

Válasz Dr. Nusser Zoltán bírálataira

Megköszönöm, hogy Dr. Nusser Zoltán elvállalta disszertációm bírálatát. Külön is köszönöm, hogy kiemeli, hogy a kísérleti módszerek a 21. század neuroanatómiai módszertanának megfelelnek és az eredmények értékelését alaposnak, jól átgondoltnak tartja. Anatómusként érdeklődésem és az értekezés fókuszában is elsősorban a morfológiai kérdések megválaszolása állt. Az eredményeink funkcionális következményeit valóban nem minden esetben tudtuk tesztelni úgy, ahogyan azt például a ghrelin esetében megtettük, de erre nem is volt mindig mód (pl. főemlősök vizsgálata során, ill. megfelelő laboratóriumi körülmények vagy kollaboráció hiányában).

Bírálatában az egyes fejezetekre vonatkozó felmerült kérdéseire válaszaim a következők:

Kérdés: A bíráló nem tartja megalapozottnak, hogy miért „calbindin-D28K, vagy akár más pufferolásra képes calcium kötő fehérjék játszanak kulcsszerepet a SCN szexuális dimorphismust eredményező szerkezetének kialakításában”. Ha a calbindin-D28K expressziója korrelál más pl. ion csatorna, neurotranszmitter receptor vagy intracelluláris jelátviteli pálya expressziójával, akkor a szexuális dimorphismust eredményező folyamatokban nem szükségszerűen a calbindin-D28K, hanem a calbindin-28K-t expresszáló sejtek más, de hasonlóan sejt-típus specifikus kifejeződést mutató fehérjéinek a következménye a szexuális dimorphismus kialakulása.

Válasz: Míg a calbindin-D28K valószínűleg jellemzője azon sejteknek, melyek szexuális dimorphismust mutatnak, okozati kapcsolat nem feltétlenül mutatható ki a kettő között. Ezért is fogalmaztam úgy, hogy ez csak egy lehetséges módja a szexuális dimorphismust eredményező neuronális szerkezet kialakulásának, ill. hogy akár más kalcium-kötő fehérjék is szerepet játszhatnak ebben a folyamatban. Mindenesetre köszönöm, hogy a félreérthető megfogalmazásra és a háttérben húzódó alternatív folyamatokra Bíráló felhívta figyelmemet.

Kérdés: A szerző nem tett erőfeszítést annak érdekében, hogy megállapítsa, hogy milyen mértékű és milyen hosszú ideig tartó „emelkedett” aktivitás szükséges a c-fos expresszió detektálható mértékű megnövekedéséhez. Ezen információk nélkül az

eredmények funkcionális következtetések levonására csak nagyon indirekt módon használhatóak fel.

Válasz: A korai-gén expressziós kísérletek valóban körültekintő vizsgálatot igényelnek, és még nagy egyedszámot felhasználó rágcslókon végzett kísérletek esetén is nehézkes az eredmények interpretálása. Ugyanakkor szeretném aláhúzni annak a jelentőségét, hogy ezen kísérletek főemlősökben történtek. Az alapmegfigyelést minimális számú állaton végeztük el, úgy, hogy figyelembe vettük, hogy nem rágcslók, hanem majmok a kísérlet alanyai, és a perturbáció minimálisan elégséges legyen ahhoz, hogy a kísérletek során a c-fos expresszióban változás következzen be. Igen fontosnak tartom, hogy az általunk kapott eredmények először engedtek betekintést a főemlősök anyagcsere-szabályozásában résztvevő hypocretin-tartalmú hypothalamicus szabályozó rendszerbe. Ezek a kísérletek azóta rágcslókban megerősítést nyertek, ezért további vizsgálatokra ezen fajok természetesen alkalmasabbak. Így tervezzük is, hogy Bíráló által felvetett kísérleti elrendezést (pl. c-fos expresszió aktiválási mértékének és idejének) rágcslókon teszteljük.

Kérdés: Érdekes lett volna megvizsgálni, hogy a POMC neuronok tüzelési frekvenciájának csökkenését hogyan befolyásolja a GABA_A receptorok blokkolása. A szerző által javasolt modellben, ha ugyanazon CRH sejtek kapnak direkt szinaptikus bemenetet az NPY és a POMC sejtektől is, akkor a ghrelin az NPY sejtekből érkező IPSP-k frekvenciáját növeli (inhibíció), míg a POMC sejtekből érkező szinaptikus válaszok frekvenciáját csökkenteni fogja (diszinhibíció). Ennek tükrében milyen összhatást jósol a szerző a CRH sejteken?

Válasz: Bíráló által felvetett fiziológiai méréseket valóban nem végeztük el, de a felvetett érdekes kísérleti elrendezés rendkívül ötletes, sajnálom, hogy nem nekünk jutott eszünkbe. Mindenképpen szeretnénk ezért megvizsgálni, hogy milyen változás történik a rendszerben GABA_A receptor blokkolók jelenlétében. Jóslásokba nem szívesen bocsátkozom, de az eddigi vizsgálataink és tapasztalataink alapján az a véleményem, hogy GABA_A receptorok blokkolása esetén az összhatás a CRH sejtek tüzelési frekvenciájának növekedése lenne ghrelin hatására.

Az 'Anyagok és Módszerek' fejezet hiányosságára, illetve ennek következményeként az elektrofiziológiai kísérletek leírásának hiányára vonatkozó észrevétel jogos, azonban ezek az adatok a disszertációhoz csatolt eredeti közleményben megtalálhatók, így igyekeztem a disszertáció terjedelmét az elvárt kereteken belül tartani. Az elektrofiziológiai mérések módszertanának kihagyása azonban részben szándékos, hiszen a módszerek leírásánál arra törekedtem, hogy az általam végzett ill. irányításommal történt kísérletek technikai hátterét tárjam az olvasó elé. Ugyanakkor úgy érzem, hogy az eredmények tárgyalásánál (különösen a ghrlein estében) nem mellőzhettem a funkcionális eredményeket, hiszen, mint az Bíráló korábban meg is jegyzi, ez a molekuláris-anatómiai-élettani kísérleti megközelítés a legoptimálisabb a felvetett kérdések megválaszolására.

Kérdés: Nem világos bíráló előtt a 'GnRH-POMC kapcsolat kimutatása', ill. 'az arcuatus POMC sejtek parvalbumin tartalmának emelkedése ösztrogén kezelés hatására' kísérletek közötti logikai kapcsolat.

Válasz: A GnRH-POMC kapcsolat és a POMC parvalbumin expressziója között valóban nincsen kauzális kapcsolat. Annak, hogy a két kísérlet sorozat eredményei mégis egy fejezetbe kerültek, egyedüli oka, hogy mindkét esetben a hypothalamicus POMC sejteket vizsgáltuk. Egyébként a parvalbumin emelkedés okát abban látjuk, hogy ösztrogén hatására megemelkedik a serkentő szinapszisok működése a POMC neuronokon, különös tekintettel azon AMPA receptorok mediálta folyamatokra, melyekben a GluR2 alegység nincsen jelen. Ezt a hatást jelenleg is vizsgáljuk.

Kérdés: 4.5 fejezetben leírt eredmények esetében a preszinaptikus neurotranszmitter-felszabadulás valószínűségének és pontos posztzinaptikus kvantál-méret ismeretének hiányában nehéz megjósolni a szinaptológiában bekövetkezett változások élettani hatását.

Válasz: Egyetértek Bírálóval, a szinaptikus környezetben megfigyelhető változások hátterében húzódó (kvantitatív) mechanizmusok ismerete természetesen elengedhetetlen a pontos élettani hatás megismeréséhez. Ugyanakkor talán ezek az első lépések abba az

irányba, hogy az elhízási hajlam idegrendszeri hátterét megértsük. A mai napig alig ismerünk olyan szinaptológiát érintő hatásmechanizmust amely a táplálkozás hatására kialakuló különbségek magyarázatául szolgálna. A felvetett vizsgálatok azonban, itt is kísérletes munkára ösztönöznek Bíráló jóvoltából, hiszen így kapunk majd teljes képet erről az igen összetett szabályozásról.

A 4.5.2. ábra DIO patkányokra vonatkozó információ valóban félreérthetően lett megfogalmazva. 3 hónapos magas zsírtartalmú táplálást (HFD) követően a serkentő (aszimmetrikus) ill. a gátló (szimmetrikus) szinapszisok aránya körülbelül megegyezik a POMC sejtek felszínén, azonban a standard tápláláshoz képest (SD) a serkentő szinapszisok *aránya* megemelkedik, de valóban nem dominálnak a serkentő kapcsolatok a POMC sejtek felszínén.

Kérdés: A 4.6 fejezet az NTPDáz-3 enzim hypothalamicus elhelyezkedését és expressziós szintjének ösztrogén érzékenységet vizsgálja. Szerző első megközelítésre megvizsgálta az enzim szubcelluláris eloszlását, majd az enzim mennyiségének változását ösztrogénkezelés után. Érdekes lett volna megvizsgálni, hogy az enzim mennyiségének növekedése minden szubcelluláris kompartmentben jelentkezik-e?

Válasz: Opponensnek felvetése teljesen jogos, valóban hasznos információval szolgálna, ha ismernénk az NTPDáz-3 esetlegesen előforduló kompartment-specifikus eltéréseit. Sajnos az NTPDáz-3 központi idegrendszerbeli szerepére vonatkozó kutatások azonban erősen kezdeti stádiumban vannak. A kérdéses kísérleteket például közvetlenül az NTPDáz-3 agyi disztribúciójának és neuron-specifikusságának meghatározását követően végeztük, próbálva a kísérletek logikáját a nőivarú reprodukciós folyamatok hypothalamicus szabályozása irányába terelni.

Bíráló által feltett kérdésre, tekintettel a kérdéses kutatási terület kezdeti stádiumára, ezúttal egy újabb probléma felvetésével lehetne a legtalálókban válaszolni: az NTPDáz-3-nak bioszintézisétől a funkcionális enzimmé éréséig, ahogyan azt a vonatkozó közleményben is ábrázoltuk, legalább négy különböző molekulatömegű (Western-blottal azonosítható) formája fordul elő. Ezek közül, mi csak a 85 kDa molekulatömegű frakció változásait

próbáltuk értelmezni, minthogy ez egyezik meg a korábbi közlések szerint az enzim plazmamembránba épült formájának molekulatömegével. Ugyanakkor egyáltalán nem kizárt, hogy az azonosított négy enzimforma közül egynél több is rendelkezik biológiai aktivitással. Ennek ismerete kétségtelenül nagyban segítené az enzim bioszintézisére vonatkozó kérdések megértését. Tudomásunk szerint erre vonatkozó kutatások már folyamatban vannak.

Végül szeretném megköszönni Dr. Nusser Zoltán elismerő szavait, körültekintő bírálatát és gondolatébresztő észrevételeit, megjegyzéseit, amely Bíráló alapos és lelkiismeretes munkáját tükrözi.

Budapest, 2012. június 5.

Sótonyi Péter