

Válaszok Dr. Sümegi Balázs bírálataira

Általános megjegyzések

Köszönöm a Bírálónak az alapos referálást a dolgozattal kapcsolatban, kérdései rávilágítanak olyan kérdésekre, amelyekkel nem foglalkoztam kellő terjedelmében. Külön köszönöm dícsérő szavait az előszó fejezetével kapcsolatban, amelyben igyekeztem a teljes tudományos munkát összefoglalni és a hipotézisek fejlődését bemutatni.

Válaszok a részletes bírálatra

1. A mitokondriális ADP riboziláció, ahogy a saját kísérleteink is mutatták, egy többszereplős folyamat, nem zárható ki, hogy más enzimkomplexek is részt vesznek benne. A sirtuinok közül a SIRT3, -4 és -5 enzimek esetleges kapcsolódása az általunk kimutatott NO-dependens mitokondriális poli-ADP-ribozilációs folyamathoz lehetséges, különösen mivel ismert, hogy a sirtuinoknak van NAD-függő transzribozilációs aktivitásuk. Arra is van irodalmi utalás, hogy a sirtuinokat az oxidatív stressz képes aktiválni, bár ezek a megfigyelések nem közvetlen hatásokon alapulnak. Ez a két megfigyelés azonban külön-külön lett publikálva, ezért egyelőre csak feltevés szinten lehet a kérdést megválaszolni. Egy későbbi saját munkában mi is elkezdtük vizsgálni a sirtuinokat oxidatív stresszben, de ez a munka már túl messzire vezetett a jelen dolgozat tárgyától, ezért ezeket az eredményeket itt nem tárgyaltam (Rejuvenation Res. 2011 Dec;14(6):585-96).

2. A DLDH enzim három mitokondriális komplexnek is alkotóeleme, köztük a piruvát dehidrogenáz komplex, az elágazó láncú aminosav dehidrogenáz komplex és az alfa-ketoglutarát dehidrogenáz komplex. A DLDH önmagában nemigen hasonlít aktivitásában a PAR enzimekhez, viszont a KGDH komplex együttesen igen, hiszen ugyanúgy függ a NAD/NADH aránytól, ATP-től és kalciumtól mint a PARP. Vizsgálatunkat ezért erre az enzim komplexre fókuszáltuk. A Bíráló felvetése jogos, miszerint a vizsgálatokat ki lehetett volna egészíteni a másik két komplex PARP-aktivitás mérésével, amellyel pontosabb képet kaphattunk volna a DLDH szerepéről, ezen kísérletek elvégzésére sajnos nem volt módunk.

3. A mitokondriális preparátumok kontaminációját minden esetben szem előtt tartottuk az eredmények értékelésekor. Ugyan soha nem lehetünk biztosak benne, hogy egy-egy preparátum teljesen tiszta, és az eredmény a vélt enzim komplextől származik, megfelelő kontrollokkal ez jól kezelhető volt. Például a mitokondriális NO és K_{ATP} kísérletekben minden esetben teljes sejt lizátum kontrollokat is alkalmaztunk, és csak abban az esetben vettük bizonyítottan a mitokondriális eredetű jelet, amikor az a teljes sejt lizátumhoz képest legalább nyolcszoros mértékű volt. A nyolcszoros határt a preparátumokban dúsuló biztosan mitokondriális fehérjék mérésével állapítottuk meg. Ez a taktika, amelyet sajnálatos módon a szűkebb szakterületen publikáló kutatók nem alkalmaztak vagy nem mutattak be, vezetett oda, hogy a mitokondriális NOS enzim létét meg tudtuk cáfolni. A

DLDH és KGDH komplexek esetén ez a módszer nem volt célravezető, mert ahogy a Bíráló is rákérdez, más mitokondriális enzimek is felelőssé tehetőek a poli-ADP-ribozilációjáért, különösen ha nagy mennyiségben vannak jelen mint pl. a Komplex 1 enzimek. Ezért a kulcsfontosságú kísérleteket megismételtük rekombináns KGDH és DLDH enzimekkel is, amelyek mentesek ilyen típusú szennyeződéstől, ezzel sikerült megerősíteni az izolátumokon végzett kísérletek eredményét.

4, Köszönöm a felvetést, valóban nem vizsgáltuk, hogy esetleg a szén-monoxidnak is lehet a nitrogén-monoxidhoz hasonló hatása a mikrocirkuláció javítására, amellyel valószínűleg elkerülhető a fehérjék nitrozilációja. A később nitrogén monoxidként azonosított endotél függő relaxációs faktor (EDRF) felfedezője, Furchgott is leírta, hogy a CO képes dilatálni az arteriolákat, bár az NO-hoz képest ezerszeresen nagyobb dózissal volt ehhez szükség (Blood Vessels. 1991;28(1-3):52-61). Emellett a CO, mint endogén molekula fő célpontja a mitokondriális légzési lánc és membránok, tehát legalább olyan komplex folyamatokban vesz részt, mint az általunk vizsgált NO. A CO vizsgálata ezért valóban nagyon időszerű lenne és több ponton is érintkezik az általunk vizsgált rendszerekkel, de ezek vizsgálata önmagában is kiteszi egy másik doktori munka volumenét. A bíráló kérdése jól rámutat arra, hogy az élettudományokban nem lehetséges egy komplex rendszerből kiemelni egy-egy érdekes folyamatot és annak megismerésére koncentrálni, kutatóként mégis kénytelenek vagyunk ezt tenni, hiszen az elvégezhető kísérleteink mennyisége limitálja a megismerhető folyamatok számát. Mindenesetre a továbbiakban igyekszünk majd ebbe az irányba is kiterjeszteni a kutatásokat.

Végezetül ismételten köszönöm Dr. Sümegi Baláznak a bírálói munkáját és kérdéseit, amelyek segítségével remélem jobban be tudom mutatni a legfontosabb eredményeket.

2013. 06. 07.



Dr. Lacza Zsombor