

Válasz Prof. Boldogkői Zsolt opponensi véleményére

Köszönetemet fejezem ki Boldogkői Zsolt Professzor Úrnak, hogy a doktori értekezésemet gondosan áttanulmányozta. Köszönöm, hogy a következtetéseket logikusnak és helyesnek ítéli és a doktori munka tudományos eredményeit elegendőnek tartja a cím megszerzéséhez. Az MTMT aktuális nyilvántartása alapján az értekezést megalapozó publikációk közül 6 eredeti tudományos közlemény olyan szakmai lapban jelent meg, amelyek az érintett szakterület legfelső tíz százalékába tartoznak (D1), további 3 pedig olyan szakmai lapban jelent meg, amelyek az érintett szakterület legfelső kvartilisébe tartoznak (Q1).

Az opponensi kérdésekre az alábbiakban válaszolok:

1. Az IL-10 promóter variáns analízise a kandidáns gén megközelítés alapján történt. Ha oki kapcsolatot tételezünk fel egy jelenség és a vizsgált DNS régió között, mindig felmerül a kérdés, hogy más gének szabályozó és kódoló régiói és a genom nem kódoló régiói esetében, mi a helyzet. Nem lehetséges-e, hogy az adott jelenségre/rendellenességre nézve eltéréseket találunk a kontroll és a beteg csoport között?

Multifaktoriális jelenségeket természetesen több genomi régió is befolyásolhat közvetlenül vagy közvetve, akár többszörös áttételen át is. Az általunk vizsgált promóter genotípus a szakirodalom alapján lényeges hatással van az expresszió, mint fenotípusosan megjelenő jelenség mértékére, ami arra utal, hogy az egyéb tényezők inkább közvetve hathatnak. A molekuláris epidemiológiai elemzésben a vizsgált genotípusok betegség-specifikus halmozódását becsültük meg a beteg- és a kontrollcsoport összehasonlításával. A vizsgált genotípusokra vonatkozó következtetéseket befolyásolhatja, ha a folyamatra szintén ható, egyéb tényezők lényegesen eltérő arányban fordulnak elő a beteg- és a kontrollcsoportban. Ezt a Tisztelt Opponens részéről is felvetett lehetőséget az eset-kontroll típusú vizsgálatokban teljes mértékben természetesen nem lehet kizárni, de a kontrollcsoport elfogadhatóságát a következő kérdés feltevésével lehet ellenőrizni: Az esetcsoportba kerülő egyének alkalmasak lettek volna-e a kontrollcsoportba kerüléshez, ha nem alakul ki vagy nem kerül felismerésre náluk az esetdefinícióban megfogalmazott állapot?

- Az esetcsoportot alkotó kolposzkópos és/vagy citológiai atípiák akkori és jelen tudásunk szerint sem anamnesztikusan, sem komorbiditás tekintetében nem kapcsolódik olyan további, egészséget befolyásoló állapothoz, amely miatt nem lehetnének a kontrollcsoportba tartozó véradók. Az esetcsoportot szűrően kiemelt átlagos populáció alkotta. Az átlagos populáció egészségügyi állapotának ismeretében, elenyésző töredéktől eltekintve nem volt várható olyan további betegség, amelyben az

esetcsoporthoz lényegesen eltért volna a kontrollcsoporttól ezért a fenti ellenőrző kérdés alapján elfogadhatónak tartottuk a kontrollcsoportot.

- A vizsgált allélok vonatkozásban a függő változóként vizsgált atípiákon túl nem merült fel olyan további szelekciós nyomás, amely a genotípusok eloszlását akár az eset-, akár a kontrollcsoportban torzíthatta volna.

Felmerült a kérdés, hogy a kontrollcsoport valóban mentes volt-e az esetdefinícióban megjelölt atípiáktól. Ha ezen atípiák incidenciáját nézzük és figyelembe vesszük a véradók jellemzően egészségtudatos életvitelét (ideértve az egészségügyi szűréseken rendszeres részvételt), akkor a kontrollcsoport jó megközelítéssel mentesnek tekinthető.

Összegezve, a kontroll és a betegcsoport közötti eltérések lehetősége a módszer korlátaiból eredően fennáll, de ha voltak is eltérések, azok megítélésünk szerint nem torzíthatták olyan mértékben az eredményeket, ami a következtetések levonását érintené.

2. Az IL-10 promóter metilációs mintázatának analízise is egy előre kijelölt DNS szakasz vizsgálatán alapul.

Az IL-10 promóter CpG metilációs vizsgálatánál más citokin géneken leírt megfigyeléseket hasznosítottunk, melyek szerint a transzkripció aktivitást meghatározó proximalis promóterben azok az egyedi és elszórt CpG dinukleotidok konzerválódtak, amelyek metilációs vagy egyéb transzkripció szabályzásban vesznek részt, de a CpG szigetszerű halmozódása nem jellemző. Egyébként ezen citokin promóterekben az egyedi CpG metiláció a limfoid eredetű sejtek polarizációs elköteleződésének fontos mechanizmusa.

A kiválasztott promóter régióban a leszármazási vonaltól függő CpG metilációs mintázat kimutatásán túl *in vitro* kísérletes rendszerben is alátámasztottuk a metilált CpG pozíciók géncsendesítő hatását. Eredményeink plauzibilis magyarázatot adnak az IL-10 géncsendesítés mechanizmusára, de természetesen nem zárják ki más genomszakaszok ilyen irányú szerepét.

3. A munka során alkalmazott technikák korszerűek, de hiányolom a DNS szekvenálási metodikák alkalmazását. Például a DNS metiláció vizsgálatát is hatékonyabban lehet újgenerációs szekvenálással vizsgálni.

Az elmúlt évben kutatócsoportomban olyan utolsó szerzős közleményem született, amelyben a papillomavírus genom DNS metilációs állapotának meghatározásához újgenerációs szekvenálást alkalmaztunk (László B... Kónya J. *Virus Genes*. 2016 52(4):552-5.). Áttekintve a szakirodalmat jól látható, hogy a teljes genomhoz képest elenyésző méretű targetek (kis

DNS vírusok, célzottan vizsgált egyedi gének, promoterek) szekvenálásában az új generációs szekvenálások "pangenomi" átfogó jellegének előnyei kevésbé érvényesülnek és sokszor csak előzetes target szelekció vagy target dúsítás után lehet hatékonyan alkalmazni, kihasználva sok minta párhuzamos elemzésének a lehetőségét. Az olyan módosult nukleotidok, mint a metilált citozin szekvenálásában (a hosszabb szekvencia adatok és az előzetes DNS módosítás kihagyhatósága miatt) a legújabb harmadik generációs mély szekvenálási technikák hozhatnak áttörést, amelyek CpG szigetek analízisére jól használhatók, de várhatóan a szórványosan előforduló, epigenetikai szempontból kritikus egyedi CpG pozíciók analízisét is lehetővé teszik.

Debrecen, 2017. március 29.

Dr. Kónya József