

Válasz Tímár József professzor úrnak a

**„Neuropatológiai vizsgálatok neurokognitív zavarral járó betegségekben”**

című MTA Doktori Értekezésem bírálatára

Megtisztelve köszönöm, hogy Professzor Úr vállalta a Magyar Tudományos Akadémia Doktori Tanácsa felkérését doktori értekezésem opponensi feladatainak ellátására.

Köszönöm alapos és konstruktív kritikai megjegyzéseit, kérdéseit, az értekezést és az annak alapjául szolgáló munkákat illető elismerő szavait.

Válaszaimat a bírálatban megfogalmazott és a válaszaim előtt dőlt betűvel jelzett kérdések sorrendjében adom meg.

- 1. Felmerül a bírálóban hogy a BRDU pozitivitás S-fázisba való belépést jelent (in vitro assay) Az idegsejtek posztmitotikus állapotból in vivo nem tudnak visszalépni a sejtciklusba, tehát in vitro M-fázisba történő tovahaladás is volt észlelhető? Valamint hogy S-fázisra vagy M-fázisra utaló jelek in vivo is megfigyelhetők voltak?*

Azt, hogy az idegsejtek beléptek a sejtciklusba, igazolja a ciklin D1 és retinoblasztoma protein (pRb1) expressziója, mivel mindkettő G1-fázis marker. A BRDU-pozitivitás pedig azt igazolja, hogy eljutottak az S-fázisig. Azt, hogy nem jutottak M-fázisba, a mitózis hiánya jelzi. Az apoptózis versus mitózis melletti döntés a G2/M átmenet ellenőrző pontjánál (checkpointnál) történik, mivel az S- és G2-fázisok között nincs ellenőrző pont.

- 2. Felmerül a kérdés hogy ebben az esetben a PARP aktiválódás fiziológias szükséges folyamat amely a frissen keletkezett DNS-hibák kiküszöbölését szolgálja, így a PARP gátlás a keletkezett mutációk véglegesítését eredményezheti?*

A traumás agykárosodás során a PARP1 a NOS-indukció következtében létrejövő egyszálú DNS-törések hatására, azok kijavítása céljából aktiválódik (Beck *et al.*, Exp Cell Res, 2014, 329: 18-25).

A PARP a DNS hibajavítás mellett kaspáz-független apoptózist is indukál az apoptózis indukáló faktor (AIF) révén. A PARP feltehetően a mitokondriális respirációra hatva okoz mitokondriális diszfunkciót, akadályozva az ATP-termelést is (Stoica *et al.*, J Neurotrauma, 2014, 31: 758-772). A PARP1-függő NF- $\kappa$ B aktiváció szintén pro-inflammatorikus gének átíródását és neurotoxikus molekulák (NOS, ROS, TNF $\alpha$ ) expressziójával járó mikroglia aktivációt idéz elő. A PARP1 aktivitás gátlása ugyanis szupresszálja az NF- $\kappa$ B-függő génexpressziót, ezáltal blokkolva a mikroglia aktivációt is (Prins *et al.*, Dis Models & Mechanisms, 2013, 6: 1307-1315).

PARP gátlás esetén a NOS-indukció hatására keletkezett egyszálú DNS-törések kijavítása – a sérült DNS-szál duplikációját követően – a homológ rekombinációs (HR) DNS hibajavító útvonalon keresztül történik, így a PARP gátlása nem eredményezi a keletkezett mutációk rögzülését.

3. *Másik kérdés hogy a BRCA-mutáns daganatok esetében bevezetett PARP gátló kezeléseknek lehetséges olyan nem kívánt mellékhatása hogy a neuronokban vagy gliasejtekben mutációk felhalmozódását eredményezheti? NGS adatok alapján az agydaganatok a legalacsonyabb mutációs frekvenciával jellemzett daganatok, így egy ilyen hatás alapvetően, nagyságrendileg változtathatja meg a mutációs frekvenciát....*

A *BRCA1*- és *BRCA2*-deficiens daganatok bizonyítottan érzékenyek a PARP inhibitorokkal szemben. Ennek oka, hogy a monoterápiaként alkalmazott PARP inhibitorok a szintetikus letalítás mechanizmus révén a homológ rekombinációs DNS hibajavító útvonal defektusával bíró *BRCA*-mutáns tumorsejtek célzott halálát okozzák (Venkitaraman AR, Cell, 2002, 108: 171-182). Ennek hátterében tehát egyrészt a *BRCA* mutációk következtében a homológ rekombinációs hibajavítás megszűnése, másrészt a PARP inhibíció révén a bázis excíziós hibajavítás hatáskörének csökkenése állhat (Helleday T, Mol Oncology, 2011, 5: 387-393). A PARP-gátlás során a keletkezett egyszálú DNS-törések (SSB, 'single-strand break') kijavítása – amely a bázis excíziós hibajavító útvonal feladata – elmarad. Ennek következtében a DNS-szál duplikációját követően a sejtciklus S-fázisában a replikációs villa összeomlása miatt az egyszálú törésből kétszálú törés keletkezik (DSB, 'double-strand break'). Az S-fázis során keletkezett duplaszálú törések normál körülmények között a homológ rekombinációs hibajavító útvonal által kerülnek javításra, és a sejt életképes marad. Ezzel ellentétben, ha a homológ rekombinációs útvonal zavart, például a *BRCA*-deficiens sejtekben, a duplaszálú törések nem kerülnek javításra, ez pedig a sejt halálához vezet (Scott *et al.*, J Clin Oncology, 2015, 33: 1397-1406; Sultana *et al.*, Int J Cancer, 2012, 131: 2433-2444).

A PARP inhibíció elvi megfontolások alapján nem okozhatja a mutációk felhalmozódását az agydaganatokban a következő okból: 1.) Ha a PARP1 gátolt, de a HR hibajavító mechanizmus működőképes, akkor a HR útvonal révén a keletkezett egyszálú DNS-törés javításra kerül és nem alakul ki új mutációt. 2.) Ha a PARP-gátlás mellett a HR-útvonal sem működőképes, akkor a szintetikus letalítás révén a tumorsejt elpusztul, ami a terápia eredményességét igazolja.

Érdekesség, hogy a gliális tumorok terápiája során alkalmazott temozolomide kezelés a PARP1 inhibitorokkal kiegészítve hatásosabb lehet (Murai *et al.*, Cancer Res, 2012, 72: 5588-5599). Pre-klinikai vizsgálatok során megfigyelték, hogy a temozolomide az egyszálú DNS-törés helyén DNS-PARP komplexet hoz létre. PARP inhibitorok hatására a tumorsejtekben megnövekedik az úgynevezett PARP „trapping” iránti fogékonyság. Mivel a 'csapdába ejtett' PARP-DNS-komplexek még inkább citotoxikusak, mint a PARP gátlás során keletkezett DNS-törések, a daganatsejt elpusztul.

Köszönöm építő kritikai megjegyzéseit, megtisztelő értékelését és támogatását az értekezés nyilvános vitára tűzését illetően. Bízom benne, hogy opponensi véleményére adott válaszaim kielégítőek.

Debrecen, 2017. július 15.

Hortobágyi Tibor