

Válaszok Dr. Bánhegyi Gábor, az MTA doktora bírálatára

Köszönöm, hogy Dr. Bánhegyi Gábor egyetemi tanár elvállalta disszertációm bírálatát és értekezésemet alkalmasnak találta az MTA doktora címre és javasolta a nyilvános vitát.

Formai észrevételek

A felsorolt formai hibákért és a rövidítésjegyzék hiányosságaiért elnézést kérek.

A PARP-7 enzimről a 33. ábra előtt valóban nem írtam, mivel ezzel az enzimmel nem foglalkoztam a kísérletes munkám során. Azonban az eredmények megbeszélése során az volt a célom, hogy a PARP enzimcsalád metabolikus működésével kapcsolatos ismereteket is tárgyaljam, így került a PARP-7 a 33. ábrára.

Az új tudományos eredmények 6. pontja helyesen a következőképp hangzik:

A PARP-2 hiányában megnő a SIRT1 aktivitás és a mitokondriális biogenezis a harántcsíkolt izomban és a májban, ami az energia leadás irányába tolja el a szervezet energiaháztartását.

Tételes észrevételek

- 1. A PARP-1 metabolikus hatásában a NAD⁺ depléciónak központi szerepe van. A NAD⁺ depléciója együtt jár-e a NADH/NAD⁺ arány eltolódásával, illetve érinti-e a NADP(H) készleteket is? Ebben az esetben ezek a változások is magyarázatot nyújthatnának a metabolizmus bizonyos változásaira.*

A PARP-1 depléciója vagy PARP inhibitor alkalmazása megnövelte a NAD⁺/NADH arányt elsősorban a NAD⁺ mennyiség növelésén keresztül, míg a NADH szintek kevésbé változtak. Az arányok ilyen jellegű eltolódása a NAD⁺ szintézis erősödésére is utalhatna, azonban nem folytattuk az ilyen irányú vizsgálatainkat a következő okokból. Mind a NAD⁺, mind a NADH mennyiségét eleinte kolorimetriás eljárással határoztuk meg. A NADH méréseket nehezítette az, hogy lúgos kivonatokból kellett dolgozni, NaOH-ban tártuk fel a sejteket. Ez az extraktum nagyon viszkózus volt, emiatt a pontos pipettázás kérdésessé vált. Másrészt a fehérjetartalom extrém magas volt, ami a fehérjére történő normálástette bizonytalanná. A NAD⁺ meghatározáshoz savas kivonatokat használtunk, ami alacsony fehérjetartalma miatt kérdéses pontossággal működött. A bizonytalanság miatt ezeket az eredményeket nem mutattuk be és a pontosabb tömegspektrometriás eljárást választottuk a NAD⁺ szintek meghatározására.

A NADP(H) szinteket nem határoztuk meg és az irodalomból sem ismertek adatok erre vonatkozóan: a PARP enzimek aktivitása/expressziója és a pentóz-foszfát shunt aktivitása vagy enzimeinek expressziója, a NADH kináz expressziója/aktivitása vagy a mitokondriális NADP reduktázok expressziója/aktivitása között sem ismerünk összefüggést. Azonban – bár elég indirekt logikával – feltételezhető, hogy a PARP-1 aktiváció befolyásolhatja (esetleg növelheti) a pentóz-foszfát shunt aktivitását és ezen keresztül a NADPH szintet. A PARP aktiváció ugyanis a metabolizmus Warburg-típusú átrendeződéséhez vezet, ami gyakran együtt jár a pentóz-foszfát shunt aktivációjával, mivel a NADPH esszenciális a *de novo* nukleotid szintézishez.

2. *A célkitűzések harmadik pontjának a megalapozása hiányzik a bevezetésből. A PARP izoenzimok sejt- és szövetspecifikus expressziója is említést érdemelt volna.*

Valóban nem szenteltem külön fejezetet a PARP enzimek által kiváltott mitokondriális károsodásnak és az ebből kiinduló sejthalál mechanizmusoknak. Azonban az folyamat megértéséhez szükséges hátteret a Bevezetés 1.2 és az 1.3.1 fejezetei tartalmazták. Abban igazat kell adjak a Bírálónak, hogy egy dedikált fejezet valóban segítette volna a megértést.

A PARP izoenzimok expressziós mintázatára vonatkozóan jól tervezett és jól értelmezhető vizsgálatok nem elérhetőek. A PARP-1 és a PARP-2 esetében rendelkezésre állnak *in situ* hibridizáción alapuló eredmények vagy limitált formában a fehérjeszintet is vizsgáló kísérletsorozatok (Schreiber et al., 2002; Schreiber et al., 2004; Wang et al., 1995). Ezekből az eredményekből arra következtettek, hogy a gyorsan osztódó szövetekben és a központi idegrendszerben a legmagasabb a PARP aktivitás. Azonban modern, pl. RT-qPCR-t alkalmazó vizsgálatok nem ismertek. Saját, nem közölt, vizsgálataink arra utalnak, hogy az *in situ* hibridizációs vizsgálatok eredményei jelentősen finomodnak egy RT-qPCR vizsgálat során (pl. a központi idegrendszerben a neocortex felé haladva nő a PARP-1 és -2 expresszió, ami nem derült ki az *in situ* hibridizációs vizsgálatokból), sok szervben pedig nem ismert egyáltalán a PARP expresszió. A minor PARP enzimek expressziós mintázata egyáltalán nem ismert. Nem szabad elfelejteni, hogy az egyes egértörzsek között a jelentős mRNS szintbeli eltérések lehetnek azonos szervekben is, ami nehezíti az ismert adatok integrálását és az ezt követő interpretálását. Az előbbieken felsorolt okokból nem tárgyaltam külön a PARP enzimek szövetspecifikus expresszióját.

3. *A PARP deléció/gátlás által okozott katabolikus eltolódásban a peroxiszómák fokozott biogeneézise is szerepet játszhat. Történtek-e ezirányú vizsgálatok?*

A Bírálónak tökéletesen igaza van ebben a felvetésben. Mind a PARP-1, mind a PARP-2 enzim képes kölcsönhatni a peroxiszóma proliferátor aktivált receptorokkal (PPAR-ok) (Bai et al., 2007; Erener et al., 2012), illetve a fokozott zsírsav oxidáció is utalhat peroxiszóma aktivációra. Peroxiszómákra irányuló vizsgálatokat nem végeztünk, illetve az eredményeinket áttekintve (pl. extramitokondriális oxigénfogyasztás változása) nem találtam erre utaló jelet – mindazonáltal hangsúlyozni szeretném, hogy nem volt célunk ilyen adatok generálása, azaz lehetséges ilyen fenotípus, csak elsiklottunk felette.

4. *A PARP-2 deletált egerek epididimális zsírszövetében kisebb adipocitákat találtak, mely jelenség a szerző szerint adipocita diszfunkcióra utal. Miért?*

Önmagában a kisebb adipocita méret nem utal a zsírszövet alulműködésére, ebben a Bírálónak teljesen igaza van. Kísérleteinkben több, a zsírsejtek működését jellemző markert is megvizsgáltunk *in vivo* és *in vitro* modellekben egyaránt. Eredményeink arra utalnak, hogy a PPAR γ működése szenved zavart a PARP-2 hiányában, ami lipodisztrófiához vezet. Erre utal, hogy míg a PPAR γ 1 és γ 2 expresszió *in vivo* azonos a PARP-2^{+/+} és PARP-2^{-/-} egerekben, a jellegzetes PPAR γ célgén expressziója csökken a PARP-2^{-/-} egerekben. Kizártuk, hogy gyulladásos eredetű lenne a fenotípus (pl. a zsírszövetben a TNF α expresszió nem különbözött a két genotípus között), illetve azt is, hogy a zsírsejtek bézs irányú differenciációja okozná

a morfológiai eltérést (a sejtek UCP1 negatívak mindkét genotípusban). Fontos, hogy *in vitro* modellben (fibroblasztok zsírsejt irányú differenciációja) a PARP-2 hiányában zavart szenved a zsírsejt irányú differenciáció, ami az szöveten belüli, intrinsic diszfunkcióra utal és nem szervkölsönhatást valószínűsít. Molekuláris biológiai módszerekkel megerősítettük, hogy a PARP-2 a PPAR γ konstitutív kofaktora. Természetesen ezek a vizsgálatok nem zárják ki teljes mértékben, hogy a harántcsíkolt izomban és a májban zajló emelkedett katabolizmus szinergisztikusan hasson a PPAR γ diszfunkcióval.

5. *A szerző szerint a PARP-1 hiánya előnyös metabolikus fenotípust hoz létre. Véleményem szerint ez a megállapítás csak a civilizációs betegségektől szenvedő emberiségre igaz.*

Teljes mértékben egyetértek a Bírálóval, amennyiben éhez, alultáplált emberekről beszélünk, akkor a zsírszövet funkciójának a gátlása vagy az energia leadás növelése egyértelműen előnytelen.

6. *A PARP-1 deléciója vagy gátlása nem érintette a SIRT2 és SIRT3 aktivitásokat. A szerző a jelenséget a NAD⁺ kompartmentációjának tulajdonítja. Van-e kísérletes bizonyíték arra, hogy a nukleoplazma piridin nukleotidjainak szintje és redox állapota a citoszoltól függetlenül mozoghat?*

A Bíráló nagyon fontos pontot érintett ezzel a kérdéssel, ami az egyes NAD⁺ kompartmentek átjárhatóságára, egymástól való elkülönülésére vonatkozik. A legjobban a mitokondriális NAD⁺ pool válik el a sejt többi részétől. Sokkal magasabb NAD⁺ szint jellemzi a mitokondriumot (pl. kardiomiocitákban a teljes NAD⁺ mennyiség 75%-a is a mitokondriumokba lokalizálódik (Dolle et al., 2010)) és a mitokondriumban megfelelő enzimkészlet van a NAD⁺ mentési reakciókhoz (Nikiforov et al., 2011) ami önálló NAD⁺-anyagcserére utal. A sejtmag és a citoplazma NAD⁺ metabolizmusa egymástól sokkal kevésbé elkülöníthető technikailag, ezért működésük, kölcsönhatásaik kevésbé ismertek (Houtkooper et al., 2010). Nem találtam adatot arra, hogy a citoplazma és a mag kompartmentek egymástól függetlenül működjenek. Sőt, egy 2014-ben megjelent közleményben (Skoge et al., 2014) az általunk találtak ellenkezőjét írják le, PARP gátlás mellett a tubulin deacetilációját tapasztalták, ami a SIRT2 aktivációjára utal. Sőt, a PARP gátlása mellett idegsejtekben kimutatható a SIRT3 aktiváció is (Kim et al., 2011). Mi lehet az oka az ellentmondásnak? A legegyszerűbb magyarázat, hogy szerv vagy szövetspecifikus hatást láthatunk, azonban semmiféle kísérletes bizonyíték sem támasztja ezt alá. A másik magyarázat az lehet, hogy nem stimulált sejtekben valószínűleg kisebb mértékben befolyásolja a citoplazmatikus poolt az alap PARP aktivitás, mint stimulus esetében, amikor a teljes NAD⁺ készlet fogy el és a két közleményben ilyen jellegű vizsgálatok zajlottak (Kim et al., 2011; Skoge et al., 2014).

Még egyszer köszönöm Dr. Bánhegyi Gábor professzor úrnak a disszertációm bírálatát.

Irodalomjegyzék

- Bai, P., Houten, S.M., Huber, A., Schreiber, V., Watanabe, M., Kiss, B., de Murcia, G., Auwerx, J., and Menissier-de Murcia, J. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 controls adipocyte differentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of the retinoid X receptor/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma heterodimer. *J.Biol.Chem.* 282, 37738-37746.
- Dolle, C., Niere, M., Lohndal, E., and Ziegler, M. (2010). Visualization of subcellular NAD pools and intra-organellar protein localization by poly-ADP-ribose formation. *Cell Mol Life Sci* 67, 433-443.
- Erener, S., Mirsaidi, A., Hesse, M., Tiaden, A.N., Ellingsgaard, H., Kostadinova, R., Donath, M.Y., Richards, P.J., and Hottiger, M.O. (2012). ARTD1 deletion causes increased hepatic lipid accumulation in mice fed a high-fat diet and impairs adipocyte function and differentiation. *Faseb J* 26, 2631-2638.
- Houtkooper, R.H., Canto, C., Wanders, R.J., and Auwerx, J. (2010). The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr Rev* 31, 194-223.
- Kim, S.H., Lu, H.F., and Alano, C.C. (2011). Neuronal Sirt3 protects against excitotoxic injury in mouse cortical neuron culture. *PLoS One* 6, e14731.
- Nikiforov, A., Dolle, C., Niere, M., and Ziegler, M. (2011). Pathways and subcellular compartmentation of NAD biosynthesis in human cells: from entry of extracellular precursors to mitochondrial NAD generation. *J Biol Chem* 286, 21767-21778.
- Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J.Biol.Chem.* 277, 23028-23036.
- Schreiber, V., Ricoul, M., Amé, J.C., Dantzer, F., Meder, V.S., Spenlehauer, C., Stiegler, P., Niedergang, C., Sabatier, L., Favaudon, V., et al. (2004). PARP-2: structure-function relationship. In *Poly(ADP-ribosyl)ation*. B. A., ed., pp. 13-31.
- Skoge, R.H., Dolle, C., and Ziegler, M. (2014). Regulation of SIRT2-dependent alpha-tubulin deacetylation by cellular NAD levels. *DNA Repair (Amst)*, DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.1004.1011.
- Wang, Z.Q., Auer, B., Stingl, L., Berghammer, H., Haidacher, D., Schweiger, M., and Wagner, E.F. (1995). Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev* 9, 509-520.

Debrecen, 2014. november 5.