei láthatók, azonban itt a bal oldali fekete oszlopok a FOXP3, míg a jobb oldali fehér oszlopok a GARP eredményeket mutatják. Így 18.A ábra jobb oldali oszlopainak értékeit lehet összevetni a 17. ábra jobb oldali oszlopainak eredményeivel, mivel mindkét esetben az oszlopok $CD4^+CD25^+$ sejtek GARP expresszióját ábrázolják. A két kísérletben az anti-CD3 és anti-CD3+anti-CD28 aktivációs eredmények esetén lényeges eltérés nem észlelhető. Az IL-2 stimulált sejtek eredményeiben valóban csaknem négyszeres különbség látható, azonban a 17. ábrán látható eredmények esetén $CD3+CD28+IL-2$ stimuláció, míg a 18. ábrán feltüntetett kísérleteknél csak $CD3+IL-2$ stimuláció történt, ami magyarázhatja a különbségeket. A kontrollok esetén a kisebb különbség szintén észlelhető, ennek egyértelmű okát nem tudom, ez esetlegesen adódhat az eltérő donorok miatti különbözőségekből.

b. A 17-es ábrán variancia, vizsgálati elemszám és statisztikai értékelés nincs feltüntetve.

A 17. ábrán egy korai vizsgálati eredmény látható, ahol az alacsonyabb elemszám ($n=2$) miatt nem történt statisztikai értékelés és variancia számítás. Az ábrán elsősorban azt kívántuk bemutatni, hogy a $CD4^+CD25^-$ effektor T sejtek még együttes poliklonális stimuláció (anti-CD3 és anti-CD28) és IL-2 jelenlétében sem expresszálják a GARP mRNS-t, szemben a $CD4^+CD25^+$ regulátor T sejtekkel. Egy másik, a doktori értekezésben nem szereplő hasonló vizsgálatunk során a $CD4^+CD25^-$ sejtek GARP mRNS expresszióját hasonlítottuk össze a $CD4^+CD25^{\text{alacsony}}$ és $CD4^+CD25^{\text{közepes}}$ sejtek GARP mRNS expressziójával. Ebben a vizsgálatban a magasabb mintaszám ($n=3$) lehetővé tette variancia számítás és statisztikai értékelés elvégzését is. Amint az az ábrán látható, a $CD4^+CD25^-$ és a $CD4^+CD25^{\text{alacsony}}$ sejtek GARP mRNS expressziója aktivációt követően is alacsony ($CD4^+CD25^-$ sejtek esetén gyakorlatilag nulla) marad, míg a $CD4^+CD25^{\text{közepes}}$ sejtek esetén igen jelentősen megemelkedik, bár az expresszió szintje nem éri el a doktori értekezés 18. Ábráján a $CD4^+CD25^+$ sejtek esetén bemutatott értékeket.



18s RNS-hez viszonyított GARP mRNS expresszió aktiválatlan és aktivált $CD4^+CD25^-$, $CD4^+CD25^{\text{alacsony}}$ és $CD4^+CD25^{\text{közepes}}$ sejtekben. A sejteket 72 óráig immobilizált anti-CD3-mal ($0,5 \mu\text{g/ml}$) aktiváltuk IL-2 (50 U/ml) jelenlétében. A GARP mRNS expressziót kvantitatív valós idejű PCR-rel mértük, és a 18s RNS-hez viszonyítottuk. Az eredmények 3 független kísérletből származnak, az eredmények átlag $\pm$ SEM értéket jelölnek. * $p<0,01$ a nem aktivált sejtek GARP mRNS expressziójához viszonyítva.

c. A 18. ábrára vonatkoztatva levonja azt a következtetést, hogy a poliklonális stimulációra a GARP érzékenyebb, mint a FOXP3, azonban ilyen összehasonlítást csak a poliklonális anti-CD3+IL2 kezelést kapott csoportban végzett.

A 18. ábrára vonatkozó következtetés némiképp félreérthetően lett megfogalmazva: „poliklonális stimuláció és IL-2”, helyett helyesebb lett volna a „poliklonális stimuláció + IL-2” megfogalmazás.

d. A 75 oldalon a megbeszélés részben említi (és erre vonatkozik az 5. pont az új megfigyelések szakaszban), hogy a GARP sejtfelszíni expressziója miatt alkalmasnak tűnt a sejtek szeparálásában történő alkalmazására, azonban ilyen eredményeket nem mutatott be a dolgozatban.

(A válasz megegyezik Prof. Dr. Szegedi Andrea 6.c. kérdésére adott válasszal.) Az első közlemények 2009-ben számoltak be arról, hogy a GARP mRNS mintegy 100x nagyobb mennyiségben expresszálódik az aktivált Treg-ekben mint a nyugvó vagy aktivált nem Treg sejtekben.(4) Mi első ízben 2005-ben, kongresszusi előadáson számoltunk be saját vizsgálatainkról, melyek a GARP-ot, mint a CD4⁺CD25⁺ Treg sejtek specifikus markerét azonosították.(5) 2005-ben nyújtottuk be, majd 2006-ban került közzétételre az a szabadalmunk, mely a Treg-ek azonosítására és izolálására alkalmas, a GARP expresszió alapuló módszert írta le.(6) Későbbi vizsgálatok megerősítették vizsgálataink eredményeit, és igazolták, hogy a Treg sejtek egyedülálló módon expresszálják a GARP fehérjét a sejtfelszínen, és a GARP nélkülözhetetlen szerepet játszik a Treg sejtek működésében.(7-9) A pikkelysömörös Treg sejtek vizsgálatakor,(10) melyeket 2000 és 2003 között végeztünk, még nem volt ismert a GARP szerepe, így a sejtek szeparálására ezt a módszert nem tudtuk alkalmazni.

Irodalomjegyzék

1. Thiebaut R, Kotti S, Jung C, Merlin F, Colombel JF, Lemann M, et al. TNFSF15 polymorphisms are associated with susceptibility to inflammatory bowel disease in a new European cohort. *Am J Gastroenterol*, 2009; 104: 384-391.
2. Yamazaki K, McGovern D, Ragoussis J, Paolucci M, Butler H, Jewell D, et al. Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. *Hum Mol Genet*, 2005; 14: 3499-3506.
3. Yang SK, Lim J, Chang HS, Lee I, Li Y, Liu J, et al. Association of TNFSF15 with Crohn's disease in Koreans. *Am J Gastroenterol*, 2008; 103: 1437-1442.
4. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D. Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009; 106: 13439-13444.
5. Garaczi E, Ferenczi K, Yan C, Goodman W, Sugiyama H, Gyulai R, et al. Glycoprotein A repetition predominant: a novel marker of human CD4+CD25high+ regulatory T cells (conference abstract). *Journal of Investigative Dermatology*, 2005; 124: A117.
6. Garaczi E, Sugiyama H, Gyulai R, Cooper K, McCormick T, University CWR, inventors; Methods and reagents for identifying/isolating t regulatory (treg) cells and for treating individuals. 2006 2006-10-5.
7. Probst-Keppler M, Balling R, Buer J. FOXP3: required but not sufficient. the role of GARP (LRRC32) as a safeguard of the regulatory phenotype. *Curr Mol Med*, 2010; 10: 533-539.
8. Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol*, 2009; 39: 3315-3322.
9. Tran DQ, Andersson J, Wang R, Ramsey H, Unutmaz D, Shevach EM. GARP (LRRC32) is essential for the surface expression of latent TGF-beta on platelets and activated FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009; 106: 13445-13450.
10. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol*, 2005; 174: 164-173.

Pécs, 2017. szeptember 15.

Dr. Gyulai Rolland, PhD
egyetemi tanár