

Válasz Dr. Fehér Attila opponensi véleményére

Köszönöm opponensemnek, hogy elvállalta doktori értekezésem bírálatát, valamint az időt és fáradságot, amit alapos véleményének elkészítésére fordított. Kérdéseire és észrevételeire az alábbiakban válaszolok:

Az „Irodalmi áttekintés” fejezethez kapcsolódó kérdések:

Kérdés: „A harmadik oldalon a jelölt szembeállítja a növekedés szabályozó és a hormon kifejezéseket, miszerint a brasszinoszteroidokat sokáig növekedés szabályozónak tartották és csak később ismerték el növényi hormonnak. Mivel a két kifejezést gyakran szinonímaként használja a tudományos irodalom, szeretném a jelölt, mint szakértő, véleményét hallani ebben a kérdésben.”

Számos olyan természetes eredetű, kis molekulatömegű vegyületcsoport ismert, amely igen alacsony (nM-, ill. μ M-os) koncentrációban erősen befolyásolni tudja a növényi sejtek élettani folyamatait. Az ezek közti eligazodást megkönnyítendő a növénybiológiai szakirodalom általában különbséget tesz növényi hormonok, és a fiziológiai szempontból kevésbé meghatározónak tekintett további regulátorok (pl. növekedés-szabályozók, elicitorok) között. Ugyanakkor a hormonok és regulátorok pontos elhatárolására nincs, és a szemlélet antropocentriskussága miatt nem is lehet egyértelmű, általánosan elfogadott konvenció. A fitohormonokat rendszerint úgy definiálják, mint endogén eredetű, a növény számára esszenciális kis molekulatömegű szignálmolekulákat, amelyek a virágos növények közt általánosan előfordulnak. Ennek megfelelően regulátoroknak azokat vegyületcsoportokat tekintik, amelyek ezen kritériumok valamelyikét nem teljesítik.

Kérdés: „Az 5. oldalon említi, hogy egyszikűekben (és sok kétszikű fajban is) a legerősebb élettani hatású brasszinozolid nem kimutatható és feltehetően ezekben a fajokban a kasztaszon a biológiailag aktív végtermék. Kérdésem, hogy ismert-e ennek a különbségnek az evolúciós háttere: egy bioszintetikus enzim hiányára vezethető-e vissza ezekben a fajokban, vagy mutáció következménye? Együttjár-e ez a különbség esetleg a brasszinoszteroid receptor szerkezetének megváltozásával?”

Az eddigi, még igencsak hiányos ismeretek szerint valamennyi egyszikű növényből hiányoznak a brasszinozolid szintéziséhez szükséges enzimek. Kétszikűekben ezt a funkciót a CYP85 családba tartozó citokróm P450 monooxygenázok egy része látja el. A részletesen jellemzett kétszikű fajok valamennyiében egynél több CYP85 gént lehetett azonosítani,

amelyek termékei közül csak egy, de néha egy sem rendelkezik brasszinolid-szintáz aktivitással. Meglepő módon a brasszinolid szintézist is katalizáló CYP85 enzimek a különböző növény családokban előforduló képviselői nem alkotnak filogenetikailag egységes (monofiletikus) csoportot, így valószínűsíthető, hogy ez a funkció a kétszikűekben többször is kialakult. A brasszinolid megfelelő érzékelése valószínűleg nem függ össze a BR receptor egyébként igen konzervált struktúrájának változásával. Erre utaló jeleket nem találtak a brasszinolidot termelő, ill. nem termelő növények receptorainak összehasonlításakor.

Kérdés: „10. oldalon felveti a brasszinoszteroid hiányos vagy inszenzitív növények potenciális gazdasági jelentőségét. Hogyan egyeztethető ez össze az ilyen növények növekedési és morfo-genetikus rendellenességeivel (pl. 42. oldal)?”

A XX. század második felének ún. zöld forradalmában, amely a világ gabona termelésének drámai növekedését hozta, jelentős szerepe volt azon búzafajták elterjedésének, amelyek az *Rht* gének mutációi miatt részlegesen gibberellin-inszenzitívek. Ezek a vonalak a szokásos kalászméret mellett rövidebb és erősebb szárát növesztenek, ami intenzív művelés mellett jelentősen csökkenti a megdőlés és a gombás fertőződés mértékét. A BR bioszintézis és érzékelés génjeinek azonosítását követően vált ismertté, hogy a részlegesen törpe rizsfajták egy része a BR bioszintézisben résztvevő *OsDWARF 4* gént inaktiváló mutációt hordoz. A BR hiány miatt ezek a növények erős szárúak, egyenes levelűek, ami növeli ellenállóképességüket, hozamukat. Csökkent levélfelszínű, és ezáltal gombásodásra kevésbé hajlamos borsó- és babfajták esetében is ismertek olyanok, amelyek fenotípusát részleges BR-deficiencia vagy -inszenzitivitás okozza.

Kérdés: „A 28. oldalon némi ellentmondást vélek felfedezni abban a mondatban, amisperint a „BR bioszintetikus gének gátlásáról szóló közlemények”-ben „vizsgált gének egyikének sincs bizonyítható szerepe a BR-ok szintézisében”. Hogyan kell ezt érteni?”

A mondat arra vonatkozik, hogy az idézett cikkek (Kang és mtsai, 2001; Ma és mtsai, 2001) olyan gének kapcsán vélték bizonyítottnak a BR bioszintézis transzkripció szintű negatív fény szabályozását, amelyeknek nincs, vagy nincs bizonyított szerepe a BR-ok szintézisében. A Kang és mtsai által leírt borsó BR C-2 hidroxiláz szerepére vonatkozó adatokat az elmúlt tíz év során nem sikerült megerősíteni. A Ma és mtsai által példaként felhozott négy *Arabidopsis* gén közül pedig a C-24 metiltranszferázé, C-8,7-szterol izomerázé és 3-hidroxiszteroid dehidrogenázé a BR-oknál nagyságrendekkel abundánsabb membrán szterolok szintézisében résztvevő enzimeket kódol, míg a szteroid szulfotranszferáz génjének a bioszintézissel éppen ellentétes BR inaktivációs folyamatokban van szerepe.

Saját adataink és több más munkacsoport eredményei ezzel szemben a BR szintézis kulcsenzimeit kódoló gének fényindukáltságát mutatják.

Az „Eredmények és megvitatásuk” fejezethez kapcsolódó kérdések és észrevételek:

Megjegyzés: Némi zavart okozott számomra, hogy az ábrákra nem mindig sorrendben történt a szövegben a hivatkozás, illetve, hogy bizonyos eredményeket rögtön ismertetésükkor diszkutált, míg másokat csak a szakaszvégi összefoglalásban.

Sajnos egy ábra esetében valóban előfordult, hogy a rákövetkezőre előbb történt hivatkozás a szövegben. Az eredmények megvitatásánál viszont szándékosan választottam azt a megoldást, hogy a kevésbé fontos, inkább magyarázó jellegű részekre közvetlenül az eredmények kapcsán tértem ki. Ez lehetővé tette, hogy a vizsgálatok jelentőségére és szakterületi összefüggéseire koncentráló fejezetvégi diszkussziók összefogottak és sallangmentesek lehessenek.

Kérdés: „A 42. oldalon a cpd mutáns fenotípusának leírásakor lekerékített epidermális sejtekről, duplikált gázcsere nyílásokról számol be illetve a 66. oldalon a brassinoszteroid deficiencia pollencső növekedést gátló hatását említi. Ezek olyan a sejtvázszerveződésének zavarával is együttjáró morfológiai jegyek, amelyek tipikusan a kis molekulású ROP GTPázok által szabályozottak, ráadásul egyre több adat áll rendelkezésre arról, hogy a brassinoszteroid receptorhoz hasonló receptor kinázok közvetlen kapcsolatban vannak a ROP GTPáz jelátvitellel a ROP-guanin-nukleotid kicserélő faktorokon keresztül. Kérdésem, hogy ismert-e bármilyen kapcsolat a brassinoszteroid jelátvitel és a sejtvázszerveződésének szabályozása és konkrétan a ROP GTP-áz kapcsolt jelátvitel között? Ha nem, akkor elképzelhetőnek tart-e egy ilyen kapcsolatot?”

A BR-ok sejtmelegnyúlást előidéző hatása szorosan összefügg a sejtvázat alkotó mikrotubulusok megfelelő orientálásában játszott szerepükkel. Fluoreszcens mikroszkópia segítségével BR-hiányos borsó mutánsok epidermiszében megfigyelhető volt a kortikális mikrotubulusok viszonylagos rendezetlensége, és hogy BR kezeléssel ezekben is helyre lehetett állítani a vad típusú sejtekre jellemző, meghatározóan transzverz orientáltságukat. A hormonnak ez a hatása minden bizonnyal befolyásolja az epidermális sejtek alakját. A gázcsere nyílások kettőződésére nehezebb magyarázatot adni, mert érdekes módon ez a jelenség mind BR hiányos, mind BR túltermelő *Arabidopsis* vonalaknál megfigyelhető. Elképzelhető, hogy a sztóma mintázat kialakításában valamilyen módon ROP GTPázok is résztvesznek, hiszen ismert közvetítő szerepük a poláris auxin transzport BR-ok általi szabályozásában. Emellett lehetséges az is, hogy a duplikációk a sztómaképződés

szabályozott szuppressziójának csökkenésével függnek össze, ami a mitogén-aktivált kináz jelátviteli út zavarát jelezheti. Több adat is utal ennek a szignálútnak a BR jelátvitellel való kapcsolatára, mind a receptor komplexek, mind a BIN2 kináz szintjén.

Észrevétel: „A 47. oldalon a 10. ábra kapcsán hiányoltam annak kihangsúlyozását, hogy a komplementált *cpd* mutáns egyben a CPD túltermelés vizsgálatára is alkalmas, amiről a 4.1.1.3 szakasz szól.”

A 10. ábra címe és szövege valóban nem említi, hogy a *cpd* mutáns komplementálását a CPD transzkriptumot túltermelő transzgenikus növényen mutattuk be. Célunk itt csupán annak igazolása volt, hogy az összetett mutáns fenotípus egyedül a térképezés alapján azonosított CPD gén funkcióvesztésének a következménye. Ebből a szempontból számunkra nem volt igazán fontos, hogy az expresszióért felelős mannopin-szintáz promóter a CPD saját promóterénél erősebb expressziót biztosított.

Észrevétel: „A 4.1.1.3. szakasz, amely a CPD kifejeződésének a stressz gének kifejeződésére gyakorolt hatásáról szól megtöri a dolgozat logikáját. Célszerűbb lett volna külön ismertetni és megvitatni ezeket az eredményeket.”

Az említett rész elhelyezésekor a fejezet alapjául szolgáló közlemény gondolatmenetét igyekeztem követni, miszerint a *cpd* mutáns és a CPD-t túltermelő transzgenikus vonalak vizsgálatával próbáltuk felderíteni a BR szint változásának fontosabb fenotipikus következményeit. A szerkesztési megfontolásokon túl a stressz-válaszokkal kapcsolatos eredmények összességükben valóban indokolhatták volna ezek külön tárgyalását. Úgy véltem azonban, hogy ily módon munkánknak egy olyan része vált volna hangsúlyosabbá, amely nem illeszkedik szorosan a disszertáció vonalvezetésébe.

Kérdés: „Ezzel kapcsolatban azt írja, hogy a brasszinoszteroid kezelés nem indukálja a pathogenezis kapcsolt (PR) fehérjék génjeit, de azok a CPD túltermelő növényekben magasabb szinten expresszálnak mint a kontrolban. Ehhez kapcsolódó kérdésem: valóban megnövekszik a a CPD túltermelő növényekben a reaktív oxigén fajták szintje, vagy ez csak egy hipotézis? Külső brasszinoszteroid kezelésnek van-e hatása a reaktív oxigén fajták termelődésére?”

Az, 1980-as évek elejétől ismert, hogy BR kezeléssel fokozható a növények ellenállóképessége többféle környezeti stresszhatással szemben. Ezzel kapcsolatban számos, egymásnak részben ellentmondó eredményt közöltek. Csupán az utóbbi két évben tisztázódott, hogy a jelenség hátterében a reaktív oxigén formák fokozott termelődése által

kiváltott védekezési mechanizmus áll. Az oxidatív hatások összegződése az oka a BR-kezelt növények fokozott fényérzékenységének is. A reaktív oxigén formák szintjének megemelkedése a CPD túltermelő transzgenikus növényekben is várható, bár erre konkrét mérési adatunk nincs. A patogenezissel kapcsolt gének indukciója viszont - különösen az újabb irodalmi adatok fényében - mindenképp erre utal.

Kérdés: „84. oldal. A gyökérben és a hajtásban a brassinoszteroid bioszintézisben résztvevő gének aktivitása és a brassinoszteroid intermedierek mennyisége, aránya lényegesen eltér. Mi lehet ennek a biológiai jelentősége? Van-e, lehet-e a korai intermediereknek valamilyen biológiai funkciója a gyökérben (pl. anyagcsere), ahol magas szinten vannak jelen?”

Valóban ellentmondásosnak tűnik, hogy a gyökerek igen alacsony aktív BR tartalmuk mellett a föld feletti szervekénél nagyobb mennyiségű bioszintetikus intermediert halmoznak fel. Jelenleg a BR prekursoroknak semmiféle olyan közvetlen élettani funkciója nem ismert, ami erre magyarázatot adhatna. Mivel a BR-ok a növényen belül nem transzportálódnak, az sem valószínűsíthető, hogy a gyökérben levő intermedierek könnyen mobilizálhatók lennének. A rendelkezésre álló adatok alapján az sem látszik valószínűnek, hogy esetleg az inaktív prekursorok konjugált (pl. glikozilált, acilált) formái hatékonyabban szállítódna, és így a gyökérben levő készletek tartalékként szolgálhatnának az aktív BR formák más szervekben történő szintéziséhez.

Kérdés: „A brassinoszteroidokról ismert, hogy nem transzportálódnak. Mi a helyzet az intermedierekkel? Különös tekintettel arra, hogy az egyes bioszintetikus lépésekért felelős gének kifejeződési mintázata nem teljesen fed át.”

A bioszintetikus intermedierek transzportálhatóságát közvetlen módszerekkel eddig nem vizsgálták. Szövetspecifikus promóterekkel végzett komplementációs kísérletek alapján azonban valószínűsíthető, hogy az aktív BR formákhoz hasonlóan ezek is csak igen rossz hatásokkal, spontán diffúzió révén jutnak át egyik szövetből a másikba.

Kérdés: „86. oldalon írja, hogy nem ismert miért van végtermék gátlás az összes bioszintetikus gén esetében. Lehet-e az ok az, hogy a bioszintézis utak hálózatos kapcsolata miatt az intermedierek felhalmozódásának gátlása csak így lehetséges? Lehetnek ezek az intermedierek esetleg károsak a növény számára?”

Valóban feltételezhető, hogy ezt a többszintű szabályozást a BR bioszintézis útjainak hálózatos rendszere teszi szükségessé. Bár a bírálóm által hivatkozott megjegyzés épp arra

vonatkozik, hogy a hasonlóan hálózatos gibberellin anyagcsereutak kontrollját a két végső enzimet kódoló gén transzkripció regulációja is biztosítani tudja. Jelenleg nem ismert olyan adat, hogy egyes intermedierek felszaporodása a növény számára káros lehetne. De utalhat erre az, hogy a BR C-23 metilázok hiányában nem észleltük egyik szubsztrátjuk felhalmozódását sem, és hogy egy idei publikáció olyan degradatív enzim funkcióról számol be, amely specifikusan ezeket az intermediereket inaktíválja.

Kérdés: „92. oldal. A 4.2.3.3. szakaszban a CYP85A1 és A2 gének differenciális kifejeződése kapcsán összehasonlítja azok elsődleges promóter szekvenciáját, ami véleményem szerint kevésbé informatív, de a feltételezett transzkripció faktor-kötő helyeket nem. Miért?”

Az *Arabidopsis* CYP85 gének promótereinek összehasonlítása egy 2005-ben közölt munka része volt, így ezt csak az akkori ismeretek alapján végezhattük. Annyiban feltétlenül informatív volt, hogy a promóter szekvenciák közti nagyfokú homológia jelezte: a két CYP85 gén nem túl régi duplikáció révén jött létre. (Ilyen fokú egyezés a CYP90 gének promóterei közt nem figyelhető meg.) 2005-ben potenciális transzkripció faktor kötőhelyek kijelölése számunkra igen spekulatívnak tűnt, és ezzel mindmáig egyetlen munkacsoport sem próbálkozott. Eddig csupán a végtermékgátlásos szabályozást biztosító, a két CYP85 promóterben is megtalálható regulatív szekvenciát azonosították egyértelműen, már cikkünk megjelenését követően.

Kérdés: „94. oldalon említi, hogy *Zinnia elegans*-ban a xilém képződés folyamán a CYP85 és CYP90 gének expressziója összehangolt. Mi a helyzet a két géncsalád expressziójának összehangolása tekintetében az *Arabidopsis* növény egyedfejlődése alatt (pl. mikroarray adatok illetve promóter motívumok és szabályozó transzkripció faktorok tekintetében)?”

Mind saját eredményeink, mind más laboratóriumok adatai egyértelműen a CYP85 és CYP90 gének aktivitásának összehangoltságát mutatják valamennyi vizsgált növényfaj esetében. Ez egyaránt jól kimutatható a differenciációs és a BR homeosztázist biztosító folyamatok során. Különbözik viszont a bioszintetikus gének kifejeződési mintázata az egyes szervekben, összefüggésben ezek eltérő élettani funkcióival. A CYP85 és CYP90 gének expressziójának koordináltsága mind microarray, mind érzékenyebb detektálási módszerek révén jól dokumentált. A transzkripció szabályozó elemek szintjén viszont mindössze annyi ismert, hogy mindegyik BR bioszintetikus gén promótere hordozza a végtermékgátlásért felelős motívumot, és többségük egy olyan regulatív szekvenciát is, amely több hormoncsalád esetében meghatározza metabolikus génjeik összehangolt napszakos működését.

Kérdés: „A 104. oldalon említi, hogy a paradicsom termés perikarpan nagy mennyiségben halmozódik fel a brasszolid. Elképzelhető-e, hogy a termésben specifikusan működő CYP85A3 termelődése mentes a végtermék gátlás alól?”

Ez könnyen elképzelhető, hiszen a *CYP85A3* gén kizárólag a termés fejlődése során aktív, és ekkor már nincs szükség a hormonszint szűk határok között tartására. A gén promóterének szekvenciája még nem elérhető, így nem tudható, hogy előfordul-e benne az a BR válasz motívum, amely a végtermékgátlást biztosítja. Feltételezhető ugyanakkor az is, hogy egyes differenciációs folyamatok során a BR érzékenység vagy szignalizáció változása miatt a végtermékgátlás nem, vagy csak kevésbé érvényesül. Erre utal, hogy borsóban a szemfejlődés során aktívak maradnak a végtermék-szabályozott *CYP85* és *CYP90* gének az aktív BR nagyfokú elhalmozódás ellenére is.

Kérdés: „112. oldalon említi, hogy a napszakos változások során a brasszolid a fényperiódus közepén szaporodik fel de az intermedier poolok nem változnak. Mivel magyarázható ez?”

Az intermedier poolok változatlanóságát alapvetően az biztosíthatja, hogy bár az aktív BR formák szintjének változása igen jelentős, ez a közvetlen prekursor 6-dezoxokasztaszeron és egy korábbi intermedier nagyságrenddel nagyobb pooljának rovására valósul meg. Kiegyenlítő hatása lehet emellett az egymásra épülő bioszintetikus funkciók összehangolt metabolikus szabályozottságának is.

Észrevétel: „4.3. fejezetben a jelölt a CYP90C1 és D1 enzimek jellemzéséről számol be. A háttér felvázolásakor Kim és mtsai. hasonló, részben korábbi, részben párhuzamos, kutatásainak eredményeit írja le, akik más végkövetkeztetésre jutottak az enzimek szerepét illetően. Nem teljesen világos, hogy mi volt a két megközelítésben az a különbség ami az eltérő eredményekhez vezetett.”

Az említett vizsgálatok között két alapvető különbség is volt. Mi abból indultunk ki, hogy két különböző gént érintő mutációk esetében, amelyeknél külön-külön nem észlelhető BR-hiányos fenotípus, a kettős mutáns csak akkor lehet BR-deficiens, ha a két gén funkciója legalább részben átfedő. Kim és mtsai ezt teljesen különböző funkciók mellett is elképzelhetőnek tartották. Emellett ők a CYP90C1 és D1 enzim szerepére vonatkozó következtetéseiket indirekt, az intermedier poolok változásait érintő vizsgálatokból vonták le, míg mi ezeket a funkciókat közvetlen biokémiai reakcióik alapján határoztuk meg.

Kérdés: „A 135. oldalon bemutatja a brasszinoszteroid szintézisben feltárt ún. C-23-hidroxilációs söntök sémáját és hangsúlyozza ezek jelentőségét. A 4. ábrával összevetve nem világos számomra, hogy ezeknek a söntöknek a létezése mellett a cpd (CYP90A1) mutáció hogyan vezet brasszinoszteroid deficienciához?”

Ahogy arról a *cpd* mutáns karakterizálásával kapcsolatos eredmények megvitatásában (4.1.1.7. szakasz) szó esik, későbbi hormon analíziseinkkel kimutatható volt, hogy a CPD/CYP90A1 enzim hiányában a BR szintézis csak az igen korai intermedierek számító 22-hidroxikampeszterolig jut el. Ez a mutánsban erősen felhalmozódó termék a bioszintetikus utaknak a C-23- hidroxilációs söntöket megelőző szakaszában keletkezik. Jelenleg publikálás alatt levő eredményeink szerint a CPD enzim a 22-hidroxikampeszterol C-3 oxidációját katalizálja, és emellett - feltehetően közvetlen protein-protein interakció révén - a C-23- hidroxiláció hatékonyságát is befolyásolni tudja.

Kérdés: „138. oldalon említi, hogy a DD-RT PCR technikával csak három BR-regulált gént sikerült azonosítani, de nem említi, hogy hány feltételezett transzkriptumot vizsgáltak. Mennyire volt reprezentatív a minta? Az Arabidopsis genom és a microarray adatok ismeretében ma hány BR szabályozott génről tudunk Arabidopsisban?”

DD-RT PCR vizsgálataink a módszer akkori igen költséges volta miatt szűk keretek közt folytak, és céljuk mindössze néhány, BR-függő funkció felismeréséhez vezető gén azonosítása volt. Öt primer kombinációval összesen hét, kétszeresnél nagyobb különbséggel amplifikált terméket izoláltunk, melyek közül Northern-hibridizációval három BR-függő differenciált expresszióját tudtuk megerősíteni. Két ismeretlen szerepű, funkcionális doménekre sem utaló gén jellemzésével a továbbiakban nem foglalkoztunk, csupán a feltételezhetően regulatív jellegű RING-finger proteint kódoló gén karakterizálására koncentráltunk. Munkánkkal egyidőben három másik munkacsoport microarray hibridizációval azonosított BR-reszponzív géneket *Arabidopsis* csíranövényekben. Vizsgálataik eredményeként mindössze 13, 26, ill. 37 BR-szabályozott gént sikerült találniuk. Munkájuk egyik érdekes felismerése volt, hogy ezen gének többségénél a BR válasz mértéke a differenciált expresszió kritériumául választott kétszeres különbséget alig haladta meg.

Kérdés: „A 145. oldalon leírja, hogy a BRH1 gén feltételezhetően védekezési reakciókban vesz részt, majd szenz és antiszenz BRH1 transzgenikus növényekről számol be. Milyen ezeknek a növényeknek a patogén válasza?”

A *BRH1* gén szerepét védekezési reakciókban annak alapján feltételeztük, hogy expressziója kitinnel tranziensen indukálhatónak bizonyult. Akkor ez volt a rendelkezésünkre álló egyetlen, az esetleges funkcióra utaló adat. A létrehozott BRH1 antiszensz vonalakkal patogén válasz tesztek végül nem végeztünk. Ezek módszertanilag és irányukban is távol estek csoportunk profiljától, valamint a munka legnagyobb részét végző doktorandusz távozásával erre kapacitásunk sem igen volt.

Még egyszer köszönöm opponensem alapos bírálatát és gondolatébresztő kérdéseit.

Szeged, 2011. május 30.

Szekeres Miklós