

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A PP2A protein foszfatázok szerepe a sejtosztódás szabályozásában *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcs merisztéma sejtekben

Kelemen Adrienn

Témavezető: Prof. Dr. Máthé Csaba

Külső konzulens: Dr. Martine Pastuglia



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2025

1. A doktori értekezés kutatási előzményei és célkitűzései

A fehérje foszforiláció és defoszforiláció a reverzibilis poszttranszlációs módosítások egyik fő formáját képviseli, gyakran „be- és kikapcsolóként” szolgál, amely az eukarióták számos celluláris folyamatát szabályozza azáltal, hogy modulálja a szubsztrát fehérjék konformációját, aktivitását, lokalizációját és stabilitását, így befolyásolva az anyagcserét, jelátviteli útvonalakat és a sejtciklust. A szerin/treonin specifikus foszfoprotein-foszfátázok, minden eukariótában mindenütt jelenlévő enzimek (Smith & Walker, 1996). A PP2A a sejtciklus szabályozása során több mint 300 szubsztrátot képes defoszforilálni, így befolyásolva a sejtosztódás szinte minden fázisát és biztosítva a mitózis megfelelő előremenetelét (Wlodarchak & Xing, 2016). A PP2A egy három alegységből álló multifunkciós holoenzim komplex. Tartalmaz egy A „scaffolding” alegységet, egy C katalitikus alegységet és egy varábilis B regulátor alegységet, ami meghatározza a szubsztrát specificitást és az enzimkomplex lokalizációját. Az egyes alegységek számos izoformában vannak jelen, amelyek hozzájárulnak a PP2A funkcionális sokféleségéhez (Luan, 2003).

A hiszton fehérjék a kromatin fő összetevői, amelyeket számos poszttranszlációs módosítás szabályoz. A reverzibilis hiszton H3 foszforiláció kulcsfontosságú szerepet játszik a kromoszómák kondenzációjában és kohéziójában a mitózis folyamata alatt. Növények esetében a szerin 10-es és 28-as aminosav maradékokon történő reverzibilis foszforiláció szükséges a kromoszóma kohéziójának a szabályozásához és a megfelelő testvérkromatida szegregáció végbemeneteléhez. A mitózis során a hiszton H3 foszforilációs mintázata dinamikusan változik, a profázisban jelenik meg először és folyamatosan kezd emelkedni a foszfo-hiszton szint, a metafázisban éri el a csúcst, majd a kromoszóma szegregációval elkezd csökkenni a foszforiláció mértéke. A folyamat szabályozásában jól ismert az Aurora

kinázok szerepe a mitózis korai fázisaiban (Houben *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014), azonban a defoszforilációban szerepet játszó protein foszfatázokat a növényekben még nem azonosították egyértelműen. Különböző modellnövényekkel végzett kísérletek, mint például *Vicia faba* (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018), vagy *Ceratophyllum submersum* (Ujvárosi *et al.*, 2019), valamint állati (Nowak *et al.*, 2003) és humán (Huang *et al.*, 2005) sejtekkel végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy a PP2A kulcsfontosságú szerepet játszik ebben a folyamatban, hiszen gátlása vagy mutációja hiszton H3 hiperfoszforilációt és mitotikus hibákat okozott. Ugyanakkor továbbra sem egyértelmű, hogy a PP2A közvetlenül felelős-e a hiszton H3 szerin 10-es aminosavnál történő defoszforilációjáért, és a holoenzim mely alegységei lehetnek ebben kulcsfontosságúak.

A kutatásunk legfőbb célja a PP2A szerepének a vizsgálata a sejtosztódás során *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) gyökércsúcs merisztéma sejtekben. Vizsgáltuk a PP2A szabályozó szerepét különösen a kromoszóma szegregáció pontos időzítése és a mitózis előrehaladása során. A PhD kutatásom legfőbb fókuszában a reverzibilis hiszton H3 foszforiláció szabályozásának a vizsgálata állt mitózis alatt.

Célunk volt feltárni, hogy

- (i) a C3/C4 illetve a FASS alegység funkcióinak a kiesése hogyan befolyásolja a teljes protein foszfatáz aktivitást.
- (ii) van-e összefüggés a protein foszfatáz aktivitás megváltozása és a mitózist szabályozó folyamatok között.
- (iii) ezen alegységek hogyan befolyásolják az *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcs merisztéma sejtek mitotikus aktivitását, illetve hogyan befolyásolják a folyamat megfelelő végbemenetelét.

- (iv) mik a szerepük a hiszton H3 foszforilációjának szabályozásában a mitózis alatt, különös tekintettel arra, hogy vajon ezek azok a PP2A komplex alegységek melyek direkt részt vesznek a hiszton H3 defoszforilációjában a kromoszóma szegregáció után?

A PhD tanulmányaim során együttműködést alakítottam ki Dr. David Bouchez SPACE (Spatial Control of Cell Division) kutatócsoportjával az INRAE Kutatóközpontban Versailles-ben (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin for Plant Science (IJPB), Versailles, Franciaország), ahol három hónapot töltöttem és a kísérleteket Dr. Martine Pastuglia irányítása alatt végeztem.

A közös projektnek két fő célja volt:

- (i) Egyrészt tudományos szempontból a TTP foszfatáz komplex szerepét vizsgáltuk a mitózis folyamata alatt. A TTP komplexről már ismert, hogy szabályozza a kortikális mikrotubulus hálózatokat és irányítja a sejtosztódás térbeli szerveződését. Ez a multiprotein komplex magában foglalja a PP2A holoenzimet, amelynek FASS alegysége felelős a foszfatáz aktivitás szabályozásáért, ezenkívül egy TON1 nevű összeszerelő alegységet, valamint TRM fehérjét, amely a komplex lokalizációjában játszik szerepet (Schaefer *et al.*, 2017). Kutatásunkban azt vizsgáltuk, hogy a FASS alegységen kívül más alegységek is befolyásolják-e a reverzibilis hiszton H3 foszforilációt.
- (ii) Másrészt technikai céllal töltöttem három hónapot a kutatóintézetben, ahol immunlokalizációs kísérleteket végeztem, elsajátítottam a fejlett konfokális mikroszkópos képalkotást, majd hazatértem után folytatólagosan részt vettem a hiszton H3 fluoreszcens jelének detektálására és kvantifikálására szolgáló félautomata 3D módszer kifejlesztésében.

2. A kutatás során alkalmazott anyagok és módszerek

Kutatásainkhoz a növénybiológiai vizsgálatokban gyakran használt modellnövényt, az *Arabidopsis thaliana* Columbia ökotípust használtuk. Először genetikai megközelítést alkalmaztunk, vagyis a vad-típusú növények (Col0) mellett Columbia háttérrel rendelkező PP2A protein foszfatáz mutáns növényeket is vizsgáltunk. A *pp2ac3 pp2ac4* dupla mutáns (továbbiakban *c3c4*) esetében a C3 és C4 katalitikus alegységek funkciója esik ki (Alonso *et al.*, 2003; Ballesteros *et al.*, 2013; Spinner *et al.*, 2013), míg a *fass-5* és *fass-15* mutánsok esetében a B” regulátor alegység FASS izoforma funkciója hibás (Camilleri *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2012). A mutáció különböző mértékű morfológiai elváltozásokat okozott, legerősebb elváltozásokat a *fass-5* knock-out (KO) mutáns esetében láthatunk, ahol a növény gumószerű, szabad szemmel alig megkülönböztethető a hajtás és a gyökér.

Ezután farmakológiai megközelítést alkalmaztunk. Az öt napos csíranövényeinket mikrocisztinnel kezeltük 24 óráig. A mikrocisztin-LR (MCY-LR) egy cianobakteriális toxin, amely eutróf vizekben cianobaktériumok által okozott toxikus vízvirágzás során felszaporodhat és igen nagy stabilitásának köszönhetően hónapokig megmaradhat a vizekben és öntözővizekben, így a táplálékláncban is felszaporodhat ökológiai és humán egészségügyi kockázatot jelentve (Campos & Vasconcelos, 2010). A MCY-LR egy ciklikus heptapeptid, ami specifikusan gátolja a PP2A és PP1 protein foszfatázokat, emellett hatására megnövekedhet az intracelluláris reaktív oxigén formák (ROS) termelése a sejtekben, amely következtében oxidatív károsodásokat is okozhat (MacKintosh & Diplexcito, 2010). A mikrocisztin hatására bekövetkező protein foszfatáz gátlást és az oxidatív stressz indukálást követően különböző molekuláris események és jelátviteli útvonalak kaskádja indul el, amely membrán károsodásokat (lipid peroxidáció),

fehérje denaturációt, enzim inaktivációt, citoszkeleton rendezetlenséget és sérülést, mitokondriális permeabilitás változást és károsodást, DNS károsodásokat, vagy akár apoptózist válthat ki (Valério *et al.*, 2016; Máthé *et al.*, 2019). A vizsgálat során használt toxin koncentrációkat úgy választottuk meg, hogy a vizsgált időperiódusban ne okozzanak sejthalált, de váltsanak ki sejszintű elváltozásokat, így a kísérleteinkhez a környezetileg releváns 0,05 μM (Ujvárosi *et al.*, 2019) és 1 μM koncentrációkat használtunk. A MCY-LR tisztítását Kós és mtsai. (1995) módosított módszere alapján végezte Prof. Dr. Vasas Gábor és kutatócsoportja (Debreceni Egyetem, TTK, BÖI, Növényteni Tanszék) *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 jelű cianobaktérium törzs tenyészetéből. A sejteket centrifugálással gyűjtötték össze, majd extrahálták. A cianotoxin tisztítását DEAE Cellulóz-52 (Whatman DE 52) oszlopon végezték, majd Toyopearl méretkizárásos kromatográfiával tovább tisztították a szennyezőktől. A kinyert MCY-LR koncentrációját és tisztaságát HPLC-vel, valamint kapilláris elektroforézis módszerek segítségével állapították meg (Kos *et al.*, 1995; Vasas *et al.*, 2004). A vizsgálatban használt MCY-LR $\geq 95\%$ -os tisztaságú.

Az *in vivo* izotópos protein foszfatáz aktivitás méréseket, amely magában foglalja a PP1 és PP2A aktivitás együttes, illetve a külön-külön meghatározott aktivitásokat, a korábban leírtak szerint Erdődi és mtsai. (1995) módszere alapján Dr. Kónya Zoltán végezte (Debreceni Egyetem, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet). Radioizotópos biokémiai módszerek szubsztrátja a [^{32}P]-MLC20 (^{32}P -jelölt, 20 kDa-os pulyka miozin könnyű lánc), amely defoszforilálását sejt kultúrákban elsősorban a PP2A és PP1 végzi (Erdodi *et al.*, 1995). A PP1 és PP2A aktivitásának elkülönített vizsgálatához természetes PP1 gátlót, az Inhibitor-2 (I-2) alkalmaztuk, amely eukariótákban, így növényekben is blokkolja a PP1-et. Az I-2 hozzáadása után az extraktumokból a

PP2A aktivitását mértük, míg a PP1 aktivitást úgy számoltuk ki, hogy a teljes protein foszfatáz aktivitásból levontuk a PP2A aktivitás mértékét (Dedinszki *et al.*, 2015). A gátlószerek nélkül mért aktivitásokat 100%-nak tekintettük, és a kezelt mintákat a kontroll értékhez hasonlítottuk.

Specifikus foszforilált hiszton H3 (Ser10) elleni antitest (Hendzel *et al.*, 1997) segítségével vizsgálni tudtuk a hiszton H3 foszforilációs dinamikáját a mitózis alatt indirekt immunhisztokémiai jelölés, konfokális mikroszkópia és kvantitatív szignál analízis segítségével. A foszfo-hiszton fluoreszcens jelek (phH3S10) specifikusan az osztódó sejtekben jelentek meg fekete háttér előtt. A fluoreszcens jelintenzitást 2D-ben mértük és a pixelek átlag terület integrált optikai denzitásaként (AIOD) fejeztük ki. A kromoszómák kimutatására használt fluoreszcens festék (DAPI), illetve a mikrotubulusok vizualizációjára alkalmazott antitestek lehetővé tették a mitotikus aktivitások kvantitatív meghatározását a mitotikus index számításával (osztódó sejtek %-os aránya az összes sejthez képest) az összes osztódásban lévő sejt esetén, valamint külön vizsgálva a korai (profázis + prometafázis + metafázis) és kései (anafázis + telofázis) osztódási fázisokat. A foszfo-hiszton H3 és a mikrotubulusok kimutatására használt antitestek egyféle gazdaállatból származtak, így ezeket a jelöléseket külön-külön végeztük el; minden esetben DAPI-val jelölve a kromatint. A whole-mount módszer lehetővé tette, hogy a szövetek metszése nélkül, egész csíranövényben vizsgálhassuk a kimutatni kívánt fehérjéket és sejtalkotókat. Az eljárás főbb lépései: fixálás, permeabilizáció, blokkolás, valamint az elsődleges és szükség esetén másodlagos antitestek hozzáadása. A növényi sejtfa akadályozza az ellenanyag bejutását a sejtbe, ezért a sejtfalet enzimatikusan emésztjük a fixálást követően (Pasternak *et al.*, 2015). A fluoreszcensen jelölt növényi gyökér minták elemzése konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával

(CLSM) történt. A Debreceni Egyetem Zeiss LSM 880 mikroszkópjával készült felvételeket Dr. Ujlaky-Nagy László (DE, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet), míg a Nikon Ti-E mikroszkópjával készült felvételeket Dr. Garda Tamás (DE, TTK, BÖI, Növénytani Tanszék) készítette. A kísérleteket többszörös független ismétlésben végeztük el, minden genotípus és minden kezelés minimum 5 alkalommal ismétlésre került, kísérletenként 3-4 gyökérminta elemzésével. Minden alkalommal a mikroszkóp beállítások a kontroll (Col0, kezeletlen) mintához lettek módosítva, úgy, hogy a pixelintenzitások ne telítődjenek. A mikroszkópos képeket Fiji (Fiji is just ImageJ) szoftver (Schindelin *et al.*, 2012) segítségével elemeztük.

A franciaországi együttműködés keretein belül a foszforilált hiszton H3 szint kvantifikálására fejlesztettünk ki egy három makró programból álló félautomata 3D módszert Fiji szoftverben. Ez még pontosabb elemzést tesz lehetővé a mitózis alatti hiszton dinamika vizsgálatához, hiszen a konfokális mikroszkópozás során természetesen megjelenő Z-mélységbeli jelerősség csökkenést korrigálja, így a hiszton foszforiláció időbeli változásait megbízhatóbban követhetjük. A fluoreszcens jel intenzitását a pixelek integrált denzitásaként (IntDen) határoztuk meg, amely az egyes osztódó sejtekhez tartozó pH3S10 fluoreszcens jelintenzitás értékek összegét mutatja 3D-ben. Vizsgálatainkhoz felhasználtuk a vad-típusú növények mellett a PP2A *c3c4* dupla mutánst, valamint A „scaffolding” aleggység mutánsokat alkalmaztunk, nevezetesen a fenotipikus elváltozásokat alig mutató *pp2aa2 pp2aa3* (továbbiakban *a2a3*), illetve a mutáció által az erős morfológiai elváltozásokat mutató *pp2aa1 pp2aa3* dupla mutánsokat (továbbiakban *a1a3*) (Zhou *et al.*, 2004). Továbbá vizsgáltuk a TTP komplex szerepét a reverzibilis hiszton H3 foszforilációjában a *trm6 trm7 trm8* tripla mutánst (továbbiakban *trm678*) (Schaefer *et al.*, 2017)

alkalmazva. Annak tesztelésére, hogy a módszer képes-e pontosan mérni a hiszton foszforiláció mértékét különböző körülmények között, hesperadin kezelést alkalmaztunk, ami egy jól ismert Aurora kináz inhibitor (Hauf *et al.*, 2003). Az öt napos vad-típusú csíranövényeket A 1 μM hesperadinnal kezeltük 24 óráig. Whole-mount immunlokalizációs technikával a foszforilált hiszton H3 (pH3S10) mellett jelöltük a mikrotubulusokat, illetve DAPI-val a kromatint. Ezekben a mintákban egyszerre tudtuk jelölni a foszforilált hiszton és a mikrotubulusokat, mert a felhasznált antitestek különböző gazdaállatból származtak, így a mitózis fázisait még pontosabban elkülöníthettük a mikrotubulus organizáció segítségével. A Franciaországban végzett kutatómunka alkalmával a vizsgált minták felvételei Leica SP8 típusú konfokális mikroszkóppal készültek. A növény primer gyökeréről teljes 3D felvétel készült, a pH3S10 csatornán minden esetben ugyanazokat a beállításokat használtuk a felvételek készítése közben az összehasonlító elemzések céljából, ügyelve arra, hogy ne legyen telített pixel. Az összes összehasonlítandó genotípust vagy hesperadin kezelt növényeket ugyanabban a kísérletben jelöltük és egy időben készítettük a mikroszkópos felvételeket. Átlagosan 7-8 gyökeret elemeztünk genotípusonként vagy kezelésenként.

A Debrecenben végzett kísérletek statisztikai elemzését post-hoc: Holm-Sidak módszerrel és *t*-tesztekkel végeztük. Minden számszerűsített adatot a Systat Sigma Plot 10.0/12.0 [®] szoftver segítségével ábrázoltunk, az ábrák az átlag $\pm\text{SE}$ (standard hiba) értékeket mutatják. A Franciaországban végzett adatelemzéshez nem-paraméteres Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk. A grafikonok ábrázolása ggplot2 (Wickham, 2016) és Microsoft Excel segítségével történt, az ábrák szórása az átlag $\pm\text{CI95}$ (az átlag 95%-os konfidencia intervalluma) értékeket mutatják.

3. A kutatás legfontosabb eredményei és megbeszélésük

A PP2A mutánsok protein foszfatáz aktivitását vizsgálva a vad-típushoz viszonyítva érdekes eredményeket tapasztaltunk. A *c3c4* esetében a vártaknak megfelelően a C katalitikus alegység kiesése gátolta a foszfatáz aktivitásokat, azonban a *fass* mutáció ellenére a foszfatáz aktivitás (PP2A és PP1 is) ezekben a mutánsokban megemelkedett. Western blot kísérletek is alátámasztották a PP2A katalitikus alegység expressziójának a megemelkedését *fass* mutánsokban. A mitotikus aktivitásokat vizsgálva szignifikáns gátlást tapasztaltunk a *c3c4* és a *fass-5* esetében. Ezenkívül a mutáció által erőteljesebben befolyásolt *fass-5* növényekben korai mitotikus blokkok is megfigyelhetők. A kezeletlen genotípusok hiszton dinamikáját összehasonlítva a vad-típusú növények esetében az irodalomban leírt foszforilációs mintázatot tapasztaltuk, vagyis a legerősebb pH3S10 jelet a metafázisban mértük, majd a kromoszóma szegregáció után folyamatosan csökken a szintje. A PP2A mutánsokban különböző eltéréseket tapasztaltunk. A *c3c4* és a gyengébb fenotípusú *fass-15* mutánsok esetében a mintázat kisebb eltérést okozott: pH3S10 jel a profázisban magasabb szintről indul, illetve anafázisban is magasabb még a foszforiláció mértéke. Legérdekesebb elváltozást a *fass-5* KO mutáns esetében tapasztaltunk, ahol azt vártuk volna, hogy a protein foszfatáz mutációja erőteljes hiperfoszforilációt fog okozni, azonban meglepetésünkre a pH3S10 szintje nagyon alacsony az egész mitózis folyamata alatt.

A PP2A funkciójának mélyebb megértése érdekében MCY-LR kezelést is alkalmaztunk, mivel ez a cianotoxin specifikusan gátolja az összes PP2A és PP1 holoenzim komplexet (MacKintosh & Diplexcito, 2010), így lehetőség nyílt a különböző foszfatázok közötti esetleges funkcionális kompenzációk vizsgálatára is. Emellett alkalmat adott a toxin farmakológiai hatásainak feltérképezésére is *Arabidopsis thaliana*

modellnövényben. A PP2A mutánsok és gátlószerek kombinált alkalmazása pontosabb megközelítést kínál a protein foszfatáz aktivitás szabályozásának vizsgálatához, valamint annak a mitotikus folyamatokban és a hiszton H3 reverzibilis foszforilációjában betöltött szerepük tanulmányozásában.

A vad-típusú *A. thaliana* esetében a cianotoxin gátolta a PP2A aktivitását egész növényi mintában és főgyökerekben is, azonban a PP1 aktivitását nem befolyásolta a toxinkezelés, szemben a korábban vizsgált modellnövényekkel, ahol mindkét foszfatáz típust gátolta (Máthé *et al.*, 2013; Garda *et al.*, 2018). A gyökerek érzékenyebbek voltak a mikrocisztinre, hiszen a kisebb koncentrációjú toxinkezelés is már gátló hatást fejtett ki. Ez arra utal, hogy a MCY-LR kiváló eszköz a PP2A funkcióinak lúdfűben történő vizsgálatához. A PP2A mutáns növényeket vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a MCY-LR gátló hatást fejtett ki a PP2A aktivitásokra, erőteljesebb hatások érvényesültek a nagyobb koncentrációjú toxinkezelések következtében. A *fass-5* esetében azonban nemcsak a PP2A, hanem a PP1 aktivitása is csökkent. Ez a mutáns kifejezettebb fenotipikus elváltozásokat mutat, ami érzékenyebbé teszi különböző stresszfaktorokra szubcelluláris szinten, ahogyan Juhász és mtsai. (2023) is kimutatták (Juhász *et al.*, 2023). Ezért ez esetben arra következtethetünk, hogy a MCY-LR által okozott PP1 gátlás nem áll közvetlen kapcsolatban a FASS és C3/C4 kölcsönhatás megváltozásával.

A növényekben még kevésbé ismert a PP1 és PP2A szabályozó szerepe a mitózis időzítésében, ugyanakkor több növényfajnál megfigyelték, hogy a MCY-LR gátolta a PP1 és PP2A aktivitását, ami befolyásolta a metafázis-anafázis átmenetet és késleltette a mitózis előrehaladását (Máthé *et al.*, 2009, 2013; Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2016, 2018). Ezen kísérletek alapján *A. thaliana* esetében is azt vártuk, hogy a mikrocisztin kezelések súlyos károsodásokat okoznak

majd a mitotikus apparátusban, gátolva vagy akár teljesen blokkolva a folyamatot. Col0 esetében a mitotikus aktivitást is gátolta a cianotoxin a PP2A gátlásával párhuzamosan, azonban mitotikus blokkokat nem okozott. A 0,05 μM MCY-LR kezelés hatékonyabban gátolta a mitózist, mint a magasabb koncentráció, noha a PP2A aktivitásának gátlása erőteljesebb a nagyobb koncentrációjú toxinkezelés után. Ez azzal magyarázható, hogy 1 μM MCY-LR kezelés hatására megnövekedett a PP2A katalitikus alegység expressziója, ahogyan azt korábban rizs és uborka modellnövényekben is kimutatták, ami hozzájárulhat a mikrocisztinnel szembeni tolerancia kialakulásához (Ma *et al.*, 2023). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az alacsony koncentrációjú mikrocisztin-LR felboríthatja a foszfatáz aktivitás és expresszió közötti egyensúlyt, míg magasabb koncentrációnál a fennmaradó PP2A szintek részben ellensúlyozhatják a mitotikus aktivitásbeli gátlást.

A PP2A mutánsok mitotikus aktivitását eltérő módon befolyásolta a mikrocisztin. A *c3c4* és *fass-5* növények össz mitotikus aktivitását megemelte a 0,05 μM cianotoxin, azonban a *fass-5* esetében ez inkább a korai mitotikus fázisban jelentkező erőteljes blokkoknak köszönhető, amelyek megnövelték a számított mitotikus indexek arányát. A *fass-15* gyökerekben nem figyelhető meg mitotikus blokk, mint a fenotípusosan erősebben érintett *fass-5* esetében, és a 24 órás MCY-LR kezelés csupán kései mitotikus megállást okozott ebben a genotípusban. Ugyanakkor 48 órás toxinhatás után már a *fass-15*-ben is detektálható korai mitotikus blokk (Garda *et al.*, 2025). Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltevést miszerint a FASS szabályozó alegység hiánya nem csupán a PP2A aktivitását befolyásolja, hanem szélesebb körű szerepet is játszik különböző celluláris folyamatokban. Emellett a C3/C4 és FASS specifikus funkciókkal rendelkezhetnek a

mitotikus szabályozásban, amelyek eltérnek a PP2A holoenzim általános szerepeitől.

Míg a kutatócsoport a korábbi kísérletekben használt *Vicia faba* esetében hiszton H3 hiperfoszforilációt detektált mikrocisztin kezelés után (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018), addig *A. thaliana* Col0 modellnövényben csupán enyhe hatásokat figyeltünk meg. A *c3c4* és a *fass-15* mutáns növényekben enyhén emelkedett pH3S10 szintet detektáltunk a toxinkezeléseket követően, azonban kifejezettebb volt, mint Col0 esetében. Ez arra utalhat, hogy ezeknek a specifikus alegységeknek a hibás működése hatással van az egész PP2A holoenzim készlet működésére, mert a MCY-LR az összes lehetséges PP2A enzimkomplex kombinációt gátolja. A legérdekesebb hatást a *fass-5* KO mutáns esetében tapasztaltuk: a MCY-LR látszólag helyreállítja a foszforilációs mintázatot, vagyis a korai mitotikus fázisokban a pH3S10 szintje növekszik, legmagasabb érték a metafázisban detektálható, majd a testvérkromatidák szegregációjával defoszforilálódik a fehérje. Ezekből az eredményekből azt feltételezzük, hogy a PP2A csak indirekt módon szabályozza a hiszton H3 defoszforilációját. A *fass-5* mutánsokban magasabb a foszfatáz aktivitás, vagyis a fehérjék defoszforilációja erőteljesebb, így a foszforiláció-függő Aurora kináz aktivitását gátolhatja a megemelkedett szintű PP2A aktivitás (Eyers *et al.*, 2003), ami magyarázhatja az alacsony foszfo-hiszton szintet *fass-5* kontroll mutánsokban. Azonban mikrocisztin kezelés következtében a toxin gátolja azokat a protein foszfatázokat, amik defoszforilálják az Aurora kinázt, így a kináz visszanyeri aktivitását és be tudja tölteni a funkcióját és foszforilálja a hiszton H3-at a mitózis korai fázisaiban. Ezért a PP2A a hiszton H3 foszforilációját valószínűleg az Aurora kináz aktivitásának szabályozásán keresztül befolyásolja, nem pedig közvetlenül a hiszton szubsztrátokon.

Bár a hiszton H3 foszforilációs szintje részben függ a foszfatáz aktivitástól, az emelkedett pH3S10 szintek több *Arabidopsis thaliana* genotípusban nem jártak együtt mitotikus blokkokkal, függetlenül a MCY-LR kezelésektől. Ez arra utal, hogy lúdfüben a foszfatázok szerepe a mitózis és a hiszton foszforiláció szabályozásában összetettebb és eltérő a *Vicia*-hoz képest, ahol a cianotoxin gátolta mind a PP2A és PP1 aktivitását, amivel párhuzamosan megfigyelhető a kromatin hiperkondenzációja és a hiszton H3 hiperfoszforilációja, valamint a metafázis-anafázis átmenet késleltetése. Ezen kísérletek alapján a PP2A, a PP1, valamint ezek összetett kölcsönhatásai részt vesznek a hiszton H3 foszforilációs állapotának, illetve a mitózis kezdetének és befejezésének szabályozásában (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018). Azonban *Arabidopsis thaliana* esetében a foszfatáz-mitózis-hiszton foszforiláció kapcsolat összetettebbnek bizonyult: ha közvetlen összefüggés lenne, a csökkent PP2A aktivitás hiszton H3 hiperfoszforilációt és korai mitotikus blokkokat okozna, míg a megnövekedett aktivitás ennek ellentétes hatásait váltaná ki, azonban kísérleteink vegyes eredményeket mutattak. Ezenkívül lehetséges, hogy a FASS regulátor alegység kiesése hatással van az enzimkomplex sejten belüli elhelyezkedésére, így meglehet, hogy a PP2A nem a megfelelő helyen (ebben az esetben a kromoszómákon) lokalizálódik, így nem tudja elvégezni a hiszton defoszforilációját. A *fass* mutánsokban megemelkedett PP2A aktivitás arra utalhat, hogy más PP2A holoenzim komplexek kompenzálják a FASS B'' regulátor alegységet tartalmazó enzimkomplex funkcióját a túlélés érdekében és ezáltal befolyásolják a pH3S10 mértékét az Aurora kináz aktivitásán keresztül. Összességében a mitotikus szabályozás lúdfüben összetett és számos mechanizmus további vizsgálatot igényel.

A hiszton foszforilációs jelek elemzése 3D-ben növelheti a statisztikai erőt, és érzékenyebben képes kimutatni kisebb

különbségeket mutánsok és kezelések között. A versailles-i INRAE kutatóintézetben töltött tartózkodásom alatt, valamint hazatérésemet követően hozzájárultam egy fejlett, félautomata 3D képelemzési módszer kifejlesztéséhez, ami a Fiji szoftver beépített MorpholibJ (Legland *et al.*, 2016) és BoneJ2 (Domander *et al.*, 2021) bővítményeire épül, lehetővé téve a teljes pH3S10 fluoreszcens jelintenzitás meghatározását minden egyes sejtmagban, függetlenül az osztódás fázisától. A pH3S10 fluoreszcens jelek magas specificitást mutatnak alacsony háttérintenzitás mellett, így ezt kihasználva létrehoztunk egy olyan protokollt, ami automatikusan csoportosítja (szegmentálja) a pH3S10 pozitív sejteket (objektumok) és kvantifikálja ezek fluoreszcens jelintenzitását.

Az analízis folyamata három különböző makró működését veszi igénybe egymásra épülve: az első a jelerősség csökkenését korigálja a Z-mélységben, a második az egyes pH3S10 fluoreszcens jelek intenzitását méri le a korigált felvételeken, a harmadik pedig az osztódó sejtek különböző fázisban lévő állapotának a meghatározására szolgál. Az ImageJ makró programokat Dr. David Bouchez írta és fejlesztette az általam végzett mikroszkópos képanalízisek eredményei alapján. A projekt során a feladatom a nagyszámú mikroszkópos felvétel kvantitatív elemzése volt, amely során kapott adatok több körben hozzájárultak a program optimalizálásához.

A fluoreszcens jelintenzitás konfokális mikroszkópozás során a Z-mélység növekedésével (az egyre mélyebb optikai szeletek felvétele készítése során) természetéből adódóan csökken, ami elsősorban a gerjesztő és a kibocsájtott fény szórásának és abszorpciójának köszönhető, illetve fotokémiai fakulás következménye is lehet (Biot *et al.*, 2008; Ohser *et al.*, 2020). Ez a jelvesztés torzíthatja a pH3S10 értékeket, mivel a mélyebben elhelyezkedő sejtek gyengébb intenzitást mutathatnak pusztán pozíciójuk miatt. Az első makró program ezt a

jelerősség csökkenést korrigálja a Z-mélységben a metafázisos sejtek alapján. Lényegében automatikusan szegmentálja a metafázisban lévő sejteket (melyek intenzitás értéke elég homogénnek bizonyult a korrekció kiszámolásához), majd ezt követően egy regressziós korrekciós együtthatót számít, amihez a középső szeletet veszi referencia értéknek. A felső szeletek jeleit csökkenti, míg az alsó szeletek jeleit növeli, így kiegyenlítve a térbeli különbségeket. Ezáltal a mért pH3S10 különbségek kizárólag az időbeli változásokat, vagyis a mitózis előrehaladtával változó foszforilációs mértékeket mutatja. A korrekciós makró futtatása után kizártuk az alacsony R^2 értékű gyökereket a további elemzésekből. Bizonyos kezelések vagy genotípusok csökkenthetik a metafázisos sejtek számát, ezért ilyenkor a makró az összes pH3S10 jel alapján, szűrés nélkül számítja a korrekciót.

Kihívást jelentett még a foszfo-hiszton változatos mintázata a mitotikus fázistól függően. A második makró program a felhasználó által megadott beállításoknak megfelelően (szűrkeérték küszöb, objektumok minimális térfogata, dilatációs sugár, pixel méret, stb.) képes szegmentálni minden egyes sejtmagot és a korrigált képeken mérni a hozzájuk tartozó teljes fluoreszcens jelintenzitás mértékét 3D-ben. A lemért paraméterek (átlag, szórás, maximum, minimum, medián, integrált denzitás stb.) egy Excel táblázatban jelennek meg, az objektumok pozíciójára, méretére és alakjára vonatkozó számozással együtt. Később az adatelemzés ebben a táblázatban zajlik, ahol például manuálisan eltávolíthatjuk a hibásan szegmentált objektumokat.

A harmadik annotációs makró segítségével félautomata módon határozhatjuk meg az egyes mitotikus fázisokat a mikrotubulus organizáció, illetve a hiszton foszforilációs mintázat alapján. A program végighalad egyesével a szegmentált objektumokon és mi egy legördülő menüből választhatjuk ki a hozzá tartozó mitotikus fázist. A

phH3S10 pozitív sejtek alapján öt fázist különítettünk el: korai profázis, ahol a preprofázisos köteg (PPB) mellett a foszfo-hiszton jel a centromerekben detektálható, vagyis pöttyös eloszlást mutat; a kései profázisban még mindig pöttyös mintázatot látunk a phH3S10 csatornán, azonban a PPB már felbomlott, erőteljesebb mikrotubulus kötegeket láthatunk a sejtmag körül; a prometafázisban kondenzálódik a kromoszóma, a foszfo-hiszton jel tömörebb, illetve kezdetleges mitotikus orsót láthatunk; a metafázisban a kromoszóma erősen kondenzált és a középsíkban helyezkedik el, a bipoláris mitotikus orsó jól látható; anafázisban az orsók elkezdik szétválasztani a testvérkromatidákat, így a hiszton jel alapján két tömör fluoreszcens jel látható egymással párhuzamosan az orsó mikrotubulusai mellett. A telofázisban, mikor a fragmoplaszt kialakul már nem detektáltunk phH3S10 jelet, szintén nem volt detektálható foszfo-hiszton az interfázisos sejtekben, illetve a korai G2 fázisos sejtekben, ahol a PPB kialakulása már megkezdődött. A makró automatikusan frissíti a korábban elmentett Excel táblázatot ezekkel az annotációs információkkal, lehetővé téve az adatok pontos elemzését és a megfelelő grafikus megjelenítést.

A program tesztelésére különböző genotípusú *Arabidopsis thaliana* növényeket vizsgáltunk. A vad-típusú Col0 mellett először a mutáció által fenotipikusan alig érintett *a2a3*, illetve *trm678* mutáns növények phH3S10 szintjét elemeztük. A *trm678* mutáns nem rendelkezik PPB-vel (Schaefer *et al.*, 2017), így nem különböztettünk meg korai és kései profázist, csupán profázis kategóriát határoztunk meg az összehasonlító elemzésekben. Mindkét mutáns genotípus esetében csökkent phH3S10 szintet detektáltunk, azonban a legérdekesebb, hogy a metafázisos sejteken alapuló korrekciós módszer alkalmazása után a korábban nem észlelt statisztikai különbségek detektálhatóak az *a2a3* prometafázisos sejtejében. Ezenkívül

módszerünk jelentősen csökkentette a 95%-os konfidencia intervallumot (CI95), és képes korrigálni az objektumok egyenetlen elhelyezkedését is. Például a prometafázisos sejtek eloszlását megfigyelve azt tapasztaltuk, hogy Col0 esetében ezek inkább a gyökérfelvételek alsó felében jelennek meg, míg *a2a3* esetében inkább a felső szeletekben. Korrekció nélkül a természetes Z-mélységbeli jelerősség csökkenés így torzíthatja a mért intenzitás értékeket, azonban ez a térbeli heterogén eloszlásból eredő intenzitás különbségek kiegyenlítődnek a korrekciós módszer alkalmazása után. Ezért ez a módszer hatékony, hogy feltárja azokat a finom genetikai vagy kísérleti hatásokat, amelyeket a mélységből eredő jelvesztés elrejtene.

Továbbá elemeztünk mutáció által súlyosan károsodott növényeket, úgymint az *ala3* és *c3c4* mutánsokat, melyek szintén nem képeznek PPB-t. Ezek a mutánsok súlyos növekedési és gyökér morfológiai károsodásokat mutatnak, így az osztódó sejtek száma is drasztikusan lecsökkent (Zhou *et al.*, 2004; Spinner *et al.*, 2013). Ennél fogva ezekben a mintákban a metafázisos sejteken alapuló korrekciót nem tudtuk használni, így a regresszió kiszámításához az összes pH3S10 pozitív sejtet felhasználja a korrekciós makró program. A Col0 mintákkal végzett korrekciós összehasonlításában, ahol a korrekció elvégezhető csak a metafázisos sejtek vs. összes pH3S10 pozitív sejt alapján, azt láthatjuk, hogy nagyon hasonló értékeket mutattak. Ez arra utal, hogy habár az összes sejten végzett korrekció nem olyan pontos, egyes esetekben, ahol nincs lehetőség a metafázisos sejtek alapján elvégezni a korrekciót kiváló alternatíva lehet. A mutáns növények pH3S10 szintjét a Col0-hoz hasonlítva szintén csökkent intenzitás értékeket mértünk, ami a sejtosztódás szabályozásának zavarára utal.

Annak érdekében, hogy teszteljük a program hatékonyságát különböző körülmények között, a vad-típusú *Arabidopsis thaliana*

növényeket hesperadinnal kezeltük. Korábbi eredményeknek megfelelően (Kurihara *et al.*, 2006, 2008; Demidov *et al.*, 2009) az Aurora kináz gátló erős hatással volt a mitotikus aktivitásra és a hiszton H3 foszforilációra. Az 1 μ M hesperadin kezelés 75%-kal csökkentette a pH3S10 szintjét a kései profázistól anafázisig, miközben a korai profázisban nem figyelhető meg jelentős hatás, ami arra utal, hogy ebben a mitózis kezdetén más kinázok is szabályozhatják a hiszton H3 foszforilációját a szerin 10-es aminosav maradékon.

Az újonnan kidolgozott módszerünk a foszfo-hiszton szint pontos meghatározását teszi lehetővé és nagy pontossággal vizsgálhatjuk a pH3S10 jel dinamikáját a mitózis folyamata alatt növényekben. A mikrotubulusok és a foszforilált hiszton H3 elleni ellenanyagok együttes alkalmazásával az elemzésünkben egyértelműen elkülöníthető az összes mitotikus fázis, azonban szükség esetén a precizitás tovább növelhető további mitotikus markerek bevonásával.

Habár az új Fiji módszerrel a kísérletek egyszeri biológiai ismétlésben lettek elvégezve, hiszen legfőbb célunk a program tesztelése volt, ezekből az eredményeinkből szintén következtethetünk arra, hogy a PP2A csupán indirekt módon szabályozza a hiszton H3 defoszforilációját, mert a PP2A funkcióvesztéses mutánsaiban alacsonyabb pH3S10 szint detektálható. Ez tovább erősíti a korábban említett elméletet, miszerint a PP2A inkább az Aurora kináz aktivitásán keresztül szabályozza a reverzibilis hiszton H3 foszforilációt a szerin 10-es aminosav maradékon mitózis alatt *A. thaliana* gyökércsúcs merisztéma sejtekben. Módszerünk azonban, amely képes megbízhatóan kimutatni finom különbségeket genotípusok és kezelések között, ígéretes lehetőséget kínál a hiszton foszforilációs folyamatok feltérképezésére növényekben, különösen az *Arabidopsis thaliana* esetében elérhető számos genetikai erőforrás felhasználásával.

4. Összegzés és további kutatási irányok

Mit tudtunk meg a PP2A sejtciklusban betöltött szerepéről *Arabidopsis thaliana* modellben? Eredményeink azt sugallják, hogy az általunk vizsgált PP2A holoenzim komplex, mely a FASS és C3/C4 alegységeket tartalmazza, közvetlenül nem szabályozza a hiszton H3 foszforilációját a mitózis során; hatása inkább az Aurora kináz aktivitásának foszforilációs szabályozásán keresztül érvényesül. Ugyanakkor a PP2A működésének gátlása mitotikus blokkokat idézett elő a metafázis-anafázis átmenetnél, illetve a mitózisból való kilépésnél is okoznak enyhébb sejtciklus megállást. Ez összefügghet a PP2A aktivitásával, de nem áll kapcsolatban a hiszton H3 foszforilációjával. Ezek az eredmények hangsúlyozzák a PP2A szélesebb körű szerepét a mitotikus szabályozásban, amely nemcsak a mitózisba való belépést, hanem annak előrehaladását és a kilépést is érinti. Mindemellett ez a munka számos fontos kérdést vet fel a jövőbeli kutatások számára, mint például a FASS hiányában a foszfatáz aktivitás vártnál nagyobb növekedése ismeretlen molekuláris folyamatokra utal, ami további vizsgálatot igényel. Emellett szükséges olyan kulcsfontosságú szubsztrátok azonosítása, amelyek defoszforilációval szabályozzák a metafázis-anafázis átmenetet lúdfüben, mert a hiszton H3 foszforiláció valószínűleg nem vesz részt e kritikus ellenőrző pont szabályozásában. Bár a FASS kulcsszerepet játszik a sejtosztódás szabályozásában a kortikális mikrotubulusok szervezésén keresztül (Spinner *et al.*, 2013; Bouchez *et al.*, 2014; Schaefer *et al.*, 2017), további funkciói eddig ismeretlenek. A PP2A-FASS holoenzim komplex csak közvetetten befolyásolja a hiszton H3 Ser10 reverzibilis foszforilációját, ezért a jövőbeni kutatásoknak érdemes minden mitózis során aktív PP2A alegységet és sejtciklus specifikus transzkriptomikai adatot vizsgálniuk a közvetlenül ható protein foszfatáz azonosításához.

A TRM mutáns vizsgálatával kapott váratlan eredmények arra utalnak, hogy a TTP komplex aktivitása kapcsolatban állhat a kromoszóma kontrollal, azáltal, hogy a TTP komplex szabályozó szerepet játszhat a hiszton H3 reverzibilis foszforilációjában, azonban az összefüggés a kromoszóma kontroll és a mikrotubulus szabályozás között további tanulmányokat igényel. Ezenkívül fontos feltárni, hogy a TRM alegységen túl más TTP komplex komponensek, például a TON1, részt vesznek-e a hiszton H3 foszforiláció szabályozásában. A *ton1* mutánsok foszfo-hiszton vizsgálata az új félautomata ImageJ módszerrel, valamint a Debreceni Egyetemen folyó TTP komplex mutánsok foszfatáz aktivitás elemzése ígéretes kezdeti eredményeket hozott, amelyek hozzájárulhatnak a komplex teljes szerepének feltárásához.

5. Köszönetnyilvánítás és a kutatások támogatói

Köszönöm témavezetőmnek, **Prof. Dr. Máthé Csaba** egyetemi professzornak a folyamatos támogatást és szakmai útmutatást már az alapképzésem óta. Hálás vagyok **Dr. Garda Tamásnak** és **Dr. Freytag Csongornak** a kísérletek koordinálásáért, szakmai segítségükért és hasznos tanácsaikért.

Köszönöm **Dr. David Bouchez** és **Dr. Martine Pastuglia** (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, IJPB, Versailles, Franciaország) kutatóknak, hogy részt vehettem a SPACE csoport munkájában, különösen hálás vagyok Dr. Martine Pastuglia lelkiismeretes támogatásáért.

Köszönjük Prof. **Dr. Vasas Gábor** professzor úrnak és kutatócsoportjának a kísérletek során felhasznált toxint. Köszönöm **Dr. Ujlaky-Nagy László** (DE, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet)

munkáját a Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal készített képekért és **Dr. Garda Tamás**nak a Nikon-Ti-E konfokális mikroszkóppal végzett munkáját. Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Erdődi Ferenc**nek és **Dr. Kónya Zoltán**nak (DE, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet) a protein foszfatáz izotópos aktivitás mérésekben nyújtott segítségükért.

Továbbá köszönöm a **Növényteni Tanszék** jelenlegi és volt oktatóinak, dolgozóinak és szakdolgozóinak a hozzájárulását a kísérletek kivitelezéséhez, valamint köszönöm minden publikáció társszerzőjének a hozzájárulását a projektek sikeres megvalósításában.

Végül de nem utolsó sorban szeretném megköszönni **szüleimnek, családtagjaimnak, barátaimnak és szeretteimnek**, akik tanulmányaim alatt mindvégig támogattak, bíztattak, illetve mellettem álltak a nehezebb pillanatokban is.

Támogatók: NKFIH OTKA K 120638; DETKA; ÚNKP-20-2-1-DE-129; EMBO Scientific Exchange Grant SEG-9500; PO-Cyto & SPS ANR-20-CE13-0026-02 és ANR-17-EUR-0007



Nyilvántartási szám: DEENK/521/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kelemen Adrienn
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10082728

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

- Kelemen, A.**, Kónya, Z., Ujlaky-Nagy, L., Garda, T., Erdődi, F., Freytag, C., Juhász, G. P., Pasternak, T. P., Riba, M., Máthé, C.: Fass and C3/C4 contribute to the activities and levels of the protein phosphatase 2A catalytic subunit pool and regulate mitotic events in Arabidopsis.
Plant Physiol. Biochem. 227, 1-12, 2025. ISSN: 0981-9428.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.110187>
IF: 5.7 (2024)
- Kelemen, A.**, Uyttewaal, M., Máthé, C., Andrey, P., Bouchez, D., Pastuglia, M.: Semiautomatic quantification of 3D Histone H3 phosphorylationsignals during cell division in Arabidopsis root meristems.
New Phytol. 247 (6), 3010-3023, 2025. ISSN: 0028-646X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/nph.70365>
IF: 8.1 (2024)
- Kelemen, A.**, Garda, T., Kónya, Z., Erdődi, F., Ujlaky-Nagy, L., Juhász, G. P., Freytag, C., Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Treatments with diquat reveal the relationship between protein phosphatases (PP2A) and oxidative stress during mitosis in Arabidopsis thaliana Root meristems.
Plants-Basel. 13 (14), 1-16, 2024. ISSN: 2223-7747.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants13141896>
IF: 4.1





További közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (4)

- Garda, T., Juhász, G. P., **Kelemen, A.**, Mathur, J., Ujlaky-Nagy, L., Freytag, C., Mikóné Hamvas, M., Riba, M., Máthé, C.: Long-term treatments with microcystin-LR and diquat reveal their differences in the induction of oxidative stress responses and mitotic alterations in terms of stress recovery in Arabidopsis roots.
Environ. Pollut. 382, 1-10, 2025. ISSN: 0269-7491.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2025.126748>
IF: 7.3 (2024)
- Máthé, C., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Mikóné Hamvas, M., Garda, T.: "B" Regulatory Subunits of PP2A: Their Roles in Plant Development and Stress Reactions.
Int. J. Mol. Sci. 24 (6), 1-13, 2023. EISSN: 1422-0067.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24065147>
IF: 4.9
- Freytag, C., Garda, T., Kónya, Z., Mikóné Hamvas, M., Tóth-Várady, B., Juhász, G. P., Ujlaky-Nagy, L., **Kelemen, A.**, Vasas, G., Máthé, C.: B" and C subunits of PP2A regulate the levels of reactive oxygen species and superoxide dismutase activities in Arabidopsis.
Plant Physiol. Biochem. 195, 182-192, 2023. ISSN: 0981-9428.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.031>
IF: 6.1
- Freytag, C., Máthé, C., Rigó, G., Nodzyński, T., Kónya, Z., Erdódi, F., Cséplő, Á., Pózer, E., Szabados, L., **Kelemen, A.**, Vasas, G., Garda, T.: Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin affects root development by changing levels of PIN proteins and auxin response in Arabidopsis roots.
Chemosphere. 276, 1-10, 2021. ISSN: 0045-6535.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130183>
IF: 8.943

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (13)

- Máthé, C., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Mikóné Hamvas, M.: Hogyan befolyásolják az Arabidopsis PP2A protein foszfatáz C3-C4 és Foss alegységei a ROS szintet és az antioxidáns enzimaktivitásokat- rövid- és hosszú távon?
In: A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság XIII. Kongresszusa: Program és Összefoglalók.
Szerk.: Máthé Csaba, Poór Péter, Blázovics Anna, Debreceni Egyetem, Debrecen, 27, 2025.
ISBN: 9789634907367





9. Máthé, C., Garda, T., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Mikóné Hamvas, M.: A protein foszfatázok szerepe a növényi sejt szubcelluláris dinamikájában.
In: 24. Kolozsvári Biológus Napok : Kivonatfüzet, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, 41-41, 2024.
10. Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., Garda, T., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Pózer, E., Riba, M.: Amikor a sejtbiológia és a környezeti toxikológia találkozik: a mikrocisztrin-LR, egy cianobakteriális toxin hatásai modell- és vízínövényekben.
In: 23. Kolozsvári Biológus Napok : Kivonatfüzet = Zilele Biologice din Cluj, ed. 23-a : Volum de abstracte = 23rd Biology Days : Abstracts. Eds.: Fenesi Annamária, Pap Péter László, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Magyar Biológiai és Ökológiai Intézet (MBÖI), Apáthy István Egyesület, Kolozsvár, 45, BÖSZ (KMDSZ BiológiaÖkológia Szakosztály) Kolozsvári Akadémiai Bizottság (KAB) 2023.
11. **Kelemen, A.**, Bouchez, D., Pastuglia, M., Garda, T., Freytag, C., Máthé, C.: A reverzibilis hiszton foszforiláció vizsgálata 3D fluoreszcens szignál analízis segítségével az osztódó Arabidopsis thaliana gyökércsúcs sejtjeiben.
In: 23. Kolozsvári Biológus Napok : Kivonatfüzet = Zilele Biologice din Cluj, ed. 23-a : Volum de abstracte = 23rd Biology Days : Abstracts. Eds.: Fenesi Annamária, Pap Péter László, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Magyar Biológiai és Ökológiai Intézet (MBÖI), Apáthy István Egyesület, Kolozsvár, 33, BÖSZ (KMDSZ BiológiaÖkológia Szakosztály) Kolozsvári Akadémiai Bizottság (KAB) 2023.
12. **Kelemen, A.**, Garda, T., Freytag, C., Máthé, C.: A reverzibilis hiszton H3 foszforiláció szerepe a sejtosztódás szabályozásában Arabidopsis thaliana gyökércsúcs merisztéma sejtokban.
In: XXVI. Tavasz Szél Konferencia 2023 - Absztrakt kötet. Szerk.: Hajdú Péter, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 103, 2023. ISBN: 9786156457233
13. Máthé, C., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Mikóné Hamvas, M.: PP2A protein foszfatáz speciális alegységeinek szerepe az oxidatív stresszválaszok szabályozásában Arabidopsis csiranövényekben.
In: A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság XII. Kongresszusa (12th Congress of the Hungarian Free Radical Society): Program és Összefoglalók, Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár, 45, 2023. ISBN: 9786156203021
14. Freytag, C., Juhász, G. P., Máthé, C., **Kelemen, A.**, Mikóné Hamvas, M.: SOD izomorfák aktivitása Arabidopsis thaliana protein foszfatáz 2A, C és B" alegység mutánsok gyökereiben.
In: A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság XII. Kongresszusa (12th Congress of the Hungarian Free Radical Society): Program és Összefoglalók, Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár, 27, 2023. ISBN: 9786156203021





15. Garda, T., Máthé, C., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Erdődi, F., Kónya, Z.: A foszforilált hiszton H3 és H2Ax vizsgálata PP2A mutáns Arabidopsis thaliana növényekben.
In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 23, 2021.
ISBN: 9786150123509
16. Freytag, C., Máthé, C., Rigó, G., Nodzyrski, T., Kónya, Z., Erdődi, F., Cséplő, Á., Pózer, E., Szabados, L., **Kelemen, A.**, Vasas, G., Garda, T.: A Microcystin-LR cianobakteriális toxin képes megváltoztatni a gyökér fejlődését a PIN fehérjék és az auxin szint megváltoztatásával Arabidopsis gyökérben.
In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 26, 2021.
ISBN: 9786150123509
17. **Kelemen, A.**, Garda, T., Ujlaky-Nagy, L., Máthé, C., Freytag, C.: A protein foszfatáz gátlás rövid- illetve hosszútávú hatásai az Arabidopsis gyökércsúcsok mitotikus aktivitására.
In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 72, 2021.
ISBN: 9786150123509
18. Tóth-Várady, B., Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., Garda, T., Erdődi, F., Kónya, Z., Juhász, G. P., **Kelemen, A.**, Pózer, E.: Az oxidatív stressz eliminálását elősegítő enzimek vizsgálata Arabidopsis thaliana vad típusban és protein foszfatáz mutánsokban.
In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 93, 2021.
ISBN: 9786150123509
19. Máthé, C., Garda, T., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Beyer, D., Kónya, Z., Erdődi, F., Mikóné Hamvas, M., Dobránszki, J., Pastuglia, M.: Hogyan befolyásolják a protein foszfatázok a növényi sejt szerveződését, epigenetikai változásait? Alaputatás és biotechnológiai alkalmazások.
In: Biotechnológia a Debreceni Egyetemen. Fókuszban az agrár- és élelmiszerbiotechnológia : Tudományos Szimpózium előadás összefoglalók, Debreceni Egyetem MÉK Agrár Genomikai és Biotechnológiai Központ, Debrecen, 25-27, 2021. ISBN: 9789634903512
20. **Kelemen, A.**: A protein foszfatáz gátlás és az oxidatív stressz citológiai hatásai Arabidopsis thaliana gyökércsúcs merisztéma sejtekben.
In: XXXIV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Biológia Szekció, Program és Összefoglalók, Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Kar, Budapest, 114, 2019.





Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (7)

21. Máthé, C., Kónya, Z., Erdődi, F., **Kelemen, A.**, Garda, T., Mikóné Hamvas, M., Juhász, G. P., Freytag, C.: The roles of PP2A subunits Foss and C3/C4 in the regulation of mitosis and oxidative stress responses in Arabidopsis- studies with phosphatase mutants and inhibitors. In: Plant Biology Europe 2025: Programme and Book of Abstracts, [s.n.], Budapest, 87, O-57, 2025. ISBN: 9786156833020
22. Máthé, C., Garda, T., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Freytag, C., Mikóné Hamvas, M.: Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin is inducing biotic stress and serves as a tool in plant cell biology research. In: Plant Biotic Stresses and Resistance Mechanisms V. : VISCEA International conference : Programme and abstracts, [s.n.], Vienna, 14-14, 2024.
23. **Kelemen, A.**, Bouchez, D., Pastuglia, M., Máthé, C.: 3D analysis of the histone H3 fluorescent signals: Application to the study of histone reversible phosphorylation during cell division in Arabidopsis root meristems. In: Botanical Microscopy Meeting 2023. Ed.: Kim Findlay, Christine Faulkner, Patrick Hussey, Ulla Neumann, Richard Smith, Imogen Sparkes, RMS, Norwich, 61, 2023.
24. **Kelemen, A.**, Bouchez, D., Pastuglia, M., Máthé, C., Garda, T., Freytag, C.: Application of 3D fluorescent histone signal analysis to investigate the role of its reversible phosphorylation during mitosis in Arabidopsis root meristems. In: 13th EMBO Young Scientists' Forum: Book of Abstracts, [s.n.], Lisbon, 79-80, 2023.
25. Máthé, C., Kónya, Z., **Kelemen, A.**, Garda, T., Mikóné Hamvas, M., Juhász, G. P., Freytag, C.: New insights into the roles of PP2A subunits FASS and C3/C4 in the regulation of mitosis and oxidative stress responses in Arabidopsis. In: Botanical Microscopy Meeting 2023 / Kim Findlay, Christine Faulkner; Patrick Hussey; Ulla Neumann; Richard Smith; Imogen Sparkes, RMS, Norwich, 77-78, 2023.
26. Máthé, C., Garda, T., **Kelemen, A.**, Ujlaky-Nagy, L.: Mitotic responses of Arabidopsis PP2A mutants reveal the roles of both regulatory and catalytic subunits in the regulation of cell division. In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 24, 2021. ISBN: 9786150123509





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikacio@lib.unideb.hu

27. Máthé, C., Garda, T., Freytag, C., Mikóné Hamvas, M., **Kelemen, A.**, Kónya, Z., Erdődi, F.:
Effects of serine-threonine protein phosphatase inhibition and ROS induction on mitotic activity, cytoskeletal and chromatin organization in model higher plants.
In: 11th International Botanical Microscopy Meeting : Presentation abstract, Royal Microscopical Society, Oxford, 1, 2019.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 45,143

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
17,9**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.09.11.



Short thesis for the degree of doctor of philosophy (PhD)

**The role of PP2A protein phosphatases in the
regulation of cell division in *Arabidopsis thaliana*
root tip meristems**

by Adrienn Kelemen

Supervisor: Prof. Dr. Csaba Máthé

Consultant: Dr. Martine Pastuglia



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Doctoral School of Juhász-Nagy Pál

Debrecen, 2025

1. Research background and objectives

Protein phosphorylation and dephosphorylation represents one of the main forms of reversible posttranslational modification, which often serves as “on-and-off switches” that regulate numerous cellular processes in eukaryotes by modulating the conformation, activity, localization, and stability of substrate proteins, thereby influencing metabolism, signalling pathways and the cell cycle. The serine/threonine specific phosphoprotein phosphatases are ubiquitous enzymes in all eukaryotes (Smith & Walker, 1996). During the cell cycle PP2A dephosphorylates over 300 substrates, thereby affecting almost every phase of cell division and ensuring proper progression of mitosis (Wlodarchak & Xing, 2016). PP2A is a multifunctional holoenzyme complex composed of three subunits: the A “scaffolding” subunit, the C catalytic subunit and the variable B regulatory subunit, which determines the substrate specificity and localization. Each subunit exists in multiple isoforms, contributing to the functional diversity of PP2A (Luan, 2003).

Histone proteins are the main components of chromatin and are regulated by numerous posttranslational modifications. Reversible phosphorylation of histone H3 plays a key role in chromosome condensation and cohesion during mitosis. In plants, reversible phosphorylation at serine 10 and 28 residues are required for regulating chromosome cohesion and for ensuring proper sister chromatid segregation. The phosphorylation pattern of histone H3 is dynamic during mitosis: the first phospho-histone signal appears in prophase and increases during the early mitotic phases, with a peak in metaphase. After chromosome segregation the phospho-histone level decreases and disappears by telophase. Aurora kinases are well-known regulators of this process (Houben *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014); however, the protein phosphatase responsible for H3 dephosphorylation remains

unknown in plants. Experiments with various model plants, such as *Vicia faba* (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018) or *Ceratophyllum submersum* (Ujvárosi *et al.*, 2019), as well as studies with animal (Nowak *et al.*, 2003) and human cells (Huang *et al.*, 2005) suggest that PP2A plays a key role in this process, as its inhibition or mutation leads to histone H3 hyperphosphorylation and mitotic defects. Nevertheless, it remains unclear whether PP2A is directly responsible for histone H3 dephosphorylation at serine 10, and which subunits of the holoenzyme are critical for this function.

Our main aim during the project was to shed light on the role of PP2A during cell division in *Arabidopsis thaliana* root meristems. We specifically examined its regulatory role in the precise timing of chromosome segregation during mitosis and its involvement in proper mitotic progression. The primary focus of my PhD research was to investigate the regulation of reversible histone H3 phosphorylation during mitosis.

Our objectives were to explore:

- (i) how the loss of FASS and C3/C4 subunits influences the total phosphatase activity.
- (ii) whether the changes in protein phosphatase activity are associated with the mitotic regulation.
- (iii) how these subunits influence the mitotic activity of *Arabidopsis thaliana* root meristems and ensure proper mitotic progression.
- (iv) what are their roles in regulating reversible histone H3 phosphorylation during mitosis, particularly whether these PP2A complex subunits are directly involved in histone H3 dephosphorylation following chromosome segregation.

During the course of my PhD, I established a collaboration with David Bouchez's SPACE (Spatial Control of Cell Division) research group at the INRAE Research Centre in Versailles (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin for Plant Science (IJPB), Versailles, France), where I spent three months on-site conducting experiments under the supervision of Dr. Martine Pastuglia.

The collaboration had two main objectives:

- (i) From a scientific perspective, it aimed to investigate the role of the TTP phosphatase complex during mitosis. The TTP complex is known to regulate cortical microtubule arrays and spatially control of cell division. This multiprotein complex comprising PP2A holoenzyme with FASS as the regulatory subunit for its phosphatase activity, an assembly subunit named TON1, and TRM proteins that contribute to complex localization (Schaefer *et al.*, 2017). We aimed to explore whether other subunits than FASS influence reversible histone H3 phosphorylation.
- (ii) From a technical perspective, I spent three months at the institute performing immunolocalization experiments, mastering advanced confocal microscopy imaging and after coming home subsequently contributing to the development of a semi-automatic 3D image analysis pipeline for phospho-histone H3 signal quantification.

2. Applied research materials and methods

For our research, we used the *Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype, a model plant widely used in plant biology studies. We first employed a genetic approach, examining both wild-type plants (Col0) and PP2A protein phosphatase mutant plants in the Columbia background. In the *pp2ac3 pp2ac4* double mutant (hereafter referred to

as *c3c4*), the functions of the C3 and C4 catalytic subunits are lost (Alonso *et al.*, 2003; Ballesteros *et al.*, 2013; Spinner *et al.*, 2013), while in the *fass-5* and *fass-15* mutants, the function of the B' regulatory subunit – FASS isoform – is impaired (Camilleri *et al.*, 2002; Kirik *et al.*, 2012). The mutations caused varying degrees of morphological alterations, with the most severe phenotype observed in the KO *fass-5* allele, where the tissues from the shoot and root barely were distinguishable to the naked eye.

Next, we applied a pharmacological approach. Five-day-old seedlings were treated with microcystin for 24 hours. Microcystin-LR (MCY-LR) is a cyanobacterial toxin that can accumulate during toxic cyanobacterial blooms in eutrophic waters, which can persist in water bodies for several months due to its high stability. Furthermore, with irrigation water, it can bioaccumulate in the food chain and poses both ecological and human health risks (Campos & Vasconcelos, 2010). MCY-LR is a cyclic heptapeptide which specifically inhibits PP1 and PP2A activity. On the other hand it can increase the intracellular reactive oxygen species (ROS) production leading to oxidative damage at cellular level (MacKintosh & Diplexcito, 2010). Protein phosphatase inhibition and oxidative stress induction by MCY-LR trigger cascades of molecular events and signalling pathways that can result in membrane damage (lipid peroxidation), protein denaturation, enzyme inactivation, cytoskeletal disorganization and damage, changes in mitochondrial permeability and damage, DNA damage, and even cell death (apoptosis) (Valério *et al.*, 2016; Máthé *et al.*, 2019). During our experiments we aimed at choosing those toxin concentrations which do not cause cell death during the exposure time but can trigger cellular alterations. For this reason, we used environmentally relevant concentrations of 0.05 μM (Ujvárosi *et al.*, 2019), as well as 1 μM , which did not cause cell death but did induce cellular changes. The

MCY-LR used in this study was purified by Prof. Dr. Gábor Vasas and his research group (Department of Botany, Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science and Technology, University of Debrecen) from the *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 cell cultures following a modified method of Kós et al. (1995). Cells were collected by centrifugation and extracted, after which the cyanotoxin was purified using a DEAE Cellulose-52 (Whatman DE 52) column, followed by further purification from contaminants by Toyopearl size-exclusion chromatography. The concentration and purity of the extracted MCY-LR were determined using HPLC and capillary electrophoresis methods (Kos et al., 1995; Vasas et al., 2004). The purity of the MCY-LR used in this study is $\geq 95\%$.

The *in vivo* isotopic protein phosphatase activity assays – including both the combined and the separately determined activities of PP1 and PP2A – were performed by Dr. Zoltán Kónya (Department of Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen) according to the method of Erdődi et al. (1995). The substrate for the radioisotopic biochemical assay was [³²P]-MLC20 (³²P-labeled 20 kDa turkey myosin light chain), which is known to be primary dephosphorylated by PP2A and PP1 in cell cultures (Erdodi et al., 1995). To assay PP1 and PP2A activities separately, Inhibitor-2 (I-2) protein was added, which is known as a natural inhibitor of PP1 in all eukaryotes, including plants. PP2A activity was measured from the extracts after the addition of I-2, while PP1 activity was determined by subtracting PP2A activity from the total protein phosphatase activity (Dedinszki et al., 2015). The activity measured without inhibitors was considered 100%, and treated samples were compared to the control values.

The use of a specific phospho-histone H3 (Ser10) antibody (Hendzel et al., 1997) allowed us to characterize histone H3 dynamics

during mitosis using indirect immunolocalization, confocal microscopy, and quantitative image analysis. The phospho-histone fluorescent signals (phH3S10) specifically detected in the dividing cells in a black background. phH3S10 fluorescent signal intensity was measured in 2D and expressed as the average integrated optical density (AIOD) of pixel areas. Using a fluorescent dye (DAPI) for chromosome visualization and an anti-tubulin antibody allowed us to quantify the mitotic activity by calculating the mitotic index for all mitotic cells (percentage of total dividing cells in relation to the total number of cells), as well as separately for early (prophase + prometaphase + metaphase) and late (anaphase + telophase) stages. Since the antibodies used for phospho-histone H3 and microtubule detection originated from the same host species, the labelling procedures were carried out separately in each case, with DAPI always used to stain chromatin. The whole-mount method allowed us to examine the target proteins and cellular components in whole seedlings without tissue sectioning. The main steps of the procedure were as follows: fixation, permeabilization, blocking and addition of primary, and if necessary secondary antibodies. Because the plant cell wall hinders antibody penetration in deeper tissues, cell walls were enzymatically digested after fixation (Pasternak *et al.*, 2015). Fluorescently labelled root samples were analysed using confocal laser scanning microscopy (CLSM). Images were acquired with a Zeiss LSM 880 microscope at the University of Debrecen by Dr. László Ujlaky-Nagy (Department of Biophysics and Cell Biology, Faculty of Medicine, UD) and with a Nikon Ti-E microscope by Dr. Tamás Garda (Department of Botany, Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science and Technology, UD). Experiments were repeated multiple times independently, with each genotype and treatment tested at least five times, analysing 3-4 root samples per experiment. Microscope settings were always adjusted to

the control (Col0, untreated) sample to avoid pixel saturation. Images were analysed using the Fiji (Fiji Is Just ImageJ) software (Schindelin *et al.*, 2012).

During my collaboration at INRAE Research Centre in Versailles, France, we developed a semi-automatic image analysis pipeline in 3D for phospho-histone H3 signal quantification in Fiji software, which comprises three ImageJ macro programmes. This approach enables more precise analysis of histone dynamics during mitosis by correcting the natural signal attenuation along the Z-axis that occurs during confocal scanning, thereby allowing more reliable monitoring of temporal changes in histone phosphorylation. Fluorescent signal intensity was determined as the integrated density (IntDen) of pixels, representing the sum of pH3S10 fluorescent signal intensity values for each dividing cell in 3D. In addition to wild-type plants, for our research we used the PP2A *c3c4* double mutant, as well as A “scaffolding” subunit mutants, where the *pp2aa2 pp2aa3* double mutant (hereafter referred to as *a2a3*) shows minimal phenotypic alterations, and the *pp2aa1 pp2aa3* double mutant (hereafter referred to as *a1a3*) displays severe morphological changes caused by the mutation (Zhou *et al.*, 2004). We also investigated the role of the TTP complex in reversible histone H3 phosphorylation using the *trm6 trm7 trm8* triple mutant (hereafter referred to as *trm678*) (Schaefer *et al.*, 2017). To test whether the pipeline could accurately quantify histone phosphorylation under different conditions, we applied hesperadin treatments, a known Aurora kinase inhibitor (Hauf *et al.*, 2003). Five-days-old wild-type seedlings were treated with 1 μ M hesperadin for 24 hours. Using whole-mount immunolocalization, we labelled phosphorylated histone H3, microtubules, and chromatin (with DAPI). In these samples, pH3S10 and microtubules could be labelled simultaneously because the antibodies were raised in different host

species, enabling even more precise identification of mitotic stages through microtubule organization. Images of the examined samples were acquired using a Leica SP8 confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Complete 3D stacks of the primary root were scanned, using identical acquisition settings for the pH3S10 channel in all cases to ensure comparability and avoiding pixel saturation. All genotypes and hesperadin treated plants to be compared were labelled in the same experiment, and imaging was performed simultaneously. On average, 7-8 roots were analysed per genotype or treatment.

The statistical analysis of the experiments conducted in Debrecen was performed using post-hoc Holm-Sidak tests and *t*-tests. All quantitative data were plotted with Systat Sigma Plot 10.0/12.0 ® software, and the figures display mean \pm SE (standard error) values. For the experiments conducted in France, non-parametric Mann-Whitney tests were applied for data analysis. The graphs were generated using ggplot2 (Wickham, 2016) and Microsoft Excel, with data presented as mean \pm CI95 (95% confidence interval of the mean) values.

3. Key research findings and discussion

When examining the protein phosphatase activity of PP2A mutants compared to the wild-type plants, we observed some intriguing results. In case of *c3c4* mutants, as expected, the loss of C catalytic subunit inhibited the phosphatase activity. However, in *fass* mutants, despite the mutation in the PP2A-FASS regulatory subunit, the phosphatase activity (both PP2A and PP1) was increased in these mutants. Western blot experiments also supported the finding of increased expression of the PP2A catalytic subunit in *fass* mutants. When assessing mitotic activities, we observed significant inhibition in

both *c3c4* and *fass-5* mutants. Moreover, in *fass-5* KO plants, early mitotic blocks were also detected. Comparing the histone dynamics of untreated genotypes, wild-type plants displayed the phosphorylation pattern described in the literature: the strongest pH3S10 signal was detected in metaphase, followed by a continuous decrease in its level after chromosome segregation. In PP2A mutants, we observed various deviations from this pattern. In *c3c4* and the milder-phenotype *fass-15* mutants, the pattern showed only minor differences: the pH3S10 signal started from a higher level in prophase, and phosphorylation remained higher in anaphase. The most striking alteration was found in the *fass-5* knock-out mutant. To our surprise, pH3S10 levels were very low throughout the entire process of mitosis.

To gain deeper understanding of PP2A function, we also applied MCY-LR treatments, as this cyanotoxin specifically inhibits all PP2A and PP1 holoenzyme complexes (MacKintosh & Diplexcito, 2010), thereby allowing us to investigate potential interactions and compensations between different protein phosphatases. In addition, it provided an opportunity to map the pharmacological effects of the toxin in the *Arabidopsis thaliana* model plant. Combining PP2A mutants with pharmacological inhibitors provides a more precise approach to dissect the regulation of protein phosphatase activity and to explore its role in mitotic processes as well as in the reversible phosphorylation of histone H3.

In *A. thaliana* wild-type the cyanotoxin inhibited the PP2A activity in whole seedlings and in primary roots, however PP1 activity was not affected as compared to different model plants (Máthé *et al.*, 2013; Garda *et al.*, 2018). The roots proved to be more sensitive to microcystin, as even a lower toxin concentration caused an inhibitory effect. This suggests that MCY-LR is an excellent tool for investigating PP2A functions in *A. thaliana* model plant. When examining PP2A

mutant plants, we found that MCY-LR inhibited PP2A activities, with stronger effects observed under higher toxin concentration treatments. In case of the *fass-5* mutant, however, not only PP2A but also PP1 activity were inhibited significantly. These mutants exhibit more pronounced phenotypic alterations, which make it more sensitive to various stress factors at the subcellular level, as also demonstrated by Juhász *et al.* (2023). Therefore, in this case, we conclude that the MCY-LR induced PP1 inhibition is not directly related to alterations in the FASS and C3/C4 interaction, rather the cause of the strong phenotypic alteration.

In plants, the regulatory role of PP1 and PP2A in mitotic timing is still poorly understood. However, in several plant species, MCY-LR has been observed to inhibit PP1 and PP2A activity, affecting the metaphase-anaphase transition and delaying mitotic progression (Máthé *et al.*, 2009, 2013; Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2016, 2018). Based on these findings, we also expected that microcystin treatment in *Arabidopsis thaliana* would cause severe damage to the mitotic apparatus, inhibiting or even completely blocking the process. In Col0, mitotic activity was also inhibited in parallel to PP2A activity inhibition; however, it did not cause mitotic blocks. Interestingly, 0.05 μ M MCY-LR treatment inhibited mitosis more effectively than the higher concentration, even though inhibition of PP2A activity was stronger following toxin treatment with the higher concentration. This can be explained by the fact that treatment with 1 μ M MCY-LR increased the expression of the PP2A catalytic subunit as proved by our Western blot experiments – an effect previously demonstrated also in rice and cucumber model plants – which may contribute to the development of microcystin tolerance (Ma *et al.*, 2023). These results suggest that MCY-LR at lower concentration may disrupt the balance between phosphatase activity and expression, while at higher

concentrations, maintained PP2A levels may partially offset the inhibition.

MCY-LR had interesting effects on mitotic activity in PP2A mutant plants. Following 0.05 μ M MCY-LR treatment, both *fass-5* and *c3c4* showed an increased level in mitotic activity. However, in case of *fass-5*, this increase was primarily due to a mitotic block occurring in the early mitotic phases, which led to an elevated calculated mitotic index. In *fass-15* roots, no mitotic block was observed – as opposed to the more severely affected *fass-5* – and 24 hours of MCY-LR treatment caused only slight late mitotic arrest in this genotype. However, after 48 hours of toxin exposure, early mitotic arrest was also detectable in *fass-15* (Garda *et al.*, 2025). These findings support the idea that the absence of the FASS regulatory subunit affects more than just PP2A activity, suggesting broader roles. Additionally, C3/C4 and FASS may have specific functions in mitotic regulation distinct from the general role of the PP2A holoenzyme.

While in previous experiments with *Vicia faba* my research group detected histone H3 hyperphosphorylation after microcystin treatment (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018), in *Arabidopsis thaliana* wild-type plants we observed only mild effects. In the *c3c4* and *fass-15* mutant plants, we detected a slightly elevated level of pH3S10 following toxin treatments, which was more pronounced than in Col0. This may suggest that the malfunction of these specific subunits affects the activity of the entire PP2A holoenzyme pool, since MCY-LR inhibits all possible PP2A holoenzyme combinations (MacKintosh & Diplexito, 2010). The most striking effect was observed in the *fass-5* KO mutant: MCY-LR appeared to restore the phosphorylation pattern: pH3S10 levels increased during early mitotic phases, peaks in metaphase, and upon sister chromatid segregation the protein was dephosphorylated. From these results, we hypothesize that PP2A

regulates histone H3 dephosphorylation only indirectly. In *fass-5* mutants the phosphatase activity was elevated, leading to stronger dephosphorylation. Thus, the phosphorylation-dependent Aurora kinase activity may be suppressed by the increased PP2A activity (Eyers *et al.*, 2003), which would explain the low phospho-histone H3 level in *fass-5* control mutants. Upon microcystin treatment, the toxin inhibits the protein phosphatases that dephosphorylated the Aurora kinase, thereby restoring its activity. As a result, the kinase can fulfil its role and phosphorylate histone H3 in the early phases of mitosis, hence increased pH3S10 level was observed in *fass-5* after MCY-LR treatment. Therefore, PP2A likely influences histone H3 phosphorylation through the regulation of Aurora kinase activity rather than by directly acting on histone substrates.

Although histone H3 phosphorylation levels partly depend on phosphatase activity, elevated pH3S10 levels in several *Arabidopsis thaliana* genotypes were not associated with mitotic arrest, regardless of MCY-LR treatments. This suggests that, in *A. thaliana*, the role of phosphatases in regulating mitosis and histone phosphorylation is more complex and differs from that in *Vicia*, where the cyanotoxin inhibited both PP2A and PP1 activity, which was accompanied by chromatin hypercondensation, histone H3 hyperphosphorylation, and a delay in the metaphase-anaphase transition. Based on these experiments, PP2A and PP1, as well as their complex interactions are involved in regulating the phosphorylation state of histone H3 and also the initiation and completion of mitosis (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018). However, in *A. thaliana*, the phosphatase-mitosis-histone phosphorylation relationship proved to be more complex: if there were a direct link, reduced PP2A activity would result in histone H3 hyperphosphorylation and early mitotic blocks, while an increased activity would have the opposite effects. However, our experimental

results showed variable outcomes. In addition, it is possible that the loss of the FASS regulatory subunit affects the intracellular localization of the enzyme complex, like PP2A may not be localized properly (in this case, on the chromosomes) to perform histone dephosphorylation. The elevated PP2A activity observed in *fass* mutants may indicate that other PP2A holoenzyme complexes compensate for the function of the loss of FASS complex to ensure survival, thereby influencing pH3S10 levels through Aurora kinase activity. Overall, mitotic regulation in *Arabidopsis thaliana* is complex, and many of its mechanisms require further investigation.

Analysing histone phosphorylation signals in 3D can increase statistical power and detect subtle differences between mutants and treatments more sensitively. During my stay at the INRAE research Centre in Versailles, and after returning to Hungary, I contributed to the development of an advanced semi-automatic 3D image analysis pipeline. This approach is based on the built-in MorpholibJ (Legland *et al.*, 2016) and BoneJ2 (Domander *et al.*, 2021) plugins in Fiji software (Schindelin *et al.*, 2012), enabling the quantification of total fluorescent pH3S10 signal intensity in each nucleus, regardless of the mitotic phase. The pH3S10 fluorescent signals exhibit high specificity with low background intensity, enabling us to develop a workflow, which automatically segments pH3S10 positive cells (objects) and quantifies their fluorescent signal intensity.

The analysis workflow uses three different macros continuously: the first corrects the signal attenuation in Z-stack, the second measures the total pH3S10 fluorescent signal intensities for each nucleus in the corrected images and the third help us determine and annotate the mitotic phase for each object. The ImageJ macro programs were written and developed by Dr. David Bouchez based on the results of the microscopic image analyses I performed. My task during the project

was the quantitative analysis of a large number of microscopic images, and the resulting data contributed in several rounds to the optimization of the program.

During confocal microscopy, fluorescent signal intensity naturally decreases with increasing Z-depth (when capturing deeper optical slices). This decrease is primarily due to the scattering and absorption of both excitation and emitted light or photobleaching (Biot *et al.*, 2008; Ohser *et al.*, 2020). Such signal loss can disturb pH3S10 measurements, as cells located deeper in the sample may display weaker intensities solely due to their position. The first macro program corrects this Z-depth signal attenuation based on metaphase cells. Specifically, it automatically identifies metaphase cells (whose intensity values proved sufficiently homogeneous for calculating the correction) by segmentation according to user-defined settings, then calculates a regression-based correction coefficient using the middle slice as the reference value. Signals from upper slices are reduced, while signals from lower slices are increased, thus compensating for spatial differences. As a result, the measured pH3S10 differences reflect only temporal changes, ergo the variation in phosphorylation levels during mitotic progress. After running the correction macro, roots with low R^2 values were excluded from further analysis. Certain treatments or genotypes may reduce the number of metaphase cells; in such cases, the macro calculates the correction based all pH3S10 objects.

Another challenge was the variable pattern of phospho-histone signals depending on the mitotic phase. The second macro program can segment each individual nuclei according to user-defined settings (e.g., grayscale threshold values, minimum volume of objects, dilation radius, pixel size, etc.) and measure their total fluorescent signal intensity in 3D on the corrected images. The macro provides us an Excel table as an output with the measured parameters (mean, standard

deviation, maximum, minimum, median, integrated density, etc.) together with the numbering, position, size and shape of the corresponding objects. Subsequent data analysis is performed in this table, where, for example, incorrectly segmented objects can be manually removed.

With the third annotation macro, individual mitotic phases can be determined semi-automatically based on microtubule organization and histone phosphorylation patterns. The program processes the segmented and labelled objects one by one, and the user selects the corresponding mitotic phase from a drop-down menu. Based on pH3S10 positive cells, we distinguished five phases: in early prophase a mature preprophase band (PPB) is present, and phospho-histone signal is detected at the centromeres, showing a dotted distribution; in late prophase the pH3S10 channel still shows a dotted pattern, but the PPB has disassembled, and stronger microtubule bundles are visible around the nucleus; in prometaphase the chromosomes begin to condense, the phospho-histone signal appears more compact, and an initial mitotic spindle is visible; in metaphase the chromosomes are highly condensed and aligned at the equatorial plane, with a well-defined bipolar mitotic spindle; in anaphase the spindle begins to separate sister chromatids, and the histone signal appears as two compact fluorescent signals running parallel with the spindle microtubules. In telophase, when the phragmoplast forms, no pH3S10 signal was detected. Similarly, no phospho-histone signal was present in interphase cells or in early G2 phase cells where the PPB is immature. The macro automatically updates the previously saved Excel table with this annotation information, enabling precise data analysis and appropriate graphical representation.

To test our workflow, we examined different *Arabidopsis thaliana* genotypes. In addition to the wild-type Col0, we first analysed

the pH3S10 levels in the *a2a3* and *trm678* mutant plants, which are only mildly affected phenotypically by the mutations. The *trm678* mutant lacks the PPB (Schaefer *et al.*, 2017), and therefore, in comparative analyses, we did not distinguish between early and late prophase, but instead defined a single prophase category. In both mutant genotypes, reduced pH3S10 levels were detected. Most notably, after applying the metaphase-based correction method, previously undetected statistical differences became apparent in the prometaphase cells of the *a2a3* mutant. In addition, our method significantly reduced the 95% confidence interval (CI95) and was able to correct for uneven object distribution. For example, when observing the distribution of prometaphase cells, we found that in Col0 images these cells tended to appear in the lower part of the root image stacks, while in *a2a3* they were more often located in the upper slices. Without correction, the natural signal attenuation with Z-depth could therefore distort the measured intensity values; however, this correction method compensates for intensity differences arising from such spatially heterogeneous distributions. Consequently, the method is effective for revealing subtle genetic or experimental effects that might otherwise be masked by depth-related signal loss.

Furthermore, we analysed also severely impaired mutant genotypes, such as the *ala3* and the *c3c4* double mutants, which likewise do not form a PPB. These mutants exhibit severe growth and root morphological defects, resulting in a drastic reduction in the number of dividing cells (Zhou *et al.*, 2004; Spinner *et al.*, 2013). Consequently, in these samples, the metaphase-based correction could not be applied; instead, the correction macro used all pH3S10 positive cells to calculate the regression. A comparison performed on Col0 samples, where correction could be done either using only metaphase cells or all pH3S10 positive cells, showed that the values obtained

were very similar. This suggests that although correction using all cells is less precise, it can be an excellent alternative in cases where correction based solely on metaphase cells is not possible. When comparing pH3S10 levels between the mutant plants and the wild-type, we also measured reduced intensity values in these mutant plants, indicating impaired regulation of cell division.

To test the program's effectiveness under different conditions, wild-type *A. thaliana* plants were treated with hesperadin. Consistent with earlier studies (Kurihara *et al.*, 2006, 2008; Demidov *et al.*, 2009), the Aurora kinase inhibitor had a strong effect on mitotic activity and histone H3 phosphorylation. 1 μ M hesperadin treatment reduced pH3S10 levels by 75% from late prophase to anaphase, while no significant effect was observed in early prophase. This suggests that during mitotic entry, other kinases may also regulate histone H3 phosphorylation at the serine 10 residue.

Our newly developed method enables precise quantification of phospho-histone levels and allows accurate analysis of pH3S10 dynamics during mitosis in plants. By combining antibodies against microtubules and phosphorylated histone H3, all mitotic phases can be clearly distinguished, and precision can be further enhanced by using additional mitotic markers.

Although experiments using the new Fiji method were performed in a single biological replicate – since the primary goal was to test the program – our results also suggest that PP2A regulates histone H3 dephosphorylation only indirectly, as lower pH3S10 levels were detected in PP2A loss-of-function mutants. This further supports the previously proposed idea that PP2A primarily modulates reversible histone H3 phosphorylation at serine 10 during mitosis via Aurora kinase activity in *A. thaliana* root meristems. Nevertheless, our method,

which can reliably detect subtle differences between genotypes and treatments, offers a promising tool for mapping histone phosphorylation dynamics in plants, particularly by taking advantage of the rich genetic resources available in *Arabidopsis thaliana*.

4. Conclusions and future perspectives

What have we learned about the role of PP2A in cell cycle in *Arabidopsis thaliana* model plant? Our results suggest that the PP2A holoenzyme complex we studied, containing the FASS and C3/C4 subunits, does not directly regulate histone H3 phosphorylation during mitosis; its effects are likely mediated through the regulation of Aurora kinase activity. On the other hand, PP2A impairment affected mitotic progression by causing mitotic blocks at the metaphase-anaphase transition and caused mild arrests in mitotic exit. This appears to be related to PP2A activity but is not connected to histone H3 phosphorylation. These findings highlight the broader role of PP2A in mitotic regulation, affecting not only entry into mitosis but also progression through it and the exit. This work raises several important questions for future research. Such as, the unexpectedly increased phosphatase activity in the absence of FASS points to unknown molecular mechanisms that require further investigation. It will be also necessary to identify key substrates whose dephosphorylation regulates the metaphase-anaphase transition in *Arabidopsis thaliana*, as histone H3 phosphorylation is likely not involved in controlling this critical checkpoint. FASS is known to regulate cell division via cortical microtubule organization (Spinner et al., 2013; Bouchez et al., 2014; Schaefer et al., 2017), but its other roles remain unclear. The PP2A-FASS complex likely affects histone H3 Ser10 reversible phosphorylation only indirectly, so future work should examine all

mitotic PP2A subunits and cell cycle specific transcriptomes to identify the protein phosphatase acting directly.

The unexpected results from studying the TRM mutant suggest that the TTP complex activity may be linked to chromosome control, potentially through a regulatory role in the reversible histone H3 phosphorylation. However, the connection between chromosome control and microtubule regulation requires further investigation. Additionally, it is important to determine whether other TTP complex components, such as TON1, are involved in regulating histone H3 phosphorylation. Phospho-histone analysis of *ton1* mutants using the new semi-automated ImageJ method, together with studies of TTP complex phosphatase activity at the University of Debrecen, has produced promising initial results that may help clarify the full role of the complex.

5. Acknowledgements and funding sources

I would like to thank my supervisor, **Prof. Dr. Csaba Máthé**, for his continuous support and professional guidance since my undergraduate studies. I am grateful to **Dr. Tamás Garda** and **Dr. Csongor Freytag** for coordinating the experiments, providing expert assistance, and offering valuable advice.

I thank **Dr. David Bouchez** and **Dr. Martine Pastuglia** (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, IJPB, Versailles, France) for allowing me to participate in the work of the SPACE group, and I am especially grateful to Dr. Martine Pastuglia for her dedicated support.

We thank **Prof. Dr. Gábor Vasas** and his research team for providing the toxin used in the experiments. I am grateful to **Dr. László**

Ujlaky-Nagy (UD, Faculty of Medicine, Department of Biophysics and Cell Biology) for his work with the Zeiss LSM 880 confocal microscope and to **Dr. Tamás Garda** for his work with the Nikon-Ti-E confocal microscope. I also thank **Prof. Dr. Ferenc Erdódi** and **Dr. Zoltán Kónya** (UD, Faculty of Medicine, Institute of Medical Chemistry) for their assistance with protein phosphatase isotope activity measurements.

Furthermore, I thank all current and former teachers, staff, and students of the **Department of Botany** for their contributions to the experiments, as well as all co-authors of my papers for their role in the successful completion of the projects.

Finally, I wish to express my heartfelt gratitude to my **parents, family members, friends, and loved ones** for their unwavering support, encouragement, and presence during the more challenging moments of my studies.

Funding sources: NKFIH OTKA K 120638; DETKA; ÚNKP-20-2-1-DE-129; EMBO Scientific Exchange Grant SEG-9500; PO-Cyto & SPS ANR-20-CE13-0026-02 and ANR-17-EUR-0007.



Registry number: DEENK/521/2025.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Adrienn Kelemen

Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences

MTMT ID: 10082728

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (3)

1. **Kelemen, A.**, Kónya, Z., Ujlaky-Nagy, L., Garda, T., Erdődi, F., Freytag, C., Juhász, G. P., Pasternak, T. P., Riba, M., Máthé, C.: Fass and C3/C4 contribute to the activities and levels of the protein phosphatase 2A catalytic subunit pool and regulate mitotic events in Arabidopsis.
Plant Physiol. Biochem. 227, 1-12, 2025. ISSN: 0981-9428.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.110187>
IF: 5.7 (2024)
2. **Kelemen, A.**, Uyttewaal, M., Máthé, C., Andrey, P., Bouchez, D., Pastuglia, M.: Semiautomatic quantification of 3D Histone H3 phosphorylation signals during cell division in Arabidopsis root meristems.
New Phytol. 247 (6), 3010-3023, 2025. ISSN: 0028-646X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/nph.70365>
IF: 8.1 (2024)
3. **Kelemen, A.**, Garda, T., Kónya, Z., Erdődi, F., Ujlaky-Nagy, L., Juhász, G. P., Freytag, C., Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Treatments with diquat reveal the relationship between protein phosphatases (PP2A) and oxidative stress during mitosis in Arabidopsis thaliana Root meristems.
Plants-Basel. 13 (14), 1-16, 2024. ISSN: 2223-7747.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants13141896>
IF: 4.1





List of other publications

Foreign language scientific articles in international journals (4)

4. Garda, T., Juhász, G. P., **Kelemen, A.**, Mathur, J., Ujlaky-Nagy, L., Freytag, C., Mikóné Hamvas, M., Riba, M., Máthé, C.: Long-term treatments with microcystin-LR and diquat reveal their differences in the induction of oxidative stress responses and mitotic alterations in terms of stress recovery in *Arabidopsis* roots.
Environ. Pollut. 382, 1-10, 2025. ISSN: 0269-7491.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2025.126748>
IF: 7.3 (2024)
5. Máthé, C., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Mikóné Hamvas, M., Garda, T.: "B" Regulatory Subunits of PP2A: Their Roles in Plant Development and Stress Reactions.
Int. J. Mol. Sci. 24 (6), 1-13, 2023. EISSN: 1422-0067.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24065147>
IF: 4.9
6. Freytag, C., Garda, T., Kónya, Z., Mikóné Hamvas, M., Tóth-Várady, B., Juhász, G. P., Ujlaky-Nagy, L., **Kelemen, A.**, Vasas, G., Máthé, C.: "B" and C subunits of PP2A regulate the levels of reactive oxygen species and superoxide dismutase activities in *Arabidopsis*.
Plant Physiol. Biochem. 195, 182-192, 2023. ISSN: 0981-9428.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.031>
IF: 6.1
7. Freytag, C., Máthé, C., Rigó, G., Nodzyński, T., Kónya, Z., Erdődi, F., Cséplő, Á., Pózer, E., Szabados, L., **Kelemen, A.**, Vasas, G., Garda, T.: Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin affects root development by changing levels of PIN proteins and auxin response in *Arabidopsis* roots.
Chemosphere. 276, 1-10, 2021. ISSN: 0045-6535.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130183>
IF: 8.943

Hungarian abstracts (13)

8. Máthé, C., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Mikóné Hamvas, M.: Hogyan befolyásolják az *Arabidopsis* PP2A protein foszfatáz C3-C4 és Fass alegységei a ROS szintet és az antioxidáns enzimaktivitásokat- rövid- és hosszú távon?
In: A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság XIII. Kongresszusa: Program és Összefoglalók.
Szerk.: Máthé Csaba, Poór Péter, Blázovics Anna, Debreceni Egyetem, Debrecen, 27, 2025.
ISBN: 9789634907367





9. Máthé, C., Garda, T., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Mikóné Hamvas, M.: A protein foszfatázok szerepe a növényi sejt szubcelluláris dinamikájában.
In: 24. Kolozsvári Biológus Napok : Kivonatfüzet, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, 41-41, 2024.
10. Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., Garda, T., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Pózer, E., Riba, M.: Amikor a sejtbiológia és a környezeti toxikológia találkozik: a mikrocisztin-LR, egy cianobakteriális toxin hatásai modell- és vízinövényekben.
In: 23. Kolozsvári Biológus Napok : Kivonatfüzet = Zilele Biologice din Cluj, ed. 23-a : Volum de abstracte = 23rd Biology Days : Abstracts. Eds.: Fenesi Annamária, Pap Péter László, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Magyar Biológiai és Ökológiai Intézet (MBÖI), Apáthy István Egyesület, Kolozsvár, 45, BŐSZ (KMDSZ BiológiaÖkológia Szakosztály) Kolozsvári Akadémiai Bizottság (KAB) 2023.
11. **Kelemen, A.**, Bouchez, D., Pastuglia, M., Garda, T., Freytag, C., Máthé, C.: A reverzibilis hiszton foszforiláció vizsgálata 3D fluoreszcens szignál analízis segítségével az osztódó Arabidopsis thaliana gyökércsúcs sejtjeiben.
In: 23. Kolozsvári Biológus Napok : Kivonatfüzet = Zilele Biologice din Cluj, ed. 23-a : Volum de abstracte = 23rd Biology Days : Abstracts. Eds.: Fenesi Annamária, Pap Péter László, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Magyar Biológiai és Ökológiai Intézet (MBÖI), Apáthy István Egyesület, Kolozsvár, 33, BŐSZ (KMDSZ BiológiaÖkológia Szakosztály) Kolozsvári Akadémiai Bizottság (KAB) 2023.
12. **Kelemen, A.**, Garda, T., Freytag, C., Máthé, C.: A reverzibilis hiszton H3 foszforiláció szerepe a sejtosztódás szabályozásában Arabidopsis thaliana gyökércsúcs merisztéma sejtjeiben.
In: XXVI. Tavasz Szel Konferencia 2023 - Absztrakt kötet. Szerk.: Hajdú Péter, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 103, 2023. ISBN: 9786156457233
13. Máthé, C., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Mikóné Hamvas, M.: PP2A protein foszfatáz speciális alegységeinek szerepe az oxidatív stresszválaszok szabályozásában Arabidopsis csiranövényekben.
In: A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság XII. Kongresszusa (12th Congress of the Hungarian Free Radical Society): Program és Összefoglalók, Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár, 45, 2023. ISBN: 9786156203021
14. Freytag, C., Juhász, G. P., Máthé, C., **Kelemen, A.**, Mikóné Hamvas, M.: SOD izomformák aktivitása Arabidopsis thaliana protein foszfatáz 2A, C és B" alegység mutánsok gyökereiben.
In: A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság XII. Kongresszusa (12th Congress of the Hungarian Free Radical Society): Program és Összefoglalók, Agrártudományi Kutatóközpont, Mezőgazdasági Intézet, Martonvásár, 27, 2023. ISBN: 9786156203021





15. Garda, T., Máthé, C., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Erdődi, F., Kónya, Z.: A foszforilált hiszton H3 és H2Ax vizsgálata PP2A mutáns Arabidopsis thaliana növényekben.
In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 23, 2021.
ISBN: 9786150123509
16. Freytag, C., Máthé, C., Rigó, G., Nodzyński, T., Kónya, Z., Erdődi, F., Cséplő, Á., Pózer, E., Szabados, L., **Kelemen, A.**, Vasas, G., Garda, T.: A Microcystin-LR cianobakteriális toxin képes megváltoztatni a gyökér fejlődését a PIN fehérjék és az auxin szint megváltoztatásával Arabidopsis gyökérben.
In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 26, 2021.
ISBN: 9786150123509
17. **Kelemen, A.**, Garda, T., Ujlaky-Nagy, L., Máthé, C., Freytag, C.: A protein foszfatáz gátlás rövid- illetve hosszútávú hatásai az Arabidopsis gyökércsúcsok mitotikus aktivitására.
In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 72, 2021.
ISBN: 9786150123509
18. Tóth-Várady, B., Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., Garda, T., Erdődi, F., Kónya, Z., Juhász, G. P., **Kelemen, A.**, Pózer, E.: Az oxidatív stressz eliminálását elősegítő enzimek vizsgálata Arabidopsis thaliana vad típusban és protein foszfatáz mutánsokban.
In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 93, 2021.
ISBN: 9786150123509
19. Máthé, C., Garda, T., Freytag, C., **Kelemen, A.**, Beyer, D., Kónya, Z., Erdődi, F., Mikóné Hamvas, M., Dobránszki, J., Pastuglia, M.: Hogyan befolyásolják a protein foszfatázok a növényi sejt szerveződését, epigenetikai változásait? Alaputatás és biotechnológiai alkalmazások.
In: Biotechnológia a Debreceni Egyetemen. Fókuszban az agrár- és élelmiszerbiotechnológia : Tudományos Szimpózium előadás összefoglalók, Debreceni Egyetem MÉK Agrár Genomikai és Biotechnológiai Központ, Debrecen, 25-27, 2021. ISBN: 9789634903512
20. **Kelemen, A.**: A protein foszfatáz gátlás és az oxidatív stressz citológiai hatásai Arabidopsis thaliana gyökércsúcs merisztéma sejtekben.
In: XXXIV. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Biológia Szekció, Program és Összefoglalók, Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Kar, Budapest, 114, 2019.





Foreign language abstracts (7)

21. Máthé, C., Kónya, Z., Erdődi, F., **Kelemen, A.**, Garda, T., Mikóné Hamvas, M., Juhász, G. P., Freytag, C.: The roles of PP2A subunits Foss and C3/C4 in the regulation of mitosis and oxidative stress responses in Arabidopsis- studies with phosphatase mutants and inhibitors. In: Plant Biology Europe 2025: Programme and Book of Abstracts, [s.n.], Budapest, 87, O-57, 2025. ISBN: 9786156833020
22. Máthé, C., Garda, T., **Kelemen, A.**, Juhász, G. P., Freytag, C., Mikóné Hamvas, M.: Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin is inducing biotic stress and serves as a tool in plant cell biology research. In: Plant Biotic Stresses and Resistance Mechanisms V. : VISCEA International conference : Programme and abstracts, [s.n.], Vienna, 14-14, 2024.
23. **Kelemen, A.**, Bouchez, D., Pastuglia, M., Máthé, C.: 3D analysis of the histone H3 fluorescent signals: Application to the study of histone reversible phosphorylation during cell division in Arabidopsis root meristems. In: Botanical Microscopy Meeting 2023. Ed.: Kim Findlay, Christine Faulkner, Patrick Hussey, Ulla Neumann, Richard Smith, Imogen Sparkes, RMS, Norwich, 61, 2023.
24. **Kelemen, A.**, Bouchez, D., Pastuglia, M., Máthé, C., Garda, T., Freytag, C.: Application of 3D fluorescent histone signal analysis to investigate the role of its reversible phosphorylation during mitosis in Arabidopsis root meristems. In: 13th EMBO Young Scientists' Forum: Book of Abstracts, [s.n.], Lisbon, 79-80, 2023.
25. Máthé, C., Kónya, Z., **Kelemen, A.**, Garda, T., Mikóné Hamvas, M., Juhász, G. P., Freytag, C.: New insights into the roles of PP2A subunits FASS and C3/C4 in the regulation of mitosis and oxidative stress responses in Arabidopsis. In: Botanical Microscopy Meeting 2023 / Kim Findlay, Christine Faulkner; Patrick Hussey; Ulla Neumann; Richard Smith; Imogen Sparkes, RMS, Norwich, 77-78, 2023.
26. Máthé, C., Garda, T., **Kelemen, A.**, Ujlaky-Nagy, L.: Mitotic responses of Arabidopsis PP2A mutants reveal the roles of both regulatory and catalytic subunits in the regulation of cell division. In: XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus : Összefoglaló kötet / (szerk.) Györgyey János, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Magyar Növénybiológiai Társaság, Szeged, 24, 2021. ISBN: 9786150123509





**UNIVERSITY of
DEBRECEN**

**UNIVERSITY AND NATIONAL LIBRARY
UNIVERSITY OF DEBRECEN**

H-4002 Egyetem tér 1, Debrecen

Phone: +3652/410-443, email: publikaciok@lib.unideb.hu

27. Máthé, C., Garda, T., Freytag, C., Mikóné Hamvas, M., **Kelemen, A.**, Kónya, Z., Erdődi, F.:
Effects of serine-threonine protein phosphatase inhibition and ROS induction on mitotic activity, cytoskeletal and chromatin organization in model higher plants.
In: 11th International Botanical Microscopy Meeting : Presentation abstract, Royal Microscopical Society, Oxford, 1, 2019.

Total IF of journals (all publications): 45,143

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 17,9

The Candidate's publication data submitted to the Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

11 September, 2025



Irodalomjegyzék/References

Alonso JM, Stepanova AN, Lisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, *et al.* 2003. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.

Ballesteros I, Domínguez T, Sauer M, Paredes P, Duprat A, Rojo E, Sanmartín M, Sánchez-Serrano JJ. 2013. Specialized functions of the PP2A subfamily II catalytic subunits PP2A-C3 and PP2A-C4 in the distribution of auxin fluxes and development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **73**: 862–872.

Beyer D, Tándor I, Kónya Z, Bátori R, Roszik J, Vereb G, Erdódi F, Vasas G, M-Hamvas M, Jambrovics K, Máthé C. 2012. Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*. *Annals of Botany* **110**: 797–808.

Biot E, Crowell E, Hofte H, Maurin Y, Vernhettes S, Andrey P. 2008. A new filter for spot extraction in n-dimensional biological imaging. In: *2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*. Paris: IEEE, 975–978.

Bouchez D, Van Damme D, Boruc J, Schaefer E, Pastuglia M. 2014. Cell Division Plane Determination in Plant Development. In: Assmann S, Liu B, eds. *Cell Biology*. Springer, New York, US, 1–26.

Camilleri C, Azimzadeh J, Pastuglia M, Bellini C, Grandjean O, Bouchez D. 2002. The *Arabidopsis* TONNEAU 2 Gene Encodes a Putative Novel Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit Essential for the Control of the Cortical Cytoskeleton. *The Plant Cell* **14**: 833–845.

Campos A, Vasconcelos V. 2010. Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **11**: 268–287.

Dedinszki D, Sipos A, Kiss A, Bátori R, Kónya Z, Virág L, Erdódi F, Lontay B. 2015. Protein phosphatase-1 is involved in the maintenance of normal homeostasis and in UVA irradiation-induced pathological alterations in HaCaT cells and in mouse skin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1852**: 22–33.

Demidov D, Hesse S, Tewes A, Rutten T, Fuchs J, Karimi Ashtiyani R, Lein S, Fischer A, Reuter G, Houben A. 2009. Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **59**: 221–230.

Domander R, Felder A, Doube M. 2021. BoneJ2 - refactoring established research software. *Wellcome Open Research* **6**: 37.

Erdodi F, Toth B, Hirano K, Hirano M, Hartshorne DJ, Gergely P. 1995. Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **269**: C1176–C1184.

Eyers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL. 2003. A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Current Biology* **13**: 691–697.

Garda T, Juhász GP, Kelemen A, Mathur J, Ujlaky-Nagy L, Freytag C, M-Hamvas M, Riba M, Máthé C. 2025. Long-term treatments with microcystin-LR and diquat reveal their differences in the induction of oxidative stress responses and mitotic alterations in terms of stress recovery in Arabidopsis roots. *Environmental Pollution* **382**: 126748.

Garda T, Kónya Z, Freytag C, Erdődi F, Gonda S, Vasas G, Szücs B, M-Hamvas M, Kiss-Szikszai A, Vámosi G, Máthé C. 2018. Allyl-Isothiocyanate and Microcystin-LR Reveal the Protein Phosphatase Mediated Regulation of Metaphase-Anaphase Transition in Vicia faba. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1823.

Garda T, Kónya Z, Tándor I, Beyer D, Vasas G, Erdődi F, Vereb G, Papp G, Riba M, M-Hamvas M, Máthé C. 2016. Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in Vicia faba by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction. *Journal of Plant Physiology* **199**: 1–11.

Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, Van Meel J, Rieder CL, Peters J-M. 2003. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore–microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *The Journal of Cell Biology* **161**: 281–294.

Henzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. 1997. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**: 348–360.

Houben A, Demidov D, Caperta AD, Karimi R, Agueci F, Vlasenko L. 2007. Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1769**: 308–315.

Huang W, Batra S, Atkins BA, Mishra V, Mehta KD. 2005. Increases in intracellular calcium dephosphorylate histone H3 at serine 10 in human hepatoma cells: Potential role of protein phosphatase 2A–protein kinase C β II complex. *Journal of Cellular Physiology* **205**: 37–46.

Juhász GP, Kéki S, Dékány-Adamoczky A, Freytag C, Vasas G, Máthé C, Garda T. 2023. Microcystin-LR, a Cyanobacterial Toxin, Induces Changes in the Organization of Membrane Compartments in Arabidopsis. *Microorganisms* **11**: 586.

Kirik A, Ehrhardt DW, Kirik V. 2012. TONNEAU2/FASS Regulates the Geometry of Microtubule Nucleation and Cortical Array Organization in Interphase Arabidopsis Cells. *The Plant Cell* **24**: 1158–1170.

Kos P, Gorzo G, Suranyi G, Borbely G. 1995. Simple and Efficient Method for Isolation and Measurement of Cyanobacterial Hepatotoxins by Plant Tests (Sinapis alba L.). *Analytical Biochemistry* **225**: 49–53.

Kurihara D, Matsunaga S, Kawabe A, Fujimoto S, Noda M, Uchiyama S, Fukui K. 2006. Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *The Plant Journal* **48**: 572–580.

Kurihara D, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K. 2008. Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant and cell physiology* **49**: 1256–1261.

Legland D, Arganda-Carreras I, Andrey P. 2016. MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* **32**: 3532–3534.

Luan S. 2003. Protein Phosphatases in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 63–92.

Ma X, Gu Y, Liang C. 2023. Adaptation of protein phosphatases in *Oryza sativa* and *Cucumis sativus* to microcystins. *Environmental Science and Pollution Research* **30**: 7018–7029.

MacKintosh C, Diplexcito J. 2010. Naturally occurring inhibitors of protein serine/threonine phosphatases. In: Bradshaw RA, Dennis EA, eds. *Handbook of Cell Signaling*. Elsevier, 683–687.

Máthé C, Beyer D, Erdódi F, Serfőző Z, Székvölgyi L, Vasas G, M-Hamvas M, Jámbrik K, Gonda S, Kiss A. 2009. Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquatic Toxicology* **92**: 122–130.

Máthé C, Garda T, Freytag C, M-Hamvas M. 2019. The Role of Serine-Threonine Protein Phosphatase PP2A in Plant Oxidative Stress Signaling—Facts and Hypotheses. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 3028.

Máthé C, Vasas G, Borbély G, Erdódi F, Beyer D, Kiss A, Surányi G, Gonda S, Jámbrik K, M-Hamvas M. 2013. Histological, cytological and biochemical alterations induced by microcystin-LR and cylindrospermopsin in white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Acta Biologica Hungarica* **64**: 71–85.

Nowak SJ, Pai C-Y, Corces VG. 2003. Protein Phosphatase 2A Activity Affects Histone H3 Phosphorylation and Transcription in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 6129–6138.

Ohser J, Haas P, Fahrbach F, Menstell P, Schwämmle A, Osterroth S, Dobrovolskij D. 2020. Attenuation correction for confocal laser scanning microscopy and its application in chromatography. *Journal of Microscopy* **278**: 76–88.

Pasternak T, Tietz O, Rapp K, Begheldo M, Nitschke R, Ruperti B, Palme K. 2015. Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods* **11**: 50.

Schaefer E, Belcram K, Uyttewaal M, Duroc Y, Goussot M, Legland D, Laruelle E, de Tauzia-Moreau M-L, Pastuglia M, Bouchez D. 2017. The preprophase band of

microtubules controls the robustness of division orientation in plants. *Science* **356**: 186–189.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**: 676–682.

Smith RD, Walker JC. 1996. Plant protein phosphatases. *Annual review of plant biology* **47**: 101–125.

Spinner L, Gadeyne A, Belcram K, Goussot M, Moison M, Duroc Y, Eeckhout D, De Winne N, Schaefer E, Van De Slijke E, Persiau G, Witters E, Gevaert K, et al. 2013. A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nature Communications* **4**: 1863.

Ujvárosi AZ, Riba M, Garda T, Gyémánt G, Vereb G, M-Hamvas M, Vasas G, Máthé C. 2019. Attack of *Microcystis aeruginosa* bloom on a *Ceratophyllum submersum* field: Ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure. *Science of The Total Environment* **662**: 735–745.

Valério E, Vasconcelos V, Campos A. 2016. New Insights on the Mode of Action of Microcystins in Animal Cells - A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **16**: 1032–1041.

Vasas G, Gáspár A, Páger C, Surányi G, Máthé C, Hamvas MM, Borbely G. 2004. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **25**: 108–115.

Wickham H. 2016. Data analysis. In: *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer, Cham, 189–201.

Wlodarchak N, Xing Y. 2016. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **51**: 162–184.

Zhang B, Dong Q, Su H, Birchler JA, Han F. 2014. Histone Phosphorylation: Its Role during Cell Cycle and Centromere Identity in Plants. *Cytogenetic and Genome Research* **143**: 144–149.

Zhou H-W, Nussbaumer C, Chao Y, DeLong A. 2004. Disparate Roles for the Regulatory A Subunit Isoforms in Arabidopsis Protein Phosphatase 2A. *The Plant Cell* **16**: 709–722.