

Válasz Prof. Dr. Bereczki Dániel bírálataira

Doktori értekezés címe:

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

Nagyon köszönöm Professzor Úrnak disszertációm bírálatát és értékelő megjegyzéseit. Válaszomat a bírálatban szereplő számozás szerint, az alábbiakban foglalom össze.

1. Az alkalmazott szoftverek és programok megbízhatósága, valamint az eredmények reprodukálhatósága:

Az általunk használt genetikai analízis programokat és program csomagokat (Pedcheck, MERLIN, TRANSMIT, GOLD, Perl script, MEGA, Roche analysis software version 4.0) a világ vezető genetikai és informatikai csoportjai dolgozták ki. Használatuk nemzetközileg elterjedt és standard jellegűvé vált. Ez lehetővé tette az eredmények összehasonlítását különböző tanulmányokban és egy közös genetikai nyelv használatát. Minden programnak vannak előnyei és hátrányai, melyet figyelembe kell venni az eredmények interpretálásakor, de azok lényegükben hasonlóak rokon programok alkalmazásakor. Mi például több résztanulmányunkban is alkalmaztuk a PDT (pedigree disequilibrium test) és TRANSMIT (haplotípusok transmisszióját vizsgáló) programokat. Hogy megerősítsük a PDT és TRANSMIT elemzés eredményeit, párhuzamosan a rokon FBAT (family based association test) és HBAT (haplotype based association test) programokat is alkalmaztuk a 17q11 tanulmány második fázisában (ld. a disszertáció 2.2.2 fejezetében). Az eredmények egybevágását kiemeltem a 7. és 8. táblázatokban, ahol az analíziseket (PDT-FBAT és TRANSMIT-HBAT) párhuzamosan alkalmaztam. A reprodukálhatóság további bizonyítéka, hogy a 17q11 vizsgálatok első és második fázisú elemzésének eredményei is nagyon jelentős átfedést mutatnak (5. ábra), holott az SNP genotipizálás módszerei és anyagai különbözőek voltak. Ez egy “complex trait” betegségben nagyon erősen szól az eredmény megbízhatósága mellett.

2. A nyilvános adatbázisok információjának megbízhatósága:

Minden tudományos adatbázis szigorú feltételek alapján jön létre, és állandó fejlődés alatt áll. Például az NCBI SNP adatbázisának (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) bővülése és változása a tanulmányaink időtartama alatt is követhető volt. Azonban az SNP-khez rendelt rs szám, melyet a munkatáblázatainkban rögzítettünk és használtunk, nem változott az idők során. Hasonlóan a többi adatbázis is változáson, bővülésen és revízióon megy át idővel. Így minden tanulmány, mely adatbázisban szereplő információt vagy egy adott időben elterjedt elemző programot / szoftvert alkalmaz, az adott időperiódus kontextusában értékelendő, annak információ tartalmához kötötten, ami azonban nem zárja ki az eredmény időállóságát. Ezen kívül, számos technikai csapdája is van minden kísérletes munkának. Mindezek miatt, a tanulmányom legtöbb kísérletében több módszert és többféle analízist használtam ugyanannak a kérdésnek a vizsgálatára, hogy minimalizáljam a tévedés lehetőségét (ld. a 17q11 I. fázisú analízisét és II. fázisú reprodukálását; vagy ld. a mtDNS oxidációs károsodásának egy előtanulmányban HPLC-vel való feltárását, majd a disszertációban immunohisztokémiával és egy komplex molekuláris módszerrel való megerősítését).

Az analitikus programok maguk is revízió alá eshetnek át (pl. TDT->PDT), vagy újabb megközelítések és analízisek terjedhetnek el az idők során (pl. a linkage alapú vizsgálatok, majd LD-re alapuló fókuszált asszociációs vizsgálatok és "genome-wide association studies" szekvenciális használata "complex trait" típusú betegségekben). Ezek a fejlődések azonban általában a hiteles eredmények finomítását és nem elvetését hozzák (Pl. az HLA gének szerepének szekvenciális feltárása SM-ben: Nat Genet 1996;13:469-471; N Eng J Med 2007;357:851-862).

3. Különböző agybankból származó minták használata:

A gén expressziós vagy mitochondriális biokémiai és mtDNS oxidációs károsodásos vizsgálatainkat valóban befolyásolhatta volna a minta eredete és post mortem kezelése. Ezért szigorú kriteriumokat alkalmaztunk minden ilyen vizsgálatban. A 16a és 16b táblázat jelzi a hasonlóan fagyasztott agyminták választásánál kért információt (kód, diagnózis, kor, nem, szöveti struktúra és autolízis idő, mely utóbbi a halál beálltától a minta fagyasztásáig eltelt idő). Ezeket a paramétereket, amennyire a körülmények engedték, illesztettük a minták között. Emellett, a lehetséges bankhoz kötött technikai variációk miatt, elemzéseink alapja az intra-individuális összehasonlítás volt összetartozó plakk, normálisnak tűnő fehérállomány (NTFÁ) és normálisnak tűnő szürkállomány (NTSZÁ) triók között SM-ben, és normál fehér (FÁ) és szürke állomány (SZÁ) között kontrollokban valamennyi funkcionális vagy expressziós tanulmányban (oxidációs mtDNS károsodás, mitochondriális enzim komplex aktivitás, mtDNS szomatikus deleció egyedi sejtekben és az apoptózist szabályozó molekulák expressziójának becslése, stb). Beteg és kontroll közötti (inter-group) összehasonlítást másodlagosan, kiegészítésként végeztünk, melyeket csak esetenként mutattam be az eredményekben. A két agybank használatára azért volt szükség, mert egy helyről nem volt lehetséges elégséges mintát kapni.

4. Az agy donor betegek klinikai betegség típusa és megelőző terápiás kezelése:

Az agybank betegeinek mintáit az interferon és más "disease modifying drug" bevezetése előtt gyűjtötték, és egyik beteg sem részesült akut szteroid kezelésben a halált megelőző 3 hónapban, mivel relapszusuk nem volt. A betegek elsődleges vagy másodlagos progresszív betegségben szenvedtek az agybanki információ alapján. A krónikus gyulladásos plakkok NTFÁ-nyal v. NTSZÁ-nyal való (intra-individuális) összehasonlításában a beteganyagunk más vonatkozású minimális heterogenitása valószínűleg nem vezetett az eredmények torzulásához.

5. A normálisnak tűnő fehérállomány SM-ben:

Minden mintánk besorolása (plakk, NTFÁ vagy NTSZÁ; és FÁ vagy SZÁ) hisztológiai vizsgálaton alapult. Azonban a molekuláris és immunhisztokémiai módszerek elterjedt használata óta tudjuk, hogy az SM az egész agy betegsége: molekuláris elváltozások találhatóak a NTFÁ-ban és NTSZÁ-ban is. Egyes kísérletekben mi is bevontunk ezért molekuláris módszereket a minták további jellemzéséhez (pl. 31 táblázat és a 3.3.3.5 fejezet leírása, ahol egy gyulladásos márkert, a β_2 microglobulin expresszióját is mértük az apoptózisban résztvevő molekulák expressziójával párhuzamosan plakk-NTFÁ-NTSZÁ triókban). Hogy a biológiai minták elemzéséből és a 3) pontban leírt technikai nehézségből adódó zavaró körülményeket minimalizáljuk, elsősorban intra-individuális

összehasonlítást végeztünk az agyszöveteken történt tanulmányainkban és patológiával korreláló kvantitatív eltéréseket mértünk. A human biológiai minták elemzésekor szinte lehetetlen minden csapdát kiküszöbölni. Ezek hatását a megfigyelésekre különböző megközelítések párhuzamos használatával próbáltuk minimalizálni, és az eredményeket a körülmények ismeretének kontextusában értékelni.

6. Halálok egy vizsgált 18 éves SM-es betegben:

Kritikus agyrégiókat is érintő kiterjedt patológia vezetett a beteg korai elvesztéséhez.

7. Halálok az agyi kemokin expressziót vizsgáló tanulmányokban:

Több beteg pneumoniában, vesegyulladásban vagy szepszisben szenvedett az SM terminális fázisában. A kemokineket az ilyen gyulladásos folyamatokat valóban befolyásolhatják a perifériás immunrendszerben. Azonban ha az ilyen terminális folyamatok az agyban is befolyásolnák a molekulák expresszióját, az valószínűleg nem az SM patológiával azonos megoszlást okozna, vagyis nem befolyásolná a plakk vs. NTFÁ és NTSZÁ mRNS összehasonlításból adódó különbségeket.

8. A krónikus aktiv plakk definíciója:

Ezt a kifejezést elterjedten használják az SM patológiai leírásában. A 2.2.4 fejezetben így határozzuk meg a krónikus aktiv plakkot: "A chronic active plaque was defined by the presence of inflammatory activity, hypercellularity around regions showing demyelination, oligodendrocyte loss and some degree of astrogliosis" (Figure 4). Az akut és krónikus gyulladásos plakkot az oligodendrociták elvesztésének, az asztroglíozisnak és a degeneratív folyamatoknak a mértéke különbözteti meg (különösen a plakk centrális részében). A két típus egyidejűleg jelen lehet ugyanazon agyban.

9. Azonosított-e a disszertáció olyan genetikai eltérést SM-ben melyet prenatális diagnosztikában lehetne alkalmazni:

A disszertációban nagyon sok allél és haplotípus asszociációs analízise történt családokban és beteg-kontroll kohortokban. A többszörös összehasonlítás miatti korrekció eredményét feltüntettem és csak a korrekció utáni pozitív eredményeket beszéltem meg. Azonban prenatális diagnosztikában, a disszertációban leírt SM genetikai eredmények egyike sem alkalmazható. Ennek oka nem az eredményeink gyengesége, hanem az SM "complex trait" természete. "Complex trait" esetében nem patogén mutációk határozzák meg a betegséget, hanem hajlamosító genetikai polimorfizmusok, melyek kontrollokban is előfordulnak, csak kisebb %-ban. A betegséggel asszociációban álló variációk együttállása megemeli a betegség hajlamot, de önmagában nem vezet a patológiai folyamat kialakulásához. A hajlamosító gének együttállása és azoknak a környezeti tényezőkkel való kölcsönhatása az, mely a betegség kialakulását meghatározza. Így "complex trait" betegségek esetében, mint az SM is, nem áll prenatális diagnosztikára alkalmas mutáció teszt vagy márkert rendelkezésre. Teljes genom szekvenálással meghatározható lenne, hogy egy egyén milyen "complex" betegségekre lehet hajlamos genetikai variációi alapján, de ez egy probabilitás jellegű és nem diagnosztikus természetű információ lenne, mely környezeti

tényezőktől is nagymértékben függene; és ez a valószínűségi információ jelenleg aránytalanul magas költség árán lenne csak megszerezhető.

10. A prominens optikus neuritis (PON) használata mennyire elterjedt a klinikai gyakorlatban és a PON része-e a tipikus optikus neuritisnek (ON):

A PON (ahogy meghatároztuk, és az opponens is újrafogalmazta kérdésében) az ON egy ritka formája, melyet gyakran használ a kutatói szakirodalom, a tipikus ON-tól való megkülönböztetés céljából. A klinikai alkalmazása is olyan központokban terjedt el, ahol ilyen irányú kutatás folyik. Miután kizártuk a genetikai, toxikus és metabolikus eredetet, a PON-t az ON egy ritka, atípusos formájának tekinthetjük, különösen mikor disszeminált gyulladással demielinizációval társul.

11. Az MR spektroszkópiával talált N-acetil aszpartát (NAA) csökkenés és kolin emelkedés specifikus-e SM-re:

Egyik sem specifikus SM-re: az NAA csökkenés általában axon károsodásra utal, míg a kolin emelkedés membrán átalakulást és mielin károsodást jelez. Mivel az NAA a mitochondriumban szintetizálódik, az NAA csökkenés SM-ben mitochondriális zavarra utalhat. Ezt a megfigyelést is felhasználtam az SM-es neurodegeneráció mitochondriális hipotézisének igazolásához.

12. OND kontrollok többféle neurológiai betegséget képviselnek; mennyire használhatók egy csoportként:

Az én elektronikus és kinyomtatott disszertációmiban nem az 55-dik, hanem a 70-dik oldalon van szó OND-ről (3.2.3.2). Itt Alzheimer és Parkinson kórból szenvedő idős betegek agymintáit használtam mint OND (pozitív) kontrollt, mivel e kórképekben már leírták a mtDNS szomatikus deléciójának akkumulációját, amikor mi még csak felderítő vizsgálatokat kezdtünk SM-ben. Ebben a tekintetben a két kórkép egységes OND-ként alkalmazását indokoltnak tekinthetjük, de az eredményeket egyedileg is jeleztük.

A 27-dik és 40-dik oldalon (2.2.4; 2.3.4) a CCL molekulák expressziójának vizsgálatok szintén használunk OND csoportot a normál kontrollok mellett. Az OND csoportban gyulladással (*Herpes simplex* encefalitiszes, posztinfekciós encefalitiszes) és neurodegeneratív folyamatban szenvedő (Alzheimer kóros) betegek voltak. Alzheimer betegségben azonban szintén van mikroglia aktiváció és gyulladás, ami itt indokolta a két csoport összevonását egy OND kategóriába, az eredmények külön-külön való áttekintését követően (10. táblázat).

13-14. A teljes mtDNS szekvenálás alanyai:

A 3.2.1.3 és 3.3.1.3 fejezetek részletezik a 3 SM-es beteg különleges jellegzetességeit, amiért az mtDNS szekvenálás alanyaiként választottam őket. A 2. számú beteg azért került be a mtDNS genetikai tanulmányba, mert az SM egy agresszív formájában szenvedett, jelentős neurodegenerációval. Az SM diagnózis nem volt kétséges, hiszen a klinikai adatok mellett, paraklinikai, liquor vizsgálati és patológiai adatai (hisztológiai feldolgozással bezárólag) az SM definitív formáját igazolták.

Az 1. számú beteg azért került a tanulmányba, mert egy előzetes, részleges mtDNS vizsgálat szokatlan polimorfizmust detektált ebben a betegben.

Bár az opponens nem tért ki a 3. számú betegre, a teljesség kedvéért megemlítem miért választottuk ezt a beteget be a mtDNS szekvenálásba. Az én átfogó SM-ben történt mtDNS elemzéseimet megelőzően szinte kizárólag csak LHON mutációk SM-ben való előfordulásáról voltak adatok az irodalomban. Ezért akkor nagyon érdekesnek tűnt megvizsgálni (az elsődleges LHON mutációk kizárása után), hogy más patogén mutációk megmagyarázzák-e a PON kialakulását gyulladássos demielinizáció kíséretében a 3. számú betegben.

Összességében az úttörő jellegű, többlépcsős és különböző módon átfogó mtDNS vizsgálatainkban (szekvenálás, szűrés) bizonyos szempontok szerint szelektált és típusos SM-es kohortokat is használtunk, hogy határozott következtetésre juthassunk abban a kérdésben, vajon mtDNS mutációk jelen vannak-e sajátságos vagy gyakori SM fenotípusokban.

15. A sporadikus és a családi SM azonos betegség-e:

Kiterjedt eddigi vizsgálatok, beleértve a genetikai adatokat is erősen támogatják, hogy az izolált és családi SM biológiailag és genetikailag egy entitás (Neurology 1990;40:1354-1358. N Eng J Med 2007;357:851-862).

16. Paraméteres és nem paraméteres tesztek alkalmazása:

Mint a 3) pontban említettem, az agymintákon végzett számos vizsgálat eredményeit összetartozó SM-es plakk, NTFÁ és NTSZÁ mintákban teszteltük (CCL mRNS expresszió, oxidációs károsodás a mtDNS-ben, enzim komplexek aktivitása, szomatikus mtDNS deleció, apoptózist szabályozó molekulák mRNS-e: 2.3.4; 3.3.3.1, 3.3.3.3, 3.3.3.4, 3.3.3.5). Hasonlóan, az összetartozó adatokat intra-individuálisan hasonlítottuk össze kontroll FÁ és SZÁ mintákban. A minták nem normál eloszlásúak voltak. Az e-célra alkalmazott Wilcoxon signed rank teszt egy nem-parametrikus teszt, mely akkor használható mikor egymással kapcsolatban levő mintákat vagy egy mintán végzett ismételt mérések eredményeit hasonlítjuk össze, hogy meghatározzuk, vajon a populációs "mean rank"-jük különbözik-e (Lowry, Richard. Concepts & Applications of Inferential Statistics. <http://faculty.vassar.edu/lowry/ch12a.html>). Egyes kísérletek kiegészítő eredményei között az egymástól független beteg-kontroll mérések adatainak "inter-group" összehasonlítását is megemlítem (szomatikus mtDNS deleció: 3.3.3.4). Az ANOVA (vagy Student's t-teszt) helyett valóban helyesebb lett volna egy nem-parametrikus (pl. Kruskal-Wallis) tesztet alkalmazni. Azonban az elemzés negatív eredményét az valószínűleg nem változtatta volna meg.

17. Egyoldalas vs. két-oldalas χ^2 próba alkalmazása:

Mint említettem, mtDNS munkánkat megelőzően már voltak elsődleges és másodlagos LHON vizsgálati adatok SM-ben, és ezek a másodlagos LHON mutációk magasabb előfordulását jeleztek fehér SM-esekben. Így az LHON vizsgálatainkban elsősorban azt a kérdést vizsgáltuk az egyoldalas χ^2 próba alkalmazásával, hogy ezen mutációk valóban magasabb arányban fordulnak-e elő SM-ben. Vagyis, általánosságban

egyoldalas teszteket akkor alkalmaztunk, mikor előző adatok alapján egyirányú eltérést vártunk a beteg és kontroll csoport között (pl 17 táblázat, 28-29-30 táblázat). Ezzel szemben, kétoldalas teszteket alkalmaztunk, amikor nem volt adat arra, hogy milyen irányú eltérést várhatunk (pl. 21, 23, 24 táblázatok).

18. Egy rapidan rosszabbodó primer progresszív eset:

Ennek a 77. oldalon említett betegnek a részletes leírása a 3.2.1.3 (szekvenált betegeket ismertető) fejezetben megtalálható, mely az általam kinyomtatott disszertáció 61. oldalán van (2. számú eset). Ugyanis anyagot használtunk a betegtől először az LHON szűrővizsgálatokban, majd később szekvenáltuk is a teljes mtDNS-ét. Míg valóban szokatlanul rapid az ismertett kórlefolyás, a betegnél patológiai és hisztológiai feldolgozás történt, így az SM diagnózis határozottnak tekinthető.

19. A Complex I nDNS által meghatározott SNP variánsai és haplotípusai SM-ben:

Az SNP allélok transzmissziós disztorciója által sugalt SM asszociációk valóban elvesztek a Bonferroni vagy a "false discovery rate" korrekciót követően (25. táblázat), azonban a haplotípusok transzmissziós disztorciója által jelzett asszociációk erősebbek voltak és legtöbbjük túlélte a korrekciót. Emellett, a nem-érintett testvérek kontroll-szerű elemzésekor egyik haplotípus sem mutatott transzmissziós disztorciót, megerősítve hogy a detektált haplotípus transzmissziós eltorzulás "SM-specifikus". A "complex trait" betegségekben azonban mindig fontos szem előtt tartani a genetikai heterogenitás fennállását, és a populációs szinten detektálható asszociációk allél variánsainak nem direkt patogén (hanem csak biológiai moduláló) hatását.

20. A 12-13-14 és a 17a,b,c,d ábrák:

Az ábrák bemutatásával kapcsolatos tanácsát köszönöm és a jövőben megfogadom.

A gépelési hibákkal kapcsolatos megjegyzését, ami a *Homo sapiens* és *Herpes simplex* dőlt betűs jelzésére vonatkozik, köszönöm.

A 12-13-14 ábrák függőleges (Y) tengelye nem mértékegységet, hanem mint jeleztem, törési frekvenciát mutat tizedes formában (% helyett).

A 74. oldal 5. sor végére valóban egy extra "3"-as került, hogy egy primer 3' végét jelezze.

Professzor Úr gondos bírálatát és kérdéseit még egyszer nagyon köszönöm.

Tisztelettel,

Kálmán Bernadett

Dr. Kálmán Bernadett

2011.11.20.