

Válasz Dr. Janda Tibor bírálatára

Köszönöm Dr. Janda Tibornak munkásságom és a dolgozatom pozitív értékelését, valamint a kritikai észrevételeket. A feltett kérdésekre, megjegyzésekre az alábbi válaszokat adom:

1) A dolgozatban bemutatott ábrák igényesen kidolgozottak, bár jó lett volna, ha az ábrákon a statisztikai elemzések eredményeit is feltüntetni, illetve egyes ábrafeliratok lehetnek bőbeszédűebbek is, eleget téve annak az elvárásnak, hogy az ábra a hozzá tartozó szöveggel együtt önmagában is értelmezhető legyen.

Válasz: Az ábrákon szerepelnek a szórások vagy a standard hibák. A szignifikancia-analízis eredményeit valóban nem tüntettem fel, az esetek túlnyomó többségében ugyanis a különbségek többszöröse és minden esetben jól láthatóak. A Függelékben található eredeti cikkekben szerepel a pontos mintaelemszám és a statisztikai analízis eredményei is, így az olvasó esetlegesen ellenőrizheti a következtetések levonásának helyességét.

A mérési eredmények bemutatásánál igyekeztem minden szükséges információt feltüntetni. Ennek ellenére, utólag visszanézve valóban van pár ábraaláírás, ami a többihez képest kevesebb információt tartalmaz, ami befolyásolhatja az értelmezhetőséget. Mentségemre szolgál, hogy minden fejezetnél pontosan szerepel, hogy melyik cikkben közöltük az adott eredményeket, így azok a Függelékben visszakereshetők.

2) A review-szerű ábrák kimondottan jól sikerültek, informatívak, de pl. a 14. ábrára nincs is hivatkozás a szövegben, ez itt inkább mint illusztráció jelenik meg. Megjegyzem, hogy a Függelékben ugyanez az ábra tökéletesen informatív.

Válasz: A 14-es ábrára történő hivatkozás sajnos valóban hiányzik a szövegből, a hibáért elnézést kérek.

3) Az eredmények rész egyes alfejezetei különösen szorosan kapcsolódnak egymáshoz, különösen az 1., 2., 3. és 5. rész. Ezek alapján egy összefoglaló ábra jól mutatott volna, és segítette volna a kapott eredmények szintézisét is.

Válasz: Igen, egyetértek, a szöveges összefoglalások mellett hasznos lett volna egy ábra is. Ezt igyekszem ezt a védésen pótolni.

4) Az aszkorbát-bioszintézissel kapcsolatos eredmények tárgyalása során megjegyzi, hogy a mioinozitolhoz kapcsolódó „útvonal élettani jelentősége máig vitatott (Wheeler és mtsai, 2015)”.

(21. oldal, „Eredmények 1. bekezdés). Az említett cikk óta eltelt 6 év. Történt-e előrelépés azóta a kérdés tisztázására?

Válasz: Az újabb eredmények is alátámasztják, hogy mioinozitol útvonal szerepe elhanyagolható a növények leveleiben (Kavkova és mtsai., 2019, The Myo-inositol pathway does not contribute to ascorbic acid synthesis. Plant Biol 21: 95-102).

5) Az ugyanebben a részben leírt mutánsok és transzgenikus vonal esetében az aszkorbát-tartalmat miért klorofillra, és miért nem friss- vagy száraztömegre vonatkoztatták?

Válasz: A cikk bírálójának kifejezett kérése volt, hogy klorofilltartalomra vonatkoztassuk az aszkorbát-tartalmat, mivel az aszkorbát fotoszintézisben betöltött szerepét vizsgáltuk. Megjegyzem, hogy nem volt jelentős különbség a három vonal friss tömegre vonatkoztatott klorofilltartalmában.

6) Az aszkorbátszint fényregulációjával és cirkadián ritmusával kapcsolatban (Függelék, Vidal-Meireles, 2017, 9. ábra) nem volt világos, hogy a fény/sötét ciklust követő folyamatos fényben miért alacsony aszkorbát-tartalmakat kaptak? Miért nem magas szinten maradt a rendszer? Ehhez kapcsolódóan jól mutatna egy modell ábra, ami bemutatja, hogy a fény pontosan milyen lépéseken keresztül szabályozza az aszkorbát szintjét. Mi lehet az elsődleges szignál?

Válasz: Megfigyeltük, hogy önmagában a nevelőfény felkapcsolása jelentős aszkorbát-szint emelkedést okoz, amely egyfajta stresszválasz lehet a hirtelen beálló változásra. A nevelőfényel történő folyamatos megvilágítás alatt viszont az aszkorbát-szint alacsony, feltételezhetően egyfajta egyensúlyi szint elérésének köszönhetően.

A fényintenzitásban beálló hirtelen változás a reaktív oxigénformák szintjét megemeli (Shao és mtsai, 2007 Plant J 50: 475), valamint a Rose-Bengal és a H₂O₂ kezelés az aszkorbát-szint intenzív emelkedését okozza (12. ábra és Vidal-Meireles és mtsai (2017) a Függelékben). Mindezek alapján feltételezhető, hogy a szignálmolekula a szinglet oxigén és/vagy a H₂O₂, mint ahogyan az a 14. összefoglaló ábrán szerepel és a Vidal-Meireles és mtsai (2017) cikkünkben is leírásra került.

Megjegyzem, hogy a mi cikkünk volt az első, amely az aszkorbát-bioszintézis szabályozásával foglalkozott algákban és még számos kérdés vár tisztázásra a jelátviteli folyamatokat illetően. Továbbá nem csak algákban, de még növényekben sem ismert az aszkorbát-bioszintézis pontos szabályozása.

7) megállapításaik szerint az aszkorbát véd a donor-oldali fotoinhibícióval szemben. Mennyire aktív védelem ez, vagy mennyire „csak” egy alternatív lehetőség az elektronáramlás fenntartására? És ha ez utóbbi igaz, akkor miért olyan jó ez? Feltételezhető, hogy a donor oldal mellett az akceptor oldal is károsodik. Ilyenkor az elektronáramlás fokozása a rendszer számára inkább ártalmasnak tűnik, mintsem előnyösnek. Mi erről a véleménye?

Válasz: A donor oldali fotoinhibíció a vízbontó komplex inaktiválódása következtében alakul ki, ugyanis ebben az esetben nincs elég elektron, ami redukálná a $P680^+$ -at és a $Tyrz^+$ -t. Ezek maguk is erős oxidáló hatással rendelkeznek, azonban a donor oldali fotoinhibíció következtében reaktív oxigénformák is felhalmozódhatnak, amelyek együttesen teljes mértékben inaktíválhatják a PSII reakciócentrumot. Az aszkorbát által nyújtott védelem alapja az, hogy elektronokat szolgáltat a $P680^+$ számára, ezáltal mérsékli a $P680$ és a $Tyrz$ túlzott mértékű oxidációját. Az elektronátadás az aszkorbát felől sokkal lassabb, mint az aktív vízbontó komplex felől (az aszkorbát elektronátadási félideje a $Tyrz^+$ felé kb. 20-30 ms, míg az aktív OEC-től 0.1-1 ms).

A védelem ennek ellenére jelentősnek tűnik az alapján, hogy az aszkorbát-hiányos mutánsok sokkal érzékenyebbek a hőkezelést követő fotoinhibícióra, mint a vad típus, az aszkorbát-túltermelő vonal pedig fokozottabb stressztűrést mutat. A hatás különösen szembetűnő a helyreállítás során, ugyanis az aszkorbát-túltermelő vonal és a WT sokkal gyorsabban helyreáll, mint az aszkorbát-hiányos mutáns. Az aszkorbát természetesen számos módon védheti a fotoszintetikus apparátust és segítheti a hőkezelést követő helyreállást, azonban megfigyeltük, hogy a hőkezelés utáni fénystressz mérsékelhető difenilkarbazid kezeléssel, amely egy mesterséges PSII donor, azonban nem bír szabadgyök-kioltó hatással és az aszkorbát más szerepeit sem helyettesíti. Tehát az aszkorbát által alternatív elektrondonorként nyújtott védelem bizonyítottan tekinthető, azonban a pontos mértékét nehéz meghatározni.

A klorofill-a fluoreszcencia méréseink alapján kijelenthető, hogy az elektrontranszport a PSII akceptor oldalán nem válik korlátozó tényezővé az általunk alkalmazott mérési körülmények között. Korábban Ducruet és Lemoine (1985, Plant Cell Physiol 26: 419) leírták, hogy a hőkezelés során akceptor oldali limitáció következhet be, ők azonban viszonylag hosszú időtartamú hőkezelést alkalmaztak és a klorofill-a fluoreszcencia kinetikát a hőkezelés során mérték, nem pedig legalább 30 perccel azt követően (mint ahogyan azt mi tettük). Tehát véleményem szerint a különbség abból adódik, hogy a hőkezelés során, a magas hőmérsékleten lassulhat az elektrontranszport a PSII akceptor oldalán, ez azonban a hőmérséklet normalizálásával helyreáll. Ezzel szemben a vízbontó komplex inaktivációja irreverzibilis, csak annak újraépülésével áll helyre a vízbontó aktivitás.

8) Aszkorbát és NPQ kapcsolata: pontosan milyen molekuláris mechanizmus tétélezhető fel, ami alapján az aszkorbát az NPQ-ra hat? Zöldalagokban feltételezésük szerint a szabadgyökök kioltása révén elsősorban a fotoinhibíciós kioltás mérséklése a fő mechanizmus, de mi a helyzet a magasabb rendű növényekkel? Az eredmények szerint a violaxantin-deepoxidáz aktivitásának fenntartását végzi, de vajon hogyan? Génexpressziós szinten? Közvetlenül kapcsolódva? Vagy indirekt módon?

Válasz: Ismert, hogy magasabb rendű növényekben az aszkorbát a violaxantin-deepoxidáz kofaktora (Bratt és mtsai, 1995, Photosynth Res 45: 169; Saga és mtsai, 2010, J Biol Chem 285: 23763; Hallin és mtsai 2016, Photosynth Res 129: 29), mely enzim a violaxantin zeaxantinná történő alakítását katalizálja, melynek köszönhetően a hődisszipáció mértéke, tehát a nemfotokémiai kioltás mértéke megnő. Erről a 7. és a 33. oldalon tettem említést.

9) Az NPQ újabb értelmezése szerint két részre bontható: regulált Y(NPQ) és nem-regulált Y(NO) komponensekre. Az aszkorbát melyik mechanizmust szabályozza főként? Van-e erre saját vagy irodalmi adata, vagy ha nincs, elméleti alapon mit gondol ezzel kapcsolatban?

Válasz: A definíció szerint a Y(NO) komponens az ún. nem-regulált nem-fotokémiai energiavesztés a PSII-ben (Klughammer and Schreiber, 2008, PAM Application Notes, 1: 27 - 35). Számítása a steady state fluoreszcencia és a sötétadaptált F_M érték alapján történik (F/F_M), tehát értéke a nyitott reakciócentrumok mennyiségével arányos. Ezzel szemben a regulált Y(NPQ) számítása tartalmazza a fényadaptáció során mért F_M' értéket ($F/F_M' - F/F_M$), tehát sokkal közelebb áll a klasszikus NPQ méréshez, amely tulajdonképpen a sötétadaptált F_M érték és a fényadaptáció során kialakuló F_M' érték arányát jelzi ($(F_M - F_M')/F_M'$); Ruban, 2016, Plant Physiol 170: 1903).

A kísérleteink során az NPQ-t vizsgáltuk, mely energiafüggő (qE), zeaxantin-függő (qZ), állapotváltozás (state transition) -függő (qT) és fotoinhibíciós q(I) komponensekre osztható, melyek közül a q(I) komponensnek több alkotórésze lehet (Allorent és mtsai, 2013). Az egyes komponensek megléte, aránya igen nagy mértékben függ a nevelési körülményektől (pl. fotoautotróf és heterotróf kultúrák, CO₂ ellátottság, nevelési fényintenzitás), és azok elválasztására gyakran speciális körülményeket és kiegészítő méréseket alkalmaznak (pl. 77K fluoreszcencia).

Kimutattuk, hogy az aszkorbát a qI-t mérsékli, annak is a szabadgyökök által indukált komponensét.

Arra vonatkozóan, hogy az ún. Y(NO) komponens az aszkorbát befolyásolja-e és ha igen, milyen mértékben, nem végeztünk vizsgálatokat.

10) A hidrogéntermeléshez kapcsolódóan egy általános kérdés: jelenleg hol tart a fotoszintetikus hidrogéntermelés gyakorlatban történő felhasználásának kidolgozása?

Válasz: A dolgozatban a H₂-termelés vizsgálata csak az aszkorbáttal és a kénmegvonással összefüggésben szerepel, azonban kutatócsoportommal a H₂-termelés területén további jelentősnek mondható eredményeket értünk el. Kidolgoztunk egy anaerob indukción alapuló eljárást, mely a kénmegvonással ellentétben nem jár jelentős stresszhatással, a H₂ termelés pár órássötétben történő anaerob indukciót követően azonnal megindul és folyamatos fényben napokig tart. A H₂-termelés hozama jelentősen felülmúlja a korábbi kénmegvonás során elért hozamokat, valamint a napfény intenzitásán is megvalósítható. Jelenleg tervezés alatt van egy fotobioreaktor, amely prototípusként szolgálhat a bioipari célú H₂-termeléshez. Ebben a témában a következő cikkeink jelentek meg:

Nagy V, Podmaniczki A, Vidal-Meireles A, Tengölics R, Kovács L, Rákhely G, Scoma A, Tóth SZ (2018) Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin-Benson-Bassham cycle. *Biotechnol Biofuels* 11: 69

Nagy V, Podmaniczki A, Vidal-Meireles A, Kuntam S, Herman É, Kovács L, Tóth D, Scoma A, Tóth SZ (2021) Thin cell layer cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* L159I-N230Y, *pgr11* and *pgr5* mutants perform enhanced hydrogen production at sunlight intensity. *Biores Technol* 333: 125217

Illetve egy elfogadott európai szabadalommal rendelkezünk:

Nagy V, Tóth SZ (2017) Photoautotrophic and sustainable production of hydrogen in algae. European Patent Application 17155168.2, priority date: 08.02.2017.

Köszönöm az új tudományos eredmények elismerését és a gondolatébresztő javaslatokat.

Szeged, 2022. március 16.

Tisztelettel,

Tóth Szilvia Zita

Növénybiológiai Intézet, Szegedi Biológiai Kutatóközpont