

Opponensi vélemény

Ördögné Kolbert Zsuzsanna

„A nitrogén-monoxid növekedésszabályozó, toleranciafokozó és nitro-oxidatív stresszt kiváltó szerepei elemtöbbletek hatására növényekben.”
című MTA doktori dolgozatáról

Általános megjegyzések

Ördögné Kolbert Zsuzsanna MTA doktori értekezésében a 2010-es években végzett munkásságának eredményeit foglalja össze. A munka előzménye Jelölt korábbi, Erdei László professzor úr vezette kutatásai, a követett kutatási irányok azok kiterjesztésének tekinthetők. Jelölt akkori, előrelátóan megválasztott PhD témájának, a nitrogén-monoxid és a stresszválaszok összefüggéseinek nagy jelentősége azóta nyilvánvalóvá vált, ma már a kutatások homlokterében áll. Az értekezésben több, ebben a témakörben egymáshoz kapcsolódó projekt van összefoglalva, amik tükrözik a szerző érdeklődési irányának formálódását, annak állomásait.

Az értekezés gondosan megírt, alakilag is tetszetős, jól formázott munka. Főbb részei arányos terjedelműek. Szerkesztésén érezhető az oktatási tapasztalat az információk megfelelő tárlására. A szakzsargon esetenként túlzottan alkalmazza, az angol szakkifejezések helyett több helyen a magyar megfelelők is használhatóak lettek volna (pl mediál, messenger, riporteraktivitás, fehérjeabundancia). A dolgozatban csak igen kevés elütést, szöveghibát találtam. Ezeket a bíráló végén észrevételként külön megemlítem.

Új tudományos eredményeit 5 fő pontban foglalja össze. Ezek alapjául 16 referált publikációt jelöl meg, de ezen túl is számos közleménye kapcsolódik az értekezés témaköreihez. Tudományos teljesítménye az utóbbi években emelkedik, a publikációk és hivatkozások számában egyaránt. Közleményei jellemzően magas színvonalú szakfolyóiratokban jelentek meg.

Jelölt értekezésbe foglalt kísérleteit az elemtoxicitás, a gyökérfejlődés és a nitro-oxidatív stressz témakörei fűzik össze. Az értekezés lúdfű modellnövényen és haszonnövényeken elért eredményeket egyaránt tartalmaz.

Az értekezés részletes bírálata

Irodalmi áttekintés

A fejezet lényegre törően, általában kellő alaposággal foglalja össze azokat az ismereteket, amik a munka háttérül szolgáltak. A Stresszindukált Morfogenikus Válasz (SIMV) esetében a szakirodalmi áttekintés viszont szűkszavú. Itt a szerző saját (Kolbert 2016) publikációt is megad forrásként, ami nem szerencsés, hiszen ez a közlemény a tézisek alapjául szolgáló cikkek között is szerepel. A továbbiakban a vizsgált elemek biológiai szerepeinek bemutatása mellett kitér az elemtoxicitások lehetséges molekuláris mechanizmusaira. Említést tesz az elemek esetében a környezeti szennyezések forrásaira, ami utal a kutatások egyes gyakorlati vonatkozásaira. Az elemek műtrágya/lombtrágya formában történő kijuttatása azonban szintén

lehetséges forrása az elemtoxicitásnak, ami itt említhető lett volna. Hiányoltam a nanorészecskék mezőgazdasági hasznosításának legalább vázlatos bemutatását is, mivel az a kísérletekhez kapcsolódó, gyorsan fejlődő, igen perspektívikus alkalmazási terület. A fejezet végén leírja a hiperakkumuláció jelenségét, és néhány ezzel kapcsolatos élettani mechanizmust.

- A hiperakkumuláló fajok/genotípusok között ismertek-e olyanok, amikkel Magyarországon folynak fitoremediációs projektek?

A következő alfejezetben – „A gyökérnövekedést szabályozó belső faktorok” - a kísérletekben szereplő hormonok általános és a gyökérfejlődéssel kapcsolatos speciális vonatkozásait mutatja be a Jelölt.

- A cím alapján ebben helyet érdemelt volna akár az abszcizinsav, de különösen a brassinoszteroidok. Utóbbi hormonok kapcsolata a nitro-oxidatív stresszel és gyökérnövekedéssel különösen izgalmas terület az utóbbi évek kutatási eredményei alapján.

A továbbiakban a NO növényélettani szempontból történő jellemzése megfelelően részletes, itt az összefüggéseket néhány jól szerkesztett ábra teszi szemléletessé. Kitér a kiválasztott hormonok és a NO kölcsönhatásainak bemutatására is. A NO/etilén kölcsönhatás leírását annyiban kiegészíteném, hogy az nemcsak gátló, de serkentő hatása is lehet. Ezt pl hypoxia stressz esetében, légjáratok kialakulásánál és járulékos gyökerek képződésénél figyelték meg.

Kutatási célok

A kitűzött célok a stressz kiváltotta fenotípustól a sejtben működő molekuláris mechanizmusok felé haladtak. A projektek fókuszának alakulása mutatja, hogy a kutatás fontossága mellett a fontosság kutatása is meghatározta a munka irányát. Modellnövény rendszer mellett haszonnövényekben is igyekeztek releváns összefüggéseket feltárni.

Anyagok és Módszerek

A fejezet tömören, a lehetőségekhez képest részletesen megadja a használt módszerek kulcstényezőit. Az alkalmazott módszerek sokrétűek, a kutatásokban a molekuláris biológia számos modern technikáját felvonultatták. A fluoreszcens mikroszkópiás módszerek különösen alkalmasnak bizonyultak a felmerült kérdések megválaszolására.

Eredmények és Az eredmények megvitatása fejezetek

Az 5.1 és 5.2 fejezetekben bemutatott kísérletek különböző fajok gyökérnövekedési válaszait összegzik elemtöbbletek esetén. Legmeggyőzőbben az eredmények réz esetében utalnak a SIMV konzekvens megjelenésére, más vizsgált elemeknél a válasz fajfüggőnek, illetve részlegesnek mutatkozott. A bemutatott kísérleti eredmények nézetem szerint nem adnak egyértelmű bizonyítékot arra, hogy a SIMV egy fajtól független, általános gyökérnövekedési válasz lenne, még a vizsgálatok körén belül sem.

Az 5.3 fejezet első részében a kísérletek a rézterhelés, Auxin és NO hatások összefüggéseit kívánják felderíteni lúdfű modellnövényben. A következtetések szerint a hormon és a réz indukált NO kölcsönösen gátolják egymást. A továbbiakban szelénterhelés esetén hormonspecifikus promóter-GUS jelzőgén konstrukciók, valamint mutánsok segítségével a NO valamint Auxin, Cytokinin és Etilén esetén is ugyanezt a következtetést vonták le.

Cytokininekre vonatkozóan részletesebb vizsgálatok megerősítették a hormonok és a NO közötti antagonistá kapcsolatát szelénstressz esetén. A következtetések szerint a NO kölcsönhatásai befolyásolhatták a Cytokinin szelén tolerancia fenntartó szerepét, a válaszok azonban szervspecifikusak és koncentráció függők voltak. Valószínűleg a hatékony Cytokinin típusa (BA vs Zeatin) szintén befolyásolhatta a kísérletek kimenetét. Ugyanakkor maga a NO is fokozta a szelén stressz toleranciát. A szelén, NO és az etilén szintek és jelátvitel közötti kapcsolat jellemzését több kísérlettel is célozták. Összességében ezek eredménye meggyőző arra nézve, hogy a szelén indukált NO serkenti az oldalgökök fejlődését, míg az etilén gátolja ezt a hatást. Az egyes kísérletekkel kapcsolatban néhány megjegyzés: A 17. ábra A/ és C/ részében bemutatott eredményeknél a szelén kezelt vad típusú növények oldalgökök képzése eltérő értékeket mutat. A 20/A ábra adatai alapján szövegszerűen megfogalmazott eredmények szerint az NO szint növelése (GSNO-val) fokozta, visszafogása (cPTIO-val) pedig lecsökkentette a kifejlett oldalgökök számát vad típusú és *etr1* mutánsban egyaránt. A mutánsra nézve azonban a bemutatott adatok alapján a szelén + cPTIO kezelés nem változtatta meg a kifejlett oldalgökök számát szignifikánsan a csak szelénkezeltékhez képest. A GSNO kezelés adatai, és az egyéb kísérletek eredményei e nélkül is valószínűsítik a feltételezett fenti összefüggés helyességét.

- A 20/B ábrán bemutatott ACS8:GUS génexpressziós eredmények szerint a szelén vad típusú lúdfűben is indukálni látszik a promotert, míg a 18 ábra adatai alapján ez csak az *etr1* mutánsban figyelhető meg. Van-e esetleg számszerű érték a GUS gén kifejeződésére, illetve magyarázat az esetleges eltérésre?

Az 5.3 fejezet utolsó részében Jelölt a NO és a strigolaktonok és karrikinok kapcsolatát vizsgálja stresszmentes körülmények között. Bár a fejezet az értekezés többi részéhez szorosan nem kapcsolódik, érdekes megfigyeléseket tartalmaz és újszerű következtetésekre ad lehetőséget. Strigolakton, karrikin és *gsnor* mutánsok, valamint génexpressziós vizsgálatok segítségével kölcsönös kapcsolatot mutatott ki a strigolaktonok és a NO szabályozás, különösen a GSNOR aktivitás között. Ezen túl karrikin receptor mutáns gyökerekben is magasabb NO szintet talált, ami utalhat a karrikinok szerepére a NO szabályozásban.

Az 5.4 fejezetben Jelölt visszatér az elemtöbbletekkel szembeni tolerancia vizsgálataihoz, azokban kívánja a reaktív nitrogén és oxigénformák szerepeit meghatározni. Elsőként rézkezelés esetében vizsgálja a reaktív nitrogén formák befolyását a stressz kimenetére. A levont következtetés szerint rézstressz esetén a NO csökkenti a ROF (szuperoxid gyökion és hidrogén peroxid) szinteket., és ezzel emeli a toleranciát. Ez a következtetés összességében elfogadható. Zavaró hiányosságként jegyezhető itt meg az, hogy az eredmények szöveges megfogalmazása és a bemutatott 26/B ábra adatai nem felelnek meg teljes mértékben. A szelén tolerancia hasonló célú vizsgálatánál az eredmények a NO-t ennek az elemnek az esetében is kedvező hatásúnak mutatták. Zn terhelés esetében elsőként *gsnor* mutáns és 35S:FLAG-GSNOR1 túltermelő lúdfű vonalakat tanulmányoztak. A mutáns Zn toleranciája nőtt, míg a túltermelő csökkent tolerancia indexük alapján. A gyökerek merisztéma régiójában a *gsnor* mutáns Zn felhalmozása alacsony volt (33B ábra), ezért toleranciájának alternatív magyarázatoként a Zn felvételben történő változást nem lehet teljesen kizárni. Zn stressz hatása alatt a vad típusú és 35S:FLAG-GSNOR1 növényekben a GSNOR aktivitás csökkenését tapasztalták, amiben feltételezhető volt a hidrogén peroxid gátló hatása. A *gsnor* mutáns alacsony SNO szintjének magyarázatát lehetséges módon a tioredoxinok megemelkedett

denitroziláz aktivitása adhatja. Ezt valószínűsíti a NADPH függő tioredoxin reduktáz aktivitás Zn függő indukciója, ami megkülönböztette a genotípust a vizsgált többi vonaltól. A számos lehetséges tioredoxin gén egyikének esetében a génkifejeződés indukcióját tapasztalták.

- Milyen meggondolás alapján választották ki a génexpresszió szintjén vizsgált két tioredoxin gént?

Az eredmények Zn esetében is valószínűsítik a reaktív nitrogén formák részvételét a Zn tolerancia kialakításában.

Az 5.5 fejezetben modellnövény fehérjéinek cink hatására történő nitrozilációját és nitrációját, majd ZnO nanorészecskék nitro-oxidatív hatásait vizsgálták különböző fajokban.

A cink kiváltotta nitroziláció mérésénél 10 célfehérjét azonosítottak lúdfüben, köztük egy aszkorbát-peroxidázt. A vizsgálatok szerint a Zn terhelésre nitrozilált APX enzimaktivitása csökkent, ami nem felel meg az irodalomból ismert, nitrozilálással kiváltott aktiválódásnak. Az aktivitás csökkenéssel ugyanakkor megítélésem szerint kevésbé magyarázható az APX hidrogén peroxid homeosztázisban betöltött, javasolt szerepe.

- Az APX mellett lehetséges-e a nitrozilált fehérjék valamelyikének (laktát/malát DH, GA3P-DH, riboszomális fehérjék, RubisCo kis alegység) ismert funkcióit a nitro-oxidatív stressz válaszhoz kapcsolni?

A nitrátság vizsgálata (39. ábra) annak kismértékű növekedését mutatta lúdfüben, kivéve a *gsnor* mutáns növényeket, ahol csökkenés volt tapasztalható. Utóbbi jelenséget Jelölt lehetséges indukált denitrációs vagy fehérje lebontási folyamatokkal magyarázta. Új nitrált fehérjék egyik genotípus kezelése esetében sem jelentek meg.

A továbbiakban az értekezés eltérő Zn tőrésű *Brassica* fajok vizsgálatait mutatja be. Zn kezelés hatása alatt, gyökérmerisztéma sejtek életképessége alapján a *B. napus* érzékeny, a *B. juncea* toleránsnak bizonyult az alkalmazott Zn koncentrációkra. Reaktív oxigén és nitrogén fajták, valamint kapcsolódó enzimaktivitások mérése alapján Jelölt a toleranciát az indukálódó SOD aktivitással, az érzékenységet a megemelkedő hidrogén peroxid szinttel hozta kapcsolatba. A tirozin nitráció hosszú távon a toleráns faj gyökerében intenzívebben növekedett, ugyanakkor lipidperoxidáció jeleit kizárólag a *B. napus* gyökércsúcs mutatta. Ez alapján levonható volt a következtetés, hogy az érzékeny fajt a kombinált nitro-oxidatív stressz károsította, míg annak oxidatív komponense (ROF-k) ellen a toleráns faj hatékonyabban védekezett.

ZnO nanorészecske kezelés hatásait ugyanezen a két *Brassica* fajon vizsgálták. A 44. ábra a ZnO-NP kiváltotta gyökérmerisztéma sejt életképesség változások mellett a gyökérnövekedést is bemutatja. Számomra meglepő módon azonban a két mérés eredménye nem korrelált. Növekvő ZnO-NP koncentrációk mellett *B. napus* esetén csökkenő életképességet és nagyobb gyökér növekedést, *B. juncea* esetén azonos életképesség mellett nagyban eltérő növekedést látunk. Ez arra utal, hogy a gyökérmerisztéma életképessége nem feltétlenül adekvát jelzője a növekedési potenciálnak.

- A gyökér merisztéma sejtek életképesség értékei mennyire korreláltak gyökérnövekedés mértékével más kísérletek során? Melyik érték lehet jobb jelzője a gyökér funkcióképességének?

A ZnO-NP kezelt növények további részletes vizsgálata a *B. juncea* hatékonyabb transzlokációját a tolerancia egy lehetséges fokozójaként azonosította. A nitrooxidatív stressz tényezői közül a NO és a peroxinitrit szintjeit találta döntőnek, amik a toleráns faj kezelt gyökércsúcsaiban magasabb koncentrációban voltak megtalálhatók. A RNF-k indukcióját a

GSNOR hidrogén-peroxid kiváltotta inaktivációjával indokolta *B. juncea*-ban. A 49/C ábra alapján azonban a *B. juncea* GSNOR aktivitása 25 mg/L ZnO kezelésnél magasabb volt, mint a *B. napus*-é ugyanilyen ZnO kezelés mellett, ezért ez a magyarázat további kiegészítést igényel.

Ezután a dolgozat a szelén toxicitás vizsgálatára tér át, amit *B. juncea* fajon vizsgál. Az elem két formája közül a reaktívabb szelenitet mérgezőbbnek találta a szelenátnál. A reaktív oxigén és nitrogén fajták között is különbségeket talál, mind a szelén formák, mind azok koncentrációja tekintetében. Az 52/A ábrán bemutatott kísérleti eredmények esetében viszont szükség lenne a kétféle kezelés kontroll értékei közötti eltérés magyarázatára. A kísérleteket összesítve a toxicitásban döntő tényezőnek a szelenit kezelt növények magasabb peroxinitrit szintjét emeli ki, ami valószínűleg összefügg az ott tapasztalt erősebb fehérjetirozin nitráltsággal. A következtetést a bemutatott eredmények kellően megalapozzák.

Az értekezés következő, számomra legérdekesebb részében a szelént hiperakkumuláló és tűró *Astragalus bisulcatus* valamint a szelénre érzékeny *Astragalus membranaceus* korábban megkezdett összehasonlító vizsgálatait folytatja, azt molekuláris eszközökkel kiterjeszti. A ROF-k közül a szuperoxid gyökionra, az azt képző NOX, és átalakító SOD enzimekre koncentrálna, azok izoformáit is vizsgálja. A SOD esetében közölt gélfotó nem túl részletgazdag, a látható jelek között a Cu/Zn SOD aktivitás számomra nem tűnik egyértelműen erősebbnek az *A. bisulcatus* esetében.

- A számos lehetőség közül, ahogyan szuperoxid-gyökion képződhet, miért éppen a NOX enzimaktivitást vizsgálta? Volt valamilyen utalás ennek a kiemelt jelentőségére szelén terhelés mellett?

Ezek mellett meghatározta a fő RNF-k, GSNO szintek és GSNOR enzim aktivitás változásait is a kezelések során. A GSNOR aktivitás leírása (101. oldal) és az 56/E ábra nincsenek összhangban, az ábrán a fajok jelölése felcserélődhetett. Az 57. ábrán bemutatott fehérjetirozin-nitrációs analízis alapján Jelölt az *A. membranaceus* érzékenységének közvetlen okaként a proteom jelentős tirozin nitráltságát jelöli meg.

A dolgozat utolsó részében Jelölt a nikkeltűrő nitro-oxidatív vonatkozásainak felmérését végzi. Ebből a célból először a lúdfüvet és *Brassica juncea*-t hasonlítja össze. Nikkel terhelésre a toleráns *Brassica* és az érzékeny lúdfű ROF és RNF jelátvitelének vizsgálatából a különbséget a kétféle válasz arányaival és a proteinnitráció szintjének eltéréseivel magyarázza. Ezt követően nikkeltűrő hiperakkumuláló *Odontarrhena lesbiaca* különböző Ni szintet felhalmozó ökotípusait hasonlítja össze.

- A szenzitív ökotípus vártól elmaradó fehérjenitrációját a proteom alacsony nitráció-érzékenységével magyarázza. A proteom milyen különbségei okozhatják ezt? Ismert-e olyan példa, ahol akár bioinformatikai eszközökkel ilyen összefüggést alá tudtak támasztani?

Az eredményeket összegezve szelén és nikkeltöbblet esetében a nitro-oxidatív stressz mértékét összefüggőnek találta a toleranciával, cink és ZnO-NP stressznél ilyen következtetést nem tudott levonni.

Kérdések a kísérleti eredményekhez és lehetséges hasznosíthatóságukhoz

- Milyen géntechnológiai módszert lát alkalmasnak az értekezés tudományos eredményeiben szereplő, az elemtöbblet toleranciával kapcsolatos ismeretek alapján haszonnövények elemtűrésének javítására? Ismertek-e ilyen szakirodalmi példák a tolerancia növelésére, és ezek között van-e olyan, amelyeknek gazdasági szempontból jelentősége lehet?
- A kísérletek elsősorban csíranövény gyökerek illetve sziklevelek élettani és molekuláris jellemzését célozták. A sziklevelek (fajfüggő mértékben) tartalékoló szerepet is betöltenek, ezért biokémiai és élettani folyamataikban nem feltétlenül tükrözik a valódi levelek válaszait. Az eredmények között melyek azok, amik legnagyobb biztonsággal megfelelhetnek a kifejlett növény viselkedésének?
- A kísérleti rendszerekben különböző NO donorokat használtak (SNP, SNAP, GSNO). Tapasztaltak-e ezek között bármilyen különbséget, vagy mennyire esetleges volt a kiválasztásuk?

Néhány további észrevétel

A 11. oldalon a szelenit és szelenát ionok képletei felcserélve szerepelnek

Az 57. oldalon citokininek helyett szelenit enzimatis lebonása szerepel

A 26/C, D ábrarész hivatkozása a szövegben hibás

A 38. ábrán szereplő Western blot GSNOR vagy APX fehérje mennyiségét mutatja?

Az 52. ábra alsó panel megnevezése hiányzik az ábra aláírásból

A 98. és 106. oldalakon a hivatkozott ábrák száma helytelen

A 130. oldalon az *Astragalus* fajok nevei egy esetben fel vannak cserélve

Összefoglalás, vélemény

Ördögné Kolbert Zsuzsanna doktori értekezésében egy évtizedes aktív és eredményes kutatói munkásságát foglalta össze. A mű színvonala, az eredmények újdonságértéke, valamint az értekezés alapjául szolgáló publikációk száma és minősége igazolják a Jelölt alkalmasságát az MTA doktora címre. Mindezek alapján javaslom a nyilvános vita kitézését, annak sikere esetén az MTA Doktora cím odaítélését.

Budapest, 2023.09.20.



Dr. Papp István
egyetemi tanár
MATE, Növénytermesztési-tudományok Intézet
Növényélettan és Növényökológia tanszék