

## Válasz Dr. Gallyas Ferenc az MTA doktora bírálatára

Mindenek előtt szeretném megköszönni Dr. Gallyas Ferenc professzor úrnak disszertációm bírálatát, bírálatának pozitív hangnemét.

### *Általános megjegyzések*

A dolgozat megírása során törekedtem arra, hogy az összes rövidítés értelmezését megadjam az első használat helyén és feltüntessem a rövidítések jegyzékében. Egy génexpressziós vizsgálatokat ismertető disszertációban rengeteg rövidítés jelenik meg, amihez hozzáadódnak a módszertan rövidítései is. Úgy tűnik nem sikerült ezeket maradéktalanul megjeleníteni a rövidítésjegyzékben, amiért elnézést kérek.

A tömör fogalmazás és az ábrák mérete az arra való törekvésemből adódik, hogy bár nincs felső korlátja a disszertációnak, azonban nem szerettem volna „visszaélni” sem a bírálók türelmével, sem az így is vastkos terjedelmet tovább növelni.

Szeretnék reagálni arra a megjegyzésre is, hogy eltérés van a különlenyomatok címe és a disszertációban megadott címek között. Én két eltérést találtam, az egyik esetben valóban hosszabb cím került a disszertációba (Cell Metab. 2011 13(4):450-60; PARP-2 és a SIRT1 kapcsolatát leíró közlemény). A PARP-2 és a PPAR $\gamma$  kapcsolatát leíró közlemény címében hiba volt (PPAR-2 vs. PARP-2), így erratumot kértünk, amit a közlemény elé fűztem és ez magyarázza a különbséget.

### *Tételes megjegyzések*

*1/ A C57/Bl6J és az Sv129 eltérő genetikai háttérű PARP-1 kiűtött egerek eltérően reagáltak a magas zsírtartalmú diétára. Mennyiben magyarázhatja az eltérő genetikai háttér, és mennyiben az eltérő genetikai manipuláció ezeket a hatásokat? Végzett valaki farmakológiai PARP-gátlással összehasonlító vizsgálatot a fenti két törzsen?*

A Bíráló a PARP terület egyik legégetőbb problémájára mutatott rá, úgy tűnik, hogy a PARP aktiváció következményeit jelentősen befolyásolja a genetikai háttér.

A probléma megértéséhez előre kell bocsájtani, hogy két különböző laboratóriumban két különböző módon előállított ES sejt-típusú PARP-1 konckout egértörzs létezik, amelyeket válaszómban az előállítók szerint nevezek el Wang egérnek (Zhao-Qui Wang, (Wang et al., 1995)) és de Murcia egérnek (Gilbert de Murcia (Menissier-de Murcia et al., 1997)). A két egér előállításához használt konstruktok különböznek, a Wang egérben elvileg megjelenhet egy rövidebb fehérje - a PARP-1 N-terminálisának egy része, míg ez a de Murcia egérben gyakorlatilag kizárható. Hogy a két törzs összehasonlítása szinte lehetetlen legyen a két törzs különböző háttéren van: Wang – Sv129, de Murcia - C57/Bl6J; a vizsgálatainkban egyébként ez utóbbi törzset használtuk. Saját adataink azt támasztják alá *in vivo* és sejtes kísérleti rendszerekben (genetikai és farmakológiai PARP-1 gátlás mellett), hogy a PARP-1 deléciója/gátlása nettó energia leadással jellemezhető fenotípust hoz létre, míg a Wang egerek hízekonyak és az energia leadásuk csökkent (Devalaraja-Narashimha and Padanilam, 2010; Wang et al., 1995). A Wang egereken végzett kísérletsorozatok csak állatkísérleteken alapszanak, sejtes modelleket

nem használtak. Az összehasonlítást minden bizonnyal nehezíti, hogy különböző laboratóriumokban tartott, különböző mikrobiom összetétellel jellemezhető állatokat kellene összehasonlítani (a mikrobiom jelentős hatást fejt ki a metabolikus egyensúlyra). Legjobb tudomásom szerint Dr. Michael Hottiger (Zürich) laboratóriumában történtek erőfeszítések az egértörzsek azonos genetikai háttérre keresztezésére, értelemszerűen az egy helyen tartás kiegyenlíti a mikrobiom eltéréseket is. Dr. Hottiger személyes közlése szerint (2014 tavasza) – a részletek pontos ismerete nélkül - eltéréseket találtak a két törzs között a NAD<sup>+</sup>-metabolizmusban, ami értelemszerűen befolyásolja a SIRT1 – PARP-1 egyensúlyt. Ezek az adatok azonban azóta sem kaptak nyilvánosságot.

A metabolikus vizsgálatok széleskörű standardizálást igényelnek, és könnyen lehet egymásnak ellentmondó eredményekre jutni. Jó példa erre az a probléma, hogy a PARP-1 gátlása vagy deléciója a zsírsejt irányú differenciációt gátolja vagy serkenti. Ezekben a kísérletekben a PARP-1 csendesítés, deléció vagy farmakológiai gátlás eltérő eredményekre vezet, sőt a kísérleti rendszer (3T3-L1 sejtek, primer fibroblasztok, őssejtek) vagy a PARP inhibitor (MK488 vagy PJ34, illetve az alkalmazott koncentráció) is szembeállíthatja a kísérletek eredményeit (Bai et al., 2011; Erener et al., 2012; Smulson et al., 1995), illetve Dr. Michael Hottiger és Dr. W. Lee Kraus személyes közlése). A PARP inhibitorokat alkalmazó kísérletekben, különösen az *in vivo* kísérletekben, ezen felül figyelembe kell venni egyes PARP inhibitorok aspecifikus vagy részleges off-target hatását is (Antolin et al., 2012; Antolin and Mestres, 2014; Lechaftois et al., 2014).

A kérdéshez kapcsolódóan, de érdemes megemlíteni a következő problémát. A PARP inhibitorok bevezetése a citosztatikus terápiában nagy reményekkel és gyors sikerekkel kecsegtetett, azonban több klinikai II. fázis kipróbálás sikertelen volt (itt nem a cink ujjakat támadó iniparib aspecifitására gondolok (Patel et al., 2012)). A klinikai kipróbálásokat végző csoportok jelenleg a genetikai háttér feltérképezésére koncentrálnak (pl. hipomorf BRCA allélok kiszűrése) abban a reményben, hogy a betegek jobb sztratifikálásával esetleg „előállítható” olyan betegpopuláció, ahol a PARP inhibitor kezelés valós előnyt jelenthet (forrás: 2013 PARP konferencia, Quebec City, Kanada).

*2/ A PARP-1 deléció hatására jelentősen megnőtt a NAD szint barnazsírban (kb. 180%) és harántcsíkolt izomban (150%) (5B ábra). Elképzelhető ilyen különbség, miközben a vad típusú egerekben is csak az háttér PARP aktivitás dolgozott?*

Ez a különbség a mi figyelmünket is felkeltette, bár egyértelmű magyarázatot nem találtunk rá és nem is végeztünk mélyreható vizsgálatokat - számunkra egyértelműen a NAD<sup>+</sup>-szint emelkedése volt érdekes. Az egyik lehetséges magyarázat a jelenségre, hogy a barna zsírban (BAT-ban) több mitokondrium van és ezért esetleg több szabadgyököt termelődik, mint a vázizomban, ahol kevesebb mitokondrium található (Barja de, 1992). Magasabb szabadgyök szintek több DNS törést okoznak és magasabb alap (háttér) PARP aktivitást eredményeznek a BAT-ban. A PARP-1 deléciója a BAT-ban ezért nagyobb mértékű NAD<sup>+</sup> spórolást eredményez, a harántcsíkolt izomhoz képest. A másik

magyarázat az lehet, hogy a NAD<sup>+</sup> szintézis és mentés működésének mértéke is eltérhet a két szövetben.

*3/ Eltérő hatásmechanizmussal, de a PARP-1 és PARP-2 deléciónagyjából hasonló mitokondriális DNS mennyiségi növekedést okozott. Ugyanakkor a PARP-1 deléción védő hatása különböző paradigmákban sokkal kifejezettebb volt. Magyarázható-e a védő hatás eltérése pusztán a NAD-fogyasztással? Annál is inkább érdekes ez a kérdés, mert NAD depléción esetén az ember nekrotikus sejthalált várna. Kimutatható volt ilyen szintű nekrotikus sejthalál a vizsgált szövetekben vagy sejtekben?*

A Bíráló által feltett kérdés megválaszolása bonyolult, engedje meg, hogy részekre bontva adjak választ. Az első megjegyzés esetében a bíráló valószínűleg a mitokondriális aktivitásra vagy biogenezisre gondolt, ahol mind a PARP-1, mind a PARP-2 deléción esetén krónikus hatások érvényesülnek, így inkább a mitokondriális biogenezis beindulása a mérvadó, mint a gyors aktivitás növekedés. A mitokondriális biogenezis nem jellemezhető egyetlen mitokondriális markerrel, pl. a mitokondriális DNS mennyiségével. Több paramétert kell együtt értékelni, mint a mitokondriális membránpotenciál, oxigénfogyasztás, gyöktermelés vagy a mitokondriális gének expressziója. Vizsgálható a mitokondriális struktúra változása is. Nehezen megmagyarázható, hogy az egyes markerek közül miért az egyik vagy a másik domináns, de saját tapasztalatunk az, hogy a mitokondriális DNS mennyisége az egyik „legérzékenyebb” marker a rendszereinkben.

Annak eldöntése, hogy a PARP-1 deléción vagy gátlás hatása mennyire múlik csak a NAD<sup>+</sup>-ra gyakorolt hatásán ismét egy összetett kérdés. A disszertáció 33. ábráján is bemutatom, hogy mennyire bonyolult metabolikus hálózatokon keresztül képesek a PARP-ok a mitokondriális aktivitás befolyásolására/szabályozására. Ezek együttes vizsgálatát még nem végezték el.

A metabolikus kísérletekben nem tapasztaltunk nekrotikus hatásokat.

*4/ Kísérleteikben teljesen indokolható módon zsír, máj és izomszövetet használtak. Mi indokolta a HEK sejtek használatát a könnyű transzfektálhatóságon kívül?*

Engedje meg a Bíráló, hogy rövid választ adjak: a HEK sejteket felhasználását csak könnyű transzfektálhatóságuk indokolta.

*5/ A 3D, 4B, 6E, 7A, 9G, 10C, 13A, 18A, 19A,G, 22F, 23F, 24G, ábrákon feltüntetett relatív expressziós növekedések viszonylag kismértékűek voltak (<<100%). Általában 300%-os génexpressziós növekedést szoktak szignifikánsnak elfogadni. Mennyiben tekinthetőek a felsorolt változások nem statisztikai értelemben szignifikánsnak.*

Engedje meg a Bíráló, hogy ne értsek teljes mértékben egyet megjegyzésével. Egyrészt a statisztikai szignifikancia nem függ attól, hogy milyen mértékben különböznek egymástól a csoportok, hanem a csoporton belüli szórástól. Microarray kísérletekben valóban szoktak „húzni egy vonalat” (+/- 1,5X vagy +/-2X expressziós változás), ami alatt nem foglalkoznak génexpressziós változásokkal (amelyek

attól még lehetnek szignifikáns változások, a szoftverek ezeket a változásokat képesek listázni és kezelni, ezért, ha szükséges, vizsgálhatóak is). Az általunk kivitelezett RT-qPCR reakciók alkalmasak kismértékű különbségek reprodukálható detektálására és kvantifikálásra. Az általunk bemutatott adatok statisztikai elemzése megfelelő volt (l. az alábbi pont). Továbbá ahhoz sem férhet kétség, hogy a bemutatott változásoknak van biológiai hatása.

*6/ A 3.5 pontban a statisztikai feldolgozásnál  $p < 0.01$  és  $p < 0.001$  szignifikancia szinteket is feltüntetett. Szigorúan véve a statisztikai módszerek csak  $n > 50$ -es csoportok esetén használhatóak, így az élettudományokban használatos elemszámok mellett még a  $p < 0.05$  szintet is rosszállóan nézik a statisztikusok. Javaslom a jövőre nézve a  $p < 0.05$  szint használatát olyan esetekre is, amikor a statisztikai szoftver ennél magasabb szintet mutat.*

Engedje meg a Bíráló, hogy ezzel a felvetésével se értsek egyet. Parametrikus tesztek alkalmazhatóak, amennyiben a csoportok normál eloszlást mutatnak vagy eloszlásuk normál eloszlássá transzformálható és az egyes csoportok szórásai nem különböznek egymástól. A parametrikus tesztek esetében a csoportok mérete az általunk alkalmazott méretű lehet ( $n \sim 10$ ) és az eredmények értelmezhetőek. A közlemények egy részében ennek megfelelően jeleztük is, hogy a statisztikai feldolgozást a normalitás vizsgálatával kezdtük. Amennyiben a csoportokon belüli eloszlás nem normál eloszlást mutat, akkor nem parametrikus tesztek végezhetőek csak el, ahol a Bíráló által jelzett elemszámok szükségesek.

*7/ Miért tubulint használtak az egyenletes fehérjefelvétel ellenőrzésére függetlenül attól, hogy a vizsgált fehérje milyen sejten belüli lokalizációval rendelkezik.*

Az összes bemutatott kísérletben teljes kivonatokat vizsgáltunk (kivéve a 20A ábrát, ahol magokat izoláltunk és anti-H1 hiszton antitestet használtunk normalizálásra), ami tartalmaz tubulint, vagyis az anti-tubulin antitest alkalmas a felvitt fehérjemennyiség jellemzésére.

*8/ A 11. ábrán az 1. panelben a PARP-1 sávok jól látszanak mind a normál módon táplált, mind az éheztetett állatokban. Ugyanakkor, a 2. panelben nem látszanak a PARP-1 sávok a normál módon táplált állatokban, csak a magas zsírtartalmú diétán tartottakban. A két normál módon táplált csoportnak meg kellene egyeznie. Mi volt az eltérés oka?*

A 11. ábrán két külön membránt láthatunk, amelyeket külön-külön hívtunk elő, emiatt különbözik a kontroll állatok jele.

*9/ A PARP-1 és PARP-2 génkiütött egerekben viszonylag mérsékelt génexpressziós változások mellett jelentős funkcionális változásokat (hidegtűrés, oxigénfogyasztás, futásmennyiség, betegségekkel szembeni védelem) tapasztaltak. Nem lehetséges, hogy a „funkcionális többlet” a jelátviteli rendszerek és mitokondriális működés pozitív befolyásolásából származik?*

Teljes mértékben egyetértek a Bírálóval. A PARP-2 és a PARP-1 közti hatások közti különbség egyre kifejezettebb (pl. gyulladás, hematopoietikus differenciáció, metabolizmus, stb.) (Szanto et al., 2012; Yelamos et al., 2008). A különbség oka nem nyilvánvaló, hiszen a két fehérje jelentős szerkezeti és funkcionális homológiát mutat, azonban a jelátviteli útvonalak és a mitokondrium közti kapcsolat befolyásolását valóban egyedül a PARP-1 enzimmel hozták kapcsolatba. Mint ezt a disszertációban is kifejtettem a PARP-1 egy bonyolult, több visszacsatolást tartalmazó hálózat tagja, amely több ponton képes módosítani a mitokondriumok aktivitását. Több kísérletsorozatban kimutatták, hogy jelátvitel vagy az energiaszorongás útvonalak aktivitásának változása (például a PARP-1 kölcsönhatása a PI3K – Akt útvonallal (Tapodi et al., 2005) vagy a HIF1-gyel (Martin-Oliva et al., 2006) fontos a PARP-1 által kifejtett mitokondriális hatásokhoz, ami arra utal, hogy a Bíráló felvetése valószínűleg igaz.

Újból szeretném megköszönni Dr. Gallyas Ferenc professzor úrnak disszertációm bírálatát, értékes felvetéseit és támogató javaslatát.

## Irodalomjegyzék

- Antolin, A.A., Jalencas, X., Yelamos, J., and Mestres, J. (2012). Identification of Pim Kinases as Novel Targets for PJ34 with Confounding Effects in PARP Biology. *ACS Chem Biol*, DOI: 10.1021/cb300317y.
- Antolin, A.A., and Mestres, J. (2014). Linking off-target kinase pharmacology to the differential cellular effects observed among PARP inhibitors. *Oncotarget* 10, 10.
- Bai, P., Canto, C., Oudart, H., Brunyanszki, A., Cen, Y., Thomas, C., Yamamoto, H., Huber, A., Kiss, B., Houtkooper, R.H., et al. (2011). PARP-1 Inhibition Increases Mitochondrial Metabolism through SIRT1 Activation. *Cell Metab* 13, 461-468.
- Barja de, Q.G. (1992). Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress? *Free Radic.Biol.Med.* 13, 325-340.
- Devalaraja-Narashimha, K., and Padanilam, B.J. (2010). PARP1 deficiency exacerbates diet-induced obesity in mice. *J Endocrinol* 205, 243-252.
- Erener, S., Mirsaidi, A., Hesse, M., Taden, 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.
- Lechaftois, M., Dreano, E., Palmier, B., Margail, I., Marchand-Leroux, C., Bachelot-Loza, C., and Lerouet, D. (2014). Another "String to the Bow" of PJ34, a Potent Poly(ADP-Ribose)Polymerase Inhibitor: An Antiplatelet Effect through P2Y12 Antagonism? *PLoS One* 9, e110776.
- Martin-Oliva, D., Aguilar-Quesada, R., O'Valle, F., Munoz-Gamez, J.A., Martinez-Romero, R., Garcia Del Moral, R., Ruiz de Almodovar, J.M., Villuendas, R., Piris, M.A., and Oliver, F.J. (2006). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 66, 5744-5756.
- Menissier-de Murcia, J., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., et al. (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 7303-7307.

Patel, A.G., De Lorenzo, S.B., Flatten, K.S., Poirier, G.G., and Kaufmann, S.H. (2012). Failure of iniparib to inhibit poly(ADP-Ribose) polymerase in vitro. *Clin Cancer Res* 18, 1655-1662.

Smulson, M.E., Kang, V.H., Ntambi, J.M., Rosenthal, D.S., Ding, R., and Simbulan, C.M. (1995). Requirement for the expression of poly(ADP-ribose) polymerase during the early stages of differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, as studied by antisense RNA induction. *J.Biol.Chem.* 270, 119-127.

Szanto, M., Brunyánszki, A., Kiss, B., Nagy, L., Gergely, P., Virag, L., and Bai, P. (2012). Poly(ADP-ribose) polymerase-2: emerging transcriptional roles of a DNA repair protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69, 4079-4092.

Tapodi, A., Debreceni, B., Hanto, K., Bogнар, Z., Wittmann, I., Gallyas, F., Jr., Varbiro, G., and Sumegi, B. (2005). Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress. *J Biol Chem* 280, 35767-35775.

Wang, Z.Q., Auer, B., Stingl, L., Berghammer, H., Haidacher, D., Schweiger, M., and Wagner, E.F. (1995). Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev* 9, 509-520.

Yelamos, J., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2008). Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends Mol.Med.* 14, 169-178.

Debrecen, 2014. november 5.