

Tóth Szilvia Zita MTA Doktori értekezésének bírálata.

A dolgozat címe:

Az aszkorbát (C-vitamin) bioszintézise és szerepei a fotoszintézisben és a zöldségek hidrogén termelésében

Az értekezés 59 oldal terjedelmű figyelembe nem véve az eredeti közlemények másolatát tartalmazó Függelék oldalait.

Az értekezés érdemi része rövid jellegű, nem a hagyományosnak tekinthető részletes leírás. A disszertáció a Rövidítések jegyzékéből, 10 fejezetből áll. A 10. fejezet a Függelék, mely az eredeti közlemények másolatát tartalmazza. Az egymás után következő fejezetek címei:

Általános bevezetés, Célkitűzések, Alkalmazott anyagok, módszerek, Eredmények és megvitatásuk, Főbb kutatási eredmények összefoglalása, Irodalomjegyzék, Saját közlemények, Tudományometriai összesítés, Köszönetnyilvánítás, Függelék.

Általános bevezetés:

A szakmai szempontból a bevezetés elfogadható, nem túl hosszú, nem kényeztet el az olvasót, több mindenek – ami elért volna itt - utána kellett nézni az irodalomban.

A 10. oldal tetején az áll, hogy: ... *A. thaliana* VTC2/VTC5 dupla mutánsok... . Ez ugye egy elírás?

Célkitűzések:

A Jelölt 6 célkitűzést sorol fel (zárójelben az fejezetek címe), melyek:

1. A PSII alternatív elektrondonorának azonosítása (**Az aszkorbát a II. fotokémiai rendszer alternatív elektrondonora**)
2. Az Asc alternatív PSII elektrondonorként betöltött élettani szerepének meghatározása (**Az aszkorbát alternatív elektrondonorként lassítja a donor oldal fotoinhibícióját**)
3. Az Asc vízbontó komplex működésére gyakorolt hatásának vizsgálata sötét-indukált szénészencia során (**Az aszkorbát a hosszan tartó sötétségben inaktíválja a vízbontó komplexet**)

4. A zöldalgák Asc-bioszintézisének vizsgálata (**Az aszkorbát bioszintézisének szabályozása zöldalgákban**)
5. Az Asc szerepének meghatározása a zöldalgák NPQ folyamataiban (**Az aszkorbát szerepe az algák nem-fotokémiai kioltásában**)
6. Az Asc szerepének feltárása a zöldalgák H₂-termelésében (**Az aszkorbát hatása az zöldalgák hidrogéntermelésére**)

Alkalmazott anyagok, módszerek:

Ebben a fejezetben vannak felsorolva a kísérletekhez használt növények és zöldalgák (*Arabidopsis thaliana* és *Chlamydomonas reinhardtii*) vad típusú és mutáns változatai. Hasznos lett volna megtudni azt, hogy miért pont azokat az *Arabidopsis* mutánsokat (pl. *vtc2*) és *Chlamydomonas* törzsek használták. Az *Arabidopsis vtc2* mutánsokban 15-30%-nyi aszkorbát (Asc) található, tehát nem un. null mutánsok. Null mutáns kettős mutációval (*vtc2, vtc5*) érhető el. Nem lett volna célszerű ezeket is használni a *PSII alternatív elektrondonorának azonosítása* című fejezetben leírt kísérletekhez (lásd később)?

A *Chlamydomonas* törzsek miben különböznek egymástól, hogy ennyit kellett használni?

A Biofizikai módszerek esetében hiányolom a pár mondatos ismertetőt, hogy mit is tudnak ezek a módszerek (lásd később).

A molekuláris biológiai módszerek Hál' Istennek ismerősek számomra, ergo itt nincs hiányérzetem, bár ez a rész is kurtán-furcsán van elintézve egy mondattal.

Eredmények és megvitatásuk:

1. Az aszkorbát a II. fotokémiai rendszer alternatív elektrondonora

Ez a fejezet kicsit több, mint 3 oldalnyi leírása – azaz rövid, magyar nyelvű kivonata- a Tóth és mtsai. által közölt Plant Physiol. 2009-ben megjelent cikknek, amelyben az elért eredmények nagymértékben támaszkodnak a Tóth és mtsai., 2007-es BBA közleményre.

A felhasznált kísérleti növények: *At*, vad típus; *At vtc2-1*, mely csökkent Asc tartalmú mutáns.

A Jelölt

- az OJIP görbék felvételén
- az OJIP görbe K-lépés „kinetikáján”
- a 820 nm-es abszorbcia-méréseken és
- a termolumineszcencia méréseken

keresztül mutatja be azt, hogy az Asc alternatív elektron donor lehet a PSII számára.

Az OJIP (Kautsky-) görbe felvétele általánosan használt módszer a fotoszintézis során - molekuláris/atomi szinten - lejátszódó folyamatok követésére. Annak - vagyis a fluoreszcencia - változásából lehet következtetéseket levonni, hogy mi is történik, milyen változás megy végbe a fotoszintetikus rendszerben különböző környezeti hatásokra (fény/sötét, magas/alacsony hő, kémiai kezelések, stb.). Például a hő hatására inaktíválódik a vízbontó komplex (OEC) ami az OJIP görbe látványos megváltoztatását vonja maga után: megjelenik a K- és P-lépés (csúcs). Ennek statikus (a P-csúcs nő, vagy csökken) és kinetikus (elektron átadási idő az Asc és PsII között) változása jelzi az Asc alternatív elektron donor szerepét. A termolumineszcens görbék egyrészt jelzik, hogy hő hatására megszűnik a rekombináció az Mn centrum S₂, S₃ oxidált állapota és a Q_B⁻ (második kinon akceptor) között, másrészt, hogy Asc hatására csökken az A csúcs hőkezelt mintában. A 820 nm-en felvett abszorpciós görbék pedig szintén alátámasztják azt, hogy az Asc egy alternatív elektron donor.

Bírálnom a munkát – „szakértői” szemszögből - értelmetlen lenne, hisz hozzáértő bírálók ezt már megtették, így csak egy-két megjegyzés marad:

Általános megjegyzésem az, - és ez a többi, az eredményeket leíró fejezetekre is vonatkozik - hogy hiányolom az eredmények részletes (ki)értékelését, magyarázatát és a kísérletek elvégzésének hátterére. A következtetések megfogalmazódnak (pl. az, hogy az Asc alternatív elektron donor), de azok alátámasztásának leírása, alapos értékelése több/sok esetben hiányzik, vagy hiányos. Az elvégzett fizikai kísérletekhez nyilván megfelelő műszerezettség és kísérleti tervezés szükséges, azonban a konkrét mérések bonyolult előkészítést, kísérleti/műszeres beállítás (protokollt) igényelnek. Nem a fotoszintézis-galaxisban jártas kutatónak nem egyszerű átlátni az adott kísérletek beállításait. Nekem sem volt egyszerű. Nem kellett volna szükségszerűen a disszertációba áttenni a cikkekben szereplő ábrák tükörképét (tudom, így volt egyszerű). Segítette volna, ha az ábrákon jelölve lettek volna (pl. nyilakkal) a különböző megvilágítások (mérési fény, tápláló /aktinik/ fény, telítő fény, stb.) mikor kapcsol be, mikor kapcsol ki, mint azok, az egyes, mások által közölt cikkekben is szerepelnek. Hasonlóképpen hasznos lett volna, ha a kísérletekben mért értékek mennyisége/minősége mögött, a nem triviális módon (bár ami nekem nem triviális, az a Jelöltnek az lehet) magyarázható összefüggések, molekuláris/atomi események részletes magyarázata is szerepel. Ezeknek az eseményeknek a kiveszését hiányolom, vagyis: amit mérek (pl. fluoreszcencia intenzitása), amögött mi húzódik meg (pl. chl *a* emisszió), a fluoreszcencia intenzitás változás miért történik (pl. Q_A⁺ redukció, donor oldal „bekapcsol”), de ami az egyik legfontosabb az az, hogy miért is úgy változik valami, ahogy (visszavezetni a chl *a* emisszióra, zárt-nyitott állapot). Nyilvánvalóan az alkalmazott módszereknek, így a fotoszintézis-fluoreszcenciának az alapjait is sok-sok évvel ezelőtt, sok-sok cikkben feltárták már, tankönyvekben tanítják és a kutató a technikát a kérdések megválaszolására alkalmazza. Aki azonban nem jártas ezekben a technikákban, annak gondot okoz a görbék értelmezése, mert ehhez nem szokott hozzá. Nekem sok időbe telt, de ez tekinthető magánügynek is.

Konkrét kérdések:

- a hőkezelt minták (*At* vad típus és *vtc-2-1* mutáns) emissziójának változása lényegesen eltér a kezeletlen mintáétól (6. és 8 A. ábra). Két csúcs jelenik meg. A kérdésem a második csúccsal (P) kapcsolatos. A P csúcs miért jelenik meg később?
- az *At vtc2*, *vtc5* kettős (igazi null) mutáns használatát (növekvő Asc jelenlétében) elvetették, ha igen miért? Asc hiányában nyilván nem lenne K és P lépés. Az *At vtc2*, *vtc5* kettős mutáns növekvő Asc jelenlétében fenntartható, Asc adás nélkül is kifejlődik, zöldek a sziklevelei, persze egy idő után kifehéredik.
- fluoreszcencia mérések *in vivo* történtek. Milyen eredménybeli különbség van/lett az *in vitro* és az *in vivo* mérések között?
- az Asc, mint redukálószer mit redukál először (amikor az OEC hőinaktíválódik), hol történik molekuláris/atómi szinten az elektron átadás? Laikus szerint a Mn centrum lehet, de akkor a Mn centrum nem a vízbontó komplex része?
- az Asc-nak nincs meghatározó szerepe, mint elektron donor a „normális” fotoszintetizálás alatt. Van-e más, fiziológiásan (lényeges) szerepe az antioxidáns funkción és a fotóinhibíció-lassításon kívül?

2. Az aszkorbát alternatív elektrondonorként lassítja a donor oldal fotóinhibícióját

Ez a fejezet 3 és fél oldalnyi leírása – szintén rövid, magyar nyelvű kivonata - a Tóth és mtsai. 2011. és Tóth és mtsai. 2013. által közölt *Plant Physiol.* és *Physiol. Plantarum* cikkeknek.

A felhasznált kísérleti növények: *At*, vad típus; *At vtc2-3*, csökkent Asc tartalmú mutáns; *At miox4*, magasabb Asc tartalmú mutáns.

Elvégzett kísérletek, felhasznált módszerek:

- afenotípus kiértékelés
- Asc tartalom, elektron transzport ráta (ETR), nem-fotokémiai kioltás (NPQ) és energia függő kioltás (qE) meghatározás
- termolumineszcencia (TL) görbe felvétele egyszeri töltésszétválasztást indukáló telítési fényimpulzus kezeléssel és anélkül, hőkezeléssel és anélkül
- OJIP görbe felvétele hőkezelést követően
- 820 nm-es fény indukált abszorpciós görbe felvétele
- Western blotting

A kísérleti eredményekből megállapítható, hogy hő- és fénykezelés hatására bekövetkezik a donor oldal fotóinhibíciója, melyet az Asc lassít. Fény hatására, mint egyéb ágensek hatására is lassul az elektron transzfer az OEC felől (az OEC kezd „szétesni”) a PSII irányában, ami oxidáló gyökök keletkezésében nyilvánul meg (szuperoxid, hidroxilgyökök, $P680^+$, Tyr_z^+), ami

a PSII reakció centrum lebomlásához vezet. A degradációt a D1, CSP43, PsbO Western blot-ja is egyértelműen alátámaszt. A 820 nm-en felvett abszorpciós görbék látványosan mutatják, hogy vörös fény hatására az oxidált P700⁺ visszaredukálódik (csökken az elnyelés), ami egyre jobban elmarad különböző idejű fénykezelés hatására.

A fejezettel kapcsolatos kérdések:

- 21. oldal alján: A 40 C° –os hőkezelés, miért nem tekinthető élettaninak, holott 40 C° nem ritka a természetben?
- 22. oldal alsó 3 sor: Hogy lehet értelmezni azt, hogy a fluoreszcencia *a működőképes PSII reakciócentrumok relatív mennyiségét* határozza meg? Nem a LHC-ben lévő „aktív” chl *a* molekulák emisszióját méri elsősorban a módszer és csak másodlagosan lehet következtetni a PSII RC aktivitására/állapotára?
- magas fluoreszcencia érték alacsony (alacsonyabb) nem-fotokémiai aktivitást jelent, illetve fordítva (Rohacek et al. 2008.: „If the efficiency of the photochemical processes increases, it leads to the decrease in quantum yields of the nonphotochemical ones and vice versa.”). Kontrollban az F_o esetében a PSII RC nyitott, fény hatására maximálisan elkezdhet működni, míg F_m értéke pedig valamilyen egyensúlyi helyzet eredője (mint ahogy az egész Kautsky görbe lefutása alatt is).

3. Az aszkorbát a hosszan tartó sötétségben inaktíválja a vízbontó komplexet

Ez a fejezet majdnem 4 oldalas és a Podmaniczki és mtsai (2013) *Physiol. Plantarum* cikkre támaszkodik.

A felhasznált kísérleti növények: *At*, vad típus; *At vtc2-4*, csökkent Asc tartalmú mutáns; *At psbr* és *psbo* mutánsok.

Elvégzett kísérletek, használt módszerek:

- OJIP görbe felvétele kontroll és 1 napos sötét kezelést követően
- termolumineszcencia (TL) görbe felvétele
- Western blotting
- chl és Asc tartalom meghatározás
- mikroszkópia
- fenotípus bemutatás
- genomi PCR gén- és T-DNS-specifikus primerekkel.

A fejezetben leírt kísérleti eredmények azt mutatják, hogy az Asc inaktíválja a vízbontó komplexet, tehát az Asc-nak nem csak jótékony, hanem negatív hatása is van. A döntő kísérleti eredmények - ugyan úgy mint a korábbi fejezetekben leírt kísérletek esetében is – OJIP kinetika és termolumineszcencia méréseken alapulnak.

A fejezettel kapcsolatos gondolatok, kérdések:

- A fejezet végén az áll, hogy „... az Asc negatívan szabályozhat bizonyos élettani folyamatokat, ezért állhat annak koncentrációja és lokalizációja szabályozás alatt a növényi sejtekben, amelyet feltétlenül figyelembe kell venni akkor, ha magas Asc-tartalmú növényfajták előállítását tűzzük ki célul.” Ezzel kapcsolatban több megjegyzés, probléma merül fel.
- Egyrészt látni kell azt, hogy a jelenleg termesztett gyümölcsök és zöldségek Asc tartalma lényegesen alacsonyabb, ha a korábbi fajtákhoz viszonyítunk. Ez feltételezhetően azzal van összefüggésben, hogy a szelekció nem a magas C-vitamin tartalomra történt, hanem a hozamra és egyéb tulajdonságokra (pl. polcállóság, rezisztencia). Ha a C-vitamin növekedésre történne a szelekció, akkor az előbb említett tulajdonságok valószínűleg kevésbé nyilvánulnának meg. Ezért óvatosnak kell lennünk a nemesítéssel, mert talán elő tudunk állítani magasabb C-vitamin tartalmú fajtákat (kicsi, zöld, de a miénk), azonban nem biztos, hogy azok kelendők lennének. Mit javasolna a jelölt, ha magas C-vitamin tartalmú növények nemesítésében kellene tanácsot adnia a nemesítő szakembereknek?
- Másrészt, ha körülnézünk a piacon lévő zöldségek gyümölcsök között, akkor azt láthatjuk, hogy a C-vitamin tartalom tág határok között mozog. Érdemes lenne rájönni arra, hogy a brokkolinak miért majdnem háromszor magasabb a C-vitamin tartalma, mint a spenótnak? Milyen kísérleteket végezne a jelölt, ha az lenne a feladata, hogy derítse ki, mi az oka ezeknek a különbségeknek?

4. Az aszkorbát bioszintézisének szabályozása zöldalgákban

Ez a fejezet 3 és fél oldalas és két publikáción alapszik, Vidal-Meriales és mtsai, 2017. New Phytologist és Tóth és mtsai, 2018. Antiox Redox Signal.

A felhasznált kísérleti növények: *Chlamydomonas reinhardtii* EV2, kontroll törzs ; *Cr VTC2-A27*, *VTC2*-ami RNS vonal. (Úgy látom, hogy ezek a törzsek nem szerepelnek az Alkalmazott anyagok, módszerek fejezetben, ahol a kísérletekben felhasznált törzsek vannak felsorolva).

Elvégzett kísérletek, használt módszerek:

- Asc tartalom meghatározás
- transzkript analízis, Rose Bengal és DCMU kezelés

Elért eredmények:

- a zöldalgák kevesebb Asc-ot tartalmaznak, mint a magasabb rendű növények
- DCMU serkenti az Asc bioszintézisét
- fény és stressz hatására (szabad gyökök, H_2O_2 , 1O_2) növekszik az As tartalom
- a cirkadian óra nem szabályozza az Asc bioszintézisét
- az Asc fokozza a saját bioszintézisét

Kérdés: Elképzelhető a zöldalgák Asc tartalmának növelése?

5. Az aszkorbát szerepe az algák nem-fotokémiai kioltásában

Ez a fejezet kicsit több, mint 3 oldal és , Vidal-Meireles és mtsai., 2017. Plant Physiology cikke épül.

A felhasznált kísérleti növények: *Chlamydomonas reinhardtii* CC-4533, kontroll törzs ; *Cr vtc2-1*, alacsony Asc mutáns.

Elvégzett kísérletek, használt módszerek:

- DNS szekvenálás
- genetikai komplementálás
- NPQ (nem-fotokémiai kioltás) meghatározása, ezen belül a qE, qZ és qI komponensek vizsgálata
- de-epoxidációs index meghatározása

Zöldalgákban a violaxanthin de-epoxigenázt - amely a magasabb rendű növényekben a violaxanthin-xanthin átalakulást végzi Asc jelenlétében - nem befolyásolja az Asc, azaz ennek hiányában nem csökken az NPQ. Az Asc szerepe a szabad gyökök általi fotoinhibíció csökkentése.

A fejezettel kapcsolatos gondolatok, kérdések:

- a fentiek szerint az Asc nem kofaktora a CrVDE enzimnek? Ha nem az Asc, akkor mi a kofaktor?
- a *Cr vtc2-1* mutáns inszerciós mutagenizálással készült. A disszertációban az szerepel, hogy nem mutatható ki transzkript a CrVTC2 génről, mégis a kontrollhoz képest 10 %-nyi Asc-ot tartalmaz. Hogy lehet ez? Van egy második VTC2 gén is úgy mint az *At*-ban? Vagy mégis van valamilyen VTC szekvencia (darabot) kódoló transzkript (lásd Vidal-Meireles és mtsai, 2017 Plant Physiology, 1E ábra utolsó előtti sáv, ahol a 35 ciklus esetében megjelenik egy RT-PCR termék.).
- a 16. ábra A és D görbével kapcsolatban: az ember azt várja, hogy a két görbe (a CC-5433 H₂O₂ és kataláz nélkül) többé-kevésbé hasonló. Ennek ellenére úgy tűnik, hogy a két görbe lefutása (felfutása) lényegesen eltér. Mi lehet ennek a magyarázata? A mutáns esetében a két görbe (B és E , *Crvtc2-1* H₂O₂ és kataláz nélkül) elfogadhatóan megegyezik.

6. Az aszkorbát hatása az zöldalgák hidrogéntermelésére

Ez a fejezet a leghosszabb, majdnem 6 oldal és 4 cikk alapozza meg: Nagy és mtsai., 2012, Int. J. Hydrogen Energy; Nagy és mtsai., 2016. Plant Cell Environ; Nagy és mtsai., 2018. Plant J; Tóth és Yacoby, 2019. Trends Biotechnol.

A felhasznált kísérleti növények: *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124. Elvégzett kísérletek, használt módszerek (ami a disszertációban szerepel):

- H₂ és O₂ mennyiségi meghatározás
- a fotoszintetikus apparátusban résztvevő fehérjék (PsbA, PSBO,CP43, PetB, PsaA,Rbcl) változása kén limitált és linkomicin jelenlétében is hiányában
- fluoreszcencia érték (F_V/F_M) meghatározás
- VTC expressziójának meghatározása
- Asc tartalom mérés
- B sáv mérés termolumineszcenciával

Fontosabb megállapítások:

- kénmegvonás hatására reduktánsok keletkeznek az Asc tartalom nö (mivel a VTC2 génextpresszió növekszik)
- Asc megbontja az OEC-t, ennek következtében szabad, oxidált gyökök keletkeznek, donor oldali fotoinhibíció következik be, ennek hatására hipoxia keletkezik és megjelenik a HydA hidrogenáz majd termelődik a H₂.

Kérdés:

- mivel nem találtam rá adatot, megkérdezem, hogy a Jelölt hogy áll szabadalom szempontjából, hiszen a szabadalmak hasznosak, ha hozzájárulnak a tudományos munkához?
- mit gondol a Jelölt, Magyarországon lehet rentábilisan hidrogént előállítani? Ha igen, akkor milyen technológiával és hol adottak a lehetőségek?

A disszertáció véleményzése

A disszertációról összességében elmondható, hogy a Jelölt az Asc hatását vizsgálta magasabb rendű növényekben és zöldségben spektroszkópiai és egyéb, pl. molekuláris biológia módszerekkel. Több fontos megállapítást tett, amelyeket a dolgozatban leírt kísérleti eredmények (a csatolt cikkeket is ide értve) találhatók.

A disszertáció újdonságának azt tartom, hogy a jelölt eddig még nem publikált eredményeket közölt *in vivo* elvégzett kísérletekről a magasabb rendű növény, *Arabidopsis thaliana* és a zöldség, *Clamydomonas reinhartii* aszkorbát bioszintézisével és annak a fotoszintetikus rendszerben betöltött szerepéről, valamint a *Clamydomonas reinhartii* hidrogén termeléséről. A dolgozat hiányának tartatom annak szakmai/formai megjelenését, részletesebb információ közlés és magyarázatok elmaradása tekintetében, ez azonban nem befolyásolja a Jelölt és a disszertáció szakmai érdemeit.

A dolgozat kísérleti eredményei valós, hiteles adatokat tartalmaznak, amit az is bizonyít, hogy a tudományos eredményeket olyan rangos folyóiratokban közölte, amelyek független, külföldi szakemberek ellenőrzése (bírálata) alatt állnak.

A következő, a disszertációban szereplő téziseket fogadom el, mint új donságokat:

1. *Arabidopsis thaliana*-ban a külső környezeti faktorok (pl. hő) hatására inaktiválódott vízbontó komplex helyett az aszkorbát szolgál alternatív elektron donornak *in vivo*.
2. *Arabidopsis thaliana*-ban a külső környezeti faktorok (pl. hő, fény) hatására a 2-es fotoszintetikus reakciócentrumok inaktiválódnak, majd degradálódnak, mely folyamatot az aszkorbinsav - alternatív elektrondonorként működve - lassít.
3. *Arabidopsis thaliana*-ban hosszú, sötét periódus alatt a aszkorbát képes inaktiválni a vízbontó komplexet, tehát káros hatása van.
4. *Clamylomonas reinhartii*-ben az aszkorbát bioszintézise a magasabb rendű növényekben leírt bioszintetikus úton keletkezik, azonban élettani szabályozása eltér, mert nem áll foroperiodikus kontroll (circadian ritmus) alatt és pozitív visszacsatolás által szabályozódik.
5. *Clamylomonas reinhartii*-ben az aszkorbát nem szabályozza a violoxantin deepoxigenáz rendszert, mely a nem-fotoszintetikus kioltás része (qE komponenes), másrészt, hogy az aszkorbát a a szabadgyökök által indult fotoinhibíciós kioltási mechanizmus (qi) mérséklése.
6. *Clamylomonas reinhartii*-ben a kénmegvonás hatására redukáltok keletkeznek és az Asc tartalom nő, ami megbontja az vízbontó komplexet, aminek következtében szabad, oxidált gyökök keletkeznek és donor oldali fotoinhibíció következik be, ennek hatására hipoxia keletkezik és megjelenik a HydA hidrogenáz majd termelődik a H₂.

A disszertáció, az MTA által előírt tudományometriai kritériumoknak minden kétséget kizáróan megfelel. Hozzáteszem, hogy a Jelölt igen termékeny cikkíró, úgy tűnik nem sok eredmény marad(t) a fiókban. Vizsgálatai nem csak tudományos, hanem gyakorlati szempontból is fontosak (pl. C-vitamin, H₂ termelés).

Summa summarum, véleményem szerint a dolgozat megfelel az MTA doktori fokozat feltételeinek ergo a disszertáció nyilvános vitára bocsátását és az MTA doktori fokozat odaítélését javaslom.

Szeged, 2021. december 12.

Dr. Kiss György Botond
az MTA doktora