

Válasz Dr. Tótsaki Árpád egyetemi tanár, az MTA doktora, opponensi bírálatára

Mindenekelőtt hálásan köszönöm Tótsaki Árpád Professzor Úrnak, hogy elvállalta értekezésem bírálatát. Szeretném továbbá megköszönni professzor Úr elismerő szavait, doktori értekezésem pozitív bírálatát és értékes, elgondolkodtató kérdéseit.

A részletes bírálat során feltett kérdésekre a válaszaim a következők:

1. A PARP enzimek farmakológiai gátlásán túlmenő egyéb befolyásolási lehetőségével kapcsolatos kérdésre adott válaszom:

A különböző fehérjék biológiai szerepe valóban nem csak farmakológiai gátlók alkalmazásával vizsgálható.

A kis interferáló RNS-ek alkalmazásával az adott fehérje termelésének közel teljes gátlása érhető el (>80%), azonban hatása csak lassan, napok alatt alakul ki és nem osztódó sejtekben max. néhány hétig áll fenn. Ennek következtében az általunk alkalmazott krónikus állatmodellekben (hónapokig tartó kezelés, leghosszabb kezelési idő 12 hónap volt) nem a legmegfelelőbb módszer. Sejtkultúrában és akut, max 1-2 hetes vizsgálatok esetén azonban valóban egy jó módszerről van szó.

A genetikailag módosított állatokban és a belőlük izolált sejtekben típusosan szintén teljes az adott fehérje hiánya (kivéve, ha a gén teljes kiütése lethális). A KO állatok az eltérés stabil és folyamatos megléte miatt az általunk alkalmazott krónikus élőállat modellekben nagyon jól használhatóak.

Ugyanakkor az alapkutatásban és a klinikai gyakorlatban egyaránt eredményesen és széleskörben használható kismolekulák, valamint a siRNA és a KO állatok használatával elért eredmények nem teljesen fedik egymást. A farmakológiai gátlás esetén a target fehérjének csupán részleges gátlását tudjuk elérni. A másik két módszer ennél lényegesen komolyabb és teljesen specifikus gátlást tud okozni. Azonban ezen módszerek által elért hatásereőséget a klinikumban semmilyen kismolekula használatával nem leszünk képesek elérni, ezért az ilyen vizsgálatokkal elért alapkutatási eredmények transzlálása humán beteganyagra problémás lehet. Ráadásul a hiányzó fehérje esetleges egyéb funkciói – melyek farmakológiai gátlószer adása esetén nem blokkolódnak - szintén kárt fognak szenvedni, ami szintén befolyásolhatja a kapott eredményeket.

Ugyan a genetikailag módosított állatok használatának is lehetnek buktatói, jelenleg mi is folytatunk vizsgálatokat ilyen állatok felhasználásával. Most egy transzgén állattörzs

kardiovaszkuláris jellemzése van folyamatban, de későbbiekben tervezzük KO állatok (pl. PARP-1^{-/-}) használatát is.

2. Az L-2286 kódjelű PARP-gátlónak egyes kardiovaszkuláris szempontból fontos enzimekre/ioncsatornákra és receptorokra gyakorolt hatásával, illetve a hatáserősséggel kapcsolatos kérdésre az alábbi választ adom:

Szisztematikus farmakodinámiás screenelés nem történt ezzel a molekulával, nem teszteltük az esetleges béta-blokkoló képességét, illetve hatását az ACE-enzimre, illetve a Ca-csatornákra. Indirekt adatok alapján azonban azt gondolom, hogy az általunk használt farmakonnak az említett három gyógyszercsoportra jellemző hatásai nincsenek. Ezek közös tulajdonsága a vérnyomás csökkentése. Ilyen hatás azonban sem invazív, sem non-invazív módon mérve nem volt észlelhető. Béta-blokkoló hatás esetén pedig alacsonyabb szívfrekvencia lett volna észlelhető a kezelt csoportban, de EKG vizsgálat, illetve a kisállat ultrahang során rutinszerűen elvégzett EKG-monitorozás során szignifikáns szívfrekvencia eltérés nem volt észlelhető a csoportok között.

Arról sajnos nincs adatunk, hogy ezektől eltérő egyéb nem-specifikus hatással bír a PTE ÁOK Szerves- és Gyógyszerkémiai Intézetében, valamint Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézetében Hideg Kálmán és Sümegi Balázs Professzor Urak által kifejlesztett és az általunk PARP-gátlóként használt L-2286 rendelkezik-e.

Az L-2286 PARP-gátló IC₅₀ értéke az alábbi közleményben került ismertetésre: Kulcsar G, Kalai T, Osz E, Sar CP, Jeko J, Sümegi B, Hideg K: Synthesis and study of new 4-quinazolinone inhibitors of the DNA repair enzyme poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). *Arkivoc* 121, 131, 2003. A cikkben a 15c jelű molekula az L-2286, melynek PARP-gátló IC₅₀ értéke 2,6 µM.

3. A Western-blot során használt normalizációs módszerrel kapcsolatos megjegyzést köszönöm, valóban helyesebb volna a foszforilált fehérjék mennyiségét ugyanannak a fehérjének az összmennyiségével összehasonlítani. Jelenleg már ezt a módszert követi a mi munkacsoportunk is, néhány évvel ezelőtt váltottunk mi is a foszforilálatlan fehérjére való normalizációra, elsősorban a kézirataink bírálatai során tapasztalt konzekvenssé váló javaslatokra. A szívelégtelenséggel kapcsolatos kísérletes munkám kezdetén azonban még általánosan elterjedt módszer volt az állandó mennyiségben jelen lévő fehérjékre normalizálni a foszforilált fehérjék mennyiségét, így akkor mi is ezt a módszert követtük.

4. A PARP-gátlásnak a kötőszövetes átépülésre gyakorolt hatásával kapcsolatos kérdésre az alábbiakban szeretnék válaszolni:

A disszertációban részletezésre kerültek a PARP-gátló kezelésnek a fibrotikus átépülésben szerepet játszó különböző jelátviteli faktorokra való hatásai (PKC α és β , MKP-1 - MAP kinázok, NF- κ B gyulladásos folyamatok). A talán legfontosabb, de mindenképp a legpontosabban ismert hatásmechanizmus ezek közül az MKP-1 – MAPK rendszeren keresztül kifejtett hatás. Sümegi Professzor Úr munkacsoportjának eredményei alapján (Hocsak E, et al. Free Radic Biol Med. 108, 770-784, 2017.) a PARP-enzim gátlása hatására aktiválódik az ATF4/CREB2 transzkripció faktor, amely így a CRE szekvenciához tud kapcsolódni, melynek eredményeképp fokozódik az MKP-1 termelődése. Ez lehet az a hatásmechanizmus, amelynek köszönhetően a PARP-gátlás stimulálja az MKP-1 expresszióját, amely viszont gátolja a fibrotikus átépülésben szerepet játszó MAP kinázok aktivitását.

Emellett irodalmi adatok alapján az ATF4-nek jelentős szerepe van a legfontosabb fibrotikus citokin, a TGF- β hatásának mediálásában is (Selvarajah B et al. Sci Signal. 12(582). pii: eaav3048, 2019.)

5. A mitokondriális dinamikára/minőség kontrollra vonatkozó kérdéssel kapcsolatban szeretnék most reagálni. Huzamosan fennálló magas vérnyomás által kiváltott szívelégtelenség modellben az L-2286 a Drp-1 transzlokációra jelentős gátló hatást fejtett ki. Publikáció alatt álló eredményeink szerint sejtkultúras modellben (H9c2 és neonatál patkány szívizomsejt) MNNG és H₂O₂ stressz esetén azonban emellett a fúziós fehérjékre is pozitív hatást fejtett ki az L-2286. A mitokondriális dinamikára gyakorolt kedvező hatás következtében a mitokondriumok megtartották hálózatos struktúrájukat. Emellett a mitokondrium maximális oxigén fogyasztó képessége és így ATP termelő képessége is szignifikánsan jobb maradt stressz szituációk mellett.

Mivel szívelégtelenségben a hálózatos mitokondriális struktúra felbomlik, olyan terápiás lehetőségek, melyek ezt a hálózatos és megfelelő membránpotenciállal bíró mitokondriális hálózatot megőrzik, potenciálisan hatékonyak lehetnek szívelégtelenségben.

6. A PARP gátlásnak a karcinogenezisre gyakorolt hatásáról a következőkben szeretnék reagálni:

Eddigi munkám során PARP-gátló kezelés mellett nem találkoztam rosszindulatú sejtburjánzással, pedig PARP-gátlóval a leghosszabb kezelési idő megközelítette az egy évet (46 hét), ami egy rágcső élettartamát (2-3 év) tekintve tekintélyes időtartamot jelent.

Genetikailag módosított állatok (PARP-1^{-/-}) testsúlya kisebb talán valamelyest a vad típusú állatokhoz képest, azonban ezt leszámítva teljesen egészségesek. Amennyiben azonban mind a

PARP-1-et, mind a PARP-2 enzimet kiiktatjuk, embrionális korban elpusztulnak az állatok (Boehler C et al. *Methods Mol Biol.* 780, 313-36, 2011.).

A PARP-1 kiütése esetén a DNS javító mechanizmusok redundanciájának köszönhetően egyéb mechanizmusok veszik át a PARP-1 szerepét. Amennyiben azonban egy második tumorképződésre hajlamosító behatás/mutáció is fennáll, ezen esetben valóban fokozódik a daganatok kialakulásának a valószínűsége. Ilyen hatás igazolható a p53^{-/-} + PARP-1^{-/-} kettős KO állatokban, illetve alkiláló ágens adásakor. Azonban vannak olyan genotoxikus ágensek is, amelyek alkalmazása során a PARP-KO állatok nem mutatnak nagyobb érzékenységet, mint a vad típusúak (Kim YM et al. *Genes Dev.* 19, 1951-67, 2005.).

Tumorsejtek esetén azonban a PARP-gátlásnak nemhogy potenciális veszélye van, hanem kifejezetten előnyös is lehet gátlószerek alkalmazása (Bai P. *Molecular Cell* 58, 947-58, 2015.).

Olyan sejtek, amelyekben már károsodott a BRCA-1 és 2 aktivitása, csak a PARP-mediálta DNS repair marad működőképes. Ilyen tumorokban a PARP-gátló olaparib adása kifejezetten citotoxikus hatású a tumorsejtekre. PARP-gátlók emellett akadályozzák a Warburg-effektus kialakulását, mely a tumorsejtekben a hypoxiás környezet miatt javítja a sejtek túlélését. Emellett a tumor őssejtek proliferációjának gátlása, illetve a tumorsejt epithélsejten keresztüli migrációjának gátlása révén pedig gátolja a tumorok növekedését és terjedését (Masanao M. *Cancer Sci* 98, 1528–1535, 2007.).

7. Rezveratrol PARP-gátló hatására vonatkozó kérdésre azt a választ tudom adni, hogy ismereteim szerint a rezveratrolnak nincs PARP-gátló hatása. Azonban diabeteses modellben igazolták, hogy a rezveratrol fokozza a PARG aktivitást (Abdelali A. et al. *Toxicol Appl Pharmacol.* 311, 61-73, 2016.). A PARG fokozza a PARP-aktiváció során keletkező PAR polimerek lebontását. Mivel a poli(ADP-ribóz)-nak (PAR) jelentős szerepe van az intracelluláris jelátvitel modulálásában, a PAR képződés blokkolásának, illetve a lebontás gátlásának hasonló hatása lehetnek a különféle celluláris funkciókra, így a jelátvitelre is, mint magának a PARP-gátlásnak (Lüscher B, et al. *Chem Rev.* 118(3): 1092-1136, 2014.).

8. A rezveratrollal végzett humán klinikai vizsgálattal kapcsolatos kérdésre szeretnék végül válaszolni.

A rezveratrollal végzett humán klinikai vizsgálatba bevont betegek többsége valóban megtartott ejekciós frakcióval rendelkezett (az átlagos EF 50-55% volt). Természetesen voltak a vizsgálatban olyan betegek is, akiknek ennél alacsonyabb volt az EF-je (40-50 %), azonban manifeszt szívelégtelenségre utaló tüneteket náluk sem észleltünk. A rezveratrol kedvező állatkísérletes eredményeit látva felmerült bennünk is a humán klinikai vizsgálat ötlete, amelyet sikerült is lefolytatni időközben. Az utolsó vizitek 2017 decemberében történtek meg, az elmúlt időszakban pedig az adatok összegyűjtése zajlott és jelenleg már a kéziratok publikáció alá

rendezése folyik. A szívelégtelenekben – a koszorúér betegek esetén alkalmazotthoz képest – magasabb dózisban adva a rezveratrolt (napi 100 mg) jelentős kardioprotekciót észleltünk (szisztolés, diasztolés funkció javulás, terhelhetőség javulása, illetve biomarkerek csökkenése).

Végezetül még egyszer szeretném megköszönni Tósaki Árpád professzor Úrnak az alapos bírálatát és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását!

Pécs, 2019. 10. 14.

Tisztelettel és köszönettel:

Dr. Halmosi Róbert