

Válasz Dr. Gereben Balázs bírálatára

Mindenekelőtt köszönöm Tisztelt Bírálónak, hogy elvállalta az MTA doktora címre benyújtott dolgozatom értékelését. Kérdéseire, megjegyzéseire a bírálatban megfogalmazott sorrendnek megfelelően válaszolok.

Köszönöm Bíráló azon észrevételét, amellyel felhívja a figyelmet arra, hogy az értekezés alapjául szolgáló közlemények közül kettő nem hypothalamicus témájú. Valóban, a jelzett két közlemény a hypothalamuson végzett vizsgálatainknál korábbi, ezért az értekezés fő témájától idegennek tűnhet. Ennek ellenére fontosnak érzem ezen eredményeket az értekezéshez szervesen kapcsolódónak feltüntetni, hiszen mintegy két évtized különbséggel hasonló háttérmechanizmusokat tártunk fel különböző agyterületeken, amely mechanizmusok morfológiai megjelenése igen sok egybeesést mutatott: a neuronok körüli gliális elemek mind távoli lézió, mind pedig metabolikus változások hatására hasonlóan reagáltak.

A kérdéses közlemények, még ha nem is szorosan kapcsolódnak a hypothalamicus téma fő csapásirányához - éppen ezért nem is emeltem be az értekezés eredményei közé, és valóban csak a megbeszélés fejezetben hivatkoztam ezen eredményekre és párhuzamokra - jól mutatják, hogy az idegrendszer hogyan képes reagálni a különféle behatásokra. Ebben a tágabb értelemben a két közlemény mégiscsak szorosabban kapcsolódik az értekezéshez, mint azok a szintén idegtudományi közleményeim, amelyeket igen fontosnak tartok, mégis teljesen ki kellett hagynom az értekezésből.

Bírálóm technikai jellegű észrevételt tett, amely egyben a következő megjegyzéséhez is kapcsolódik, miszerint az értekezés témája különböző hypothalamikus területek és sejtcsoportok egymástól független vizsgálatára szorítkozik. Számomra kihívás volt, hogy életművem egy részét képező idegtudományi kutatásokból is csak a hypothalamusra vonatkozó részt tudtam koherens értekezéssé összeállítani – hiszen egy doktori értekezés nem lehet csapongó témaválasztásban. Ezért fájó szívvel ugyan, de kimaradtak olyan, hozzám nagyon is közel álló kutatási témák, mint például a fejlődéstani, vagy a modern képalkotó eljárásokkal készült, különböző állatfajokon (kutya, szarvasmarha, ló, stb.) végzett klasszikus anatómiai vizsgálatok, vagy azon témák, melyek az állatorvosi anatómiára ill. annak oktatására vonatkoznak. Mivel érdeklődésem igen szerteágazó (ez közleményeim

sokszínűségéből is látszik), tudományos tevékenységem azon részét próbáltam bemutatni, amely viszonylagos egységet alkot. Mindenesetre köszönöm Tisztelt Bíráló kritikáját, amellyel kénytelen vagyok egyet érteni, és elsősorban fiatal, tudományos pályájuk elején álló kollégáimnak szolgálhat tanulságul.

A Módszerek fejezetben hiányolja az elektrofiziológiai kísérletek leírását, amely megjegyzés természetesen jogos, azonban ezek az adatok a disszertációhoz csatolt eredeti közleményekben megtalálhatók, s ezzel igyekeztem a disszertáció terjedelmét az elvárt kereteken belül tartani. Ezen mérések módszertanának kihagyása azonban részben szándékos, hiszen a fejezet kidolgozásánál arra törekedtem, hogy az általam végzett ill. irányításommal történt kísérletek technikai hátterét tárjam az olvasó elé. Ugyanakkor úgy érzem, hogy az eredmények tárgyalásánál hiba lett volna a munkacsoportunk által kapott funkcionális eredmények teljes mellőzése.

Az eredmények fejezetben közvetlenül a kísérleti eredmények ill. adatok bemutatása után valóban röviden, egy-egy mondatban értelmeztem a kapott eredményeket, azonban ezt általában szándékosan tettem, és mindig igen röviden – ahogyan ez a mai tudományos közleményekben is bevett módszer. Az eredmények részletes megbeszélésére természetesen a megfelelő fejezetben került sor. A vonatkozó közlemények feltüntetése az egyes alfejezetek elején valóban szerencsésebb lett volna, bár a fejezetek címéből az adott közlemény(ek) egyértelműen beazonosítható(ak).

Bírálatában az egyes fejezetekre vonatkozó felmerült kérdéseire válaszaim a következők:

GnRH – POMC kapcsolatra vonatkozó megjegyzés

A GnRH – POMC kapcsolatra vonatkozó megjegyzéssel teljesen egyet értek, valóban felszínesen fogalmaztam, hiszen – ahogyan a hivatkozott cikkből is látható – a GnRH neuronok kapcsolati rendszere igen szerteágazó. A rendszer finomszerkezete és szinaptológiája azonban kevésbé ismert, vizsgálataink célja is erre irányult.

Kérdés: Nem hypothalamus-specifikus NTPDáz-3 expresszióról van tehát szó, hanem arról, hogy az enzim intracelluláris megoszlása, az egyes kompartmentumokban található

NTPDáz-3 mennyisége eltérő. Ismertek-e adatok arról, hogy az NTPDáz-3 eltérő szerepet játszhat a sejtestben ill. az axonban? Ez megerősítené a célkitűzés háttérében álló feltételezést, miszerint az NTPDáz-3 speciális szerepet tölt be a nucleus lateralis és a nucleus arcuatus területén.

Válasz: Valóban nem az NTPDáz-3 hypothalamus-specificitásáról van szó (vagyis NTPDáz-3 immunreaktív struktúrák a hypothalamuson kívül is előfordulnak), hanem arról, hogy eddigi ismereteink szerint és - fontos kiemelni - az alkalmazott ellenanyagokkal, az agynak csak a nucleus arcuatus és a nucleus lateralis hypothalamicus területén sikerült perikaryonban az enzimet kimutatni.

Ugyanakkor az enzim idegsejt nyúlványokban, a korábban publikáltaknak megfelelően, több agyterületen is megtalálható. Feltételezzük, hogy az NTPDáz-3 enzimnek az a formája, amely tartalmazza az ellenanyag által felismert domain-t, a fent említett magvakban fordul elő. Nem kizárható azonban, hogy létezik az enzimfehérjének egy vagy akár több olyan fejlődési formája is, amely nem tartalmazza ezt a domain-t. Továbbá az is lehetséges, hogy a domain hiányának ellenére is rendelkezik az enzim biológiai aktivitással.

Jelenlegi ismereteink alapján úgy gondoljuk, hogy az NTPDáz-3 a szómában szintetizálódik, azonban a sejtek többsége a nyúlványokban az enzimmaghoz további peptidrészeket kapcsolhat, amelyek az ellenanyag által felismert szekvenciát tartalmazzák.

Kérdés: Az immunfestések kolchicin felhasználásával vagy anélkül készültek?

Válasz: A kísérletek során nem alkalmaztunk kolchicin kezelést, sőt az irodalomban sem ismerek olyan munkát, amely során kolchicint adtak volna NTPDáz-3 immunfestés előtt az állatnak. Bíráló felvetése azonban jogos, hiszen elképzelhető, hogy kolchicin kezelés hatására más agyterületen is jelölődnének idegsejtek. *In situ* hibridizációval valóban pontosabb képet kaphatunk az NTPDáz-3 mRNS-t termelő idegsejtek pontos lokalizációjáról, azonban nem feltétlenül kapunk arról információt, hogy az adott sejtben mennyi fehérje termelődik.

Kérdés: A jelölt által a hypocretin/orexin kísérletekhez felhasznált majmok kaptak-e ösztrogén kiegészítést a kísérletek előtt? Amennyiben nem volt kiegészítés, akkor véleménye szerint ez nem befolyásolhatta-e az orexin sejtek éheztetés után észlelt aktivációját?

Válasz: Nem történt ösztrogén bevitel ezen állatokon az ivartalanítás után. Bíráló ezen észrevétele megalapozott, szerintünk is alacsonyabb szinten történt volna a *c-fos* aktiválás az orexin sejtekben ösztrogén jelenlétében és az ösztrogén valamelyest csökkentette volna az orexin sejtek éheztetés által indukált aktivitását. Úgy gondoljuk azonban, hogy a kísérletek ösztrogén kezelés mellett is hasonló eredményre vezettek volna. Ugyanakkor fontosnak tartom kihangsúlyozni, hogy ezen kísérletek főemlősökben történtek, és az általunk kapott eredmények először engedtek betekintést a főemlősök anyagcsere-szabályozásában résztvevő hypocretin-tartalmú hypothalamicus rendszerbe.

Kérdés: Az értekezésben bemutatott gél nem tartalmaz negatív kontrollt. Hogyan értékeli, hogy ghrelin mRNS-t in situ hibridizációval eddig még nem sikerült kimutatni az agyban?

Válasz: az ábrán nem szerepel a ghrelin mRNS negatív kontrollja, de a szövegben leírtam, hogy ghrelin knock-out egerekben nem találtunk mRNS expressziót. Valóban szerencsésebb lett volna ezt a szövegben egyértelműbben jelezni, vagy a kontrollt bemutatni. A PCR vizsgálatok módszertana valóban hiányzik az értekezésből, azonban az eredeti közleményben ez szerepel. 2003 óta nincs publikáció agyi ghrelin expresszióról. Többen megerősítették viszont az RNS jelenlétét az agyban RT-PCR segítségével (pl. Mondal et al. Regul Peptides 2005 (126) 55-59). Annak magyarázatára, hogy miért nem sikerül kimutatni ghrelin mRNS-t a következő alternatív hipotézisek születtek: 1) ghrelin nem termelődik az agyban, de egyedülálló zsírsav láncának köszönhetően (oktán- vagy más néven kapril sav) a sejtmembránokon keresztül képes bejutni a idegsejtekbe a keringésből. 2) az 1)-el nem ellentmondó hipotézis: azon keringésben lévő sejtekben (pl. immunkompetens sejtek) mutatja ki az RT-PCR a ghrelin mRNS-t amelyek perfúzió hiányában az agyi erekben megtalálhatóak.

Kérdés: Megállapították továbbá, hogy a GnRH és a POMC neuronok között nem volt kimutatható szinapszis. Az elektronmikroszkópos vizsgálat hány sejt felhasználásával történt?

Válasz: Köszönöm Bíráló észrevételét, valóban az értekezésben elírás történt, nem 100 boutonból 25 hozott létre kapcsolatot POMC immunreaktív sejtekkel, hanem 100 vizsgált POMC sejtéből 25 kapott GnRH beidegzést. Az elektronmikroszkópos vizsgálat során pedig összesen 100db POMC sejtet vizsgáltunk meg 5 állatból.

Kérdés: Az NTPDáz-3 Western blot-tal történő kimutatása során a blotokon mintánként mintegy 8 különböző csík látható. Mik lehetnek ezek a csíkok? Mivel a natív NTPDáz-3 számított molekulásúlya 59 kDa ezek a kisebb csíkok aggályokat ébreszthetnek a szérum specificitását illetően.

Válasz: A kísérletekhez azt az ellenanyagot használtuk, amelyet korábban *Belcher és munkatársai* az enzim patkány agyban történő lokalizációja során is alkalmaztak (*Neuroscience* 2006;137(4):1331-1346). Ebben a kísérletsorozatban a szerzők nem bízták a véletlenre az ellenanyag specificitását. Úgynevezett „surface probability analysis-sel” határozták meg elméletileg azokat az aminosav szekvenciákat, amelyek egy ellenanyag számára leginkább hozzáférhetők. Ezt követően, több ilyen fehérjeszakasz szekvenálása után, mesterségesen szintetizálták a kívánt aminosavszekvenciákkal rendelkező peptideket, amiket aztán az állatok immunizálásához használtak. Ezek után egy sor próba keretében tesztelték a preimmun szérumot, az immunszérumot, valamint az ún. „affinity purified” ellenanyagokat is. A mélyebb részletek vonatkozásában utalnék a hivatkozott cikkekre. Mindenesetre, e tesztek még elméletileg is igen kevés lehetőséget hagynak a fals immunfestődési reakciónak. Ezért azt mondhatjuk, hogy a dolgozatban szereplő Western blot eredmények az enzim fehérje szintézisének azon fokozatait mutatják, amelyek tartalmazzák azt az aminosav szekvenciát, amely ellen az ellenanyag termeltetett. E logikai megállapítást a hivatkozott cikk kémikus szerzői (Terrence L. Kirley csoportja) azóta további eredményekkel támasztották alá.

Kérdés: Célszerű lett volna az ösztrogén kezelés hatását blot formájában is bemutatni. Milyen mechanizmusok lehetnek felelősek az ösztrogénnek az NTPDáz-3-ra gyakorolt hatásáért? (Pl. az enzim ko-expresszáldik az ösztrogén receptorral, ill. az enzim génjének 5' határoló régiójában található-e ERE?) Vannak adatok arra vonatkozóan, hogy az NTPDáz-3 aktivitása megnő ösztrogén kezelés hatására?

Válasz: Az NTPDáz-3 szintjének változását szándékosan oszlopdiagrammon mutattuk be, hiszen így minden további analízis nélkül egyértelműen megállapítható az olvasó számára az enzim szintjének időbeni változása. Kétségtelen, hogy beilleszthettem volna a western blot csíkokat az egyes oszlopok alá. Köszönöm Bíráló észrevételét.

Tudomásunk szerint eddig még nem jelent meg arra vonatkozó tudományos eredmény, hogy az NTPDáz-3 ko-expresszáldna ösztrogén receptorral, sőt, arra vonatkozó tudományos eredmények is alig találhatók, hogy az ösztrogén befolyásolja-e az enzim aktivitását. Bíráló felvetésére az a válaszom, hogy jelenleg is folynak azon kísérletek, amelyek adatokkal szolgálhatnak arra, milyen mechanizmusok felelősek az ösztrogén NTPDáz-3-ra gyakorolt hatásáért, azonban konkrétumokkal egyelőre sajnos nem tudok szolgálni.

Végül szeretném megköszönni Dr. Gereben Baláznak tudományos eredményeim elismerését, azt, hogy értekezésemet nyilvános vitára javasolja.

Budapest, 2012. június 5.

Sótonyi Péter