

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A PP2A protein-foszfataz az auxin-transzportot és az oxidatív stresszválaszokat egyaránt szabályozza az *Arabidopsis thaliana* csíranövényekben.

Freytag Csongor

Témavezető: Prof. Dr. Máthé Csaba



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

Bevezető

A növények életének egyik sajátosága, hogy nem képesek önálló aktív helyváltoztatásra, így minden környezeti változásra helyben kell reagálniuk. Az életfolyamatok, mint a növekedés, sejtosztódás és differenciálódás, különféle biokémiai folyamatokból és azok szabályozó mechanizmusokból és jelátviteli utakból épülnek fel. A jelátviteli utakban nyernek értelmet a külső, belső változások okozta ingerek és váltanak ki válaszokat, változásokat a biokémiai folyamatokban.

Disszertációm középpontjában a protein foszforiláció szerepe az auxin transzporttal és eloszlással összefüggő, fejlődési folyamatok állnak, melyekben a PP2AC3 és C4 protein-foszfatazoknak jelentős szerepe van (Ballesteros et al., 2013). Másrészt, az oxidatív stressz defoszforilációs szabályozását vizsgáltuk, ahol ezen két alegység, továbbá a PP2A F_{ass} (B^{''}) alegységek szerepéről jóval kevesebb az ismeretünk (Durian et al., 2020; Máthé et al., 2023).

A Mikrocisztin-LR (MCY-LR) egy kiváló eszköz a foszfataz gátlás és az oxidatív stressz szimultán vizsgálatához. A MCY-LR az egyik leggyakoribb cianobakteriális heptapeptid toxin, amelyet főként édesvízi cianobaktériumok termelnek. Erősen gátolja a PP2A és PP1 protein-foszfatazokat (MacKintosh *et al.*, 1990). Emellett a MCY-LR fontos tulajdonságának tartják, hogy képes oxidatív stressz folyamatokat indukálni (Máthé *et al.*, 2019).

Célkitűzés

Disszertációs munkám során a protein-foszfataz aktivitások mellett a növények életfolyamatainak 2 aspektusát vizsgáltuk *Arabidopsis thaliana* csíranövényekben. A gyökér növekedést és az azt szabályozó egyik növényi hormon az auxin elosztásáért felelős PIN transzmembrán fehérjét. Az auxin szállítás, egyik formája a poláris transzport, mely során az auxin sejtről sejtre jut. Az auxin influx elsősorban az AUX1/LAX permeáz által biztosított, míg a PIN-ek az effluxot szabályozzák (Michniewicz *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2018). Az PIN fehérje család működése reverzibilis foszforilációjuktól függ és kulcsfontosságú a növényi ontogenezis szempontjából (Zwiewka *et al.*, 2019).

A második aspektus a stressz és életfolyamatok során keletkező reaktív oxigén formák (ROS) megjelenésének szabályozása és semlegesítése. A szuperoxid-dizmutázok (SOD-k) a ROS fő megkötői a szuperoxid-aniont szubsztrátot hidrogén-peroxiddá alakítják, ami kevésbé toxikus formája a ROS-nak. A SOD-nak több izoformája létezik fémfüggőségük szerint. A Fe-SOD izoenzimek főként a kloroplasztiszokban lokalizálódnak, de jelen vannak a citoszolban és a sejtmagban is. A gyökereket illetően a Fe-SOD nagy része az apikális régióban lokalizálódik, de jelen van a fiatal csíranövények teljes primer gyökérrendszerében, ahol hozzájárul a sóstressz tolerancia kialakulásához (Dvořák *et al.*, 2021). A Mn-SOD alapvetően a mitokondriumokban és a peroxiszómákban lokalizálódik, de feltételezett

apoplasztikus formát is azonosítottak az *Arabidopsis thaliana* gyökereiben (Chen *et al.*, 2022). A Cu/Zn-SOD főként a plasztiszokban lokalizálódik, de a citoszolban is jelen van (Kliebenstein *et al.*, 1998). Növényekben a SOD izoformák közvetlen vagy közvetett foszforegulációjáról nem sokat tudunk.

Végül, a második célkitűzésünkkel szoros kapcsolatban a jellemzően ROS indukálta károsodás, a DNS kettős szálú hasadását jelző foszforilált H2AX hiszton fehérje szintjét vizsgáltuk. A H2AX a hiszton 2A egyik változata eukariótákban. A karboxi-terminális helyen foszforilált formáját γ H2AX-nek nevezik, és szerepet játszik a kettős szálú DNS szakadás javításának megindításában (Fillingham *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006).

1. Célunk volt feltárni a MCY-LR káros hatásait a PIN- és auxin-eloszlásra az *Arabidopsis thaliana* gyökereiben, és megvizsgálni ennek a gyökérfejlődésre gyakorolt hatásait.
2. Azt a célt tűztük, hogy újszerű betekintést adjunk a PP2A B'' és C alegységek növényi oxidatív stresszben betöltött szerepébe. Továbbá, a következő kérdésre is választ kívántunk adni: szabályozza-e a kettősszálú DNS törés jelzőmolekuláját a H2AX hiszton foszforilációs állapotát a PP2A?

Eredmények és megbeszélésük

Először az *Arabidopsis thaliana* (Columbia ökotípus; Col-0) 3-5 napos csíranövényeiben vizsgáltuk a gyökér növekedését és az oldalgökörek fejlődését.

A konfokális pásztázó lézeres mikroszkópos (CLSM) vizsgálatok alapján viszonylag rövid távú (24 órás) MCY-LR kezelések csökkentették a PIN1, PIN2 és PIN7 szintet, de nem a PIN3 szintjét a primer gyökércsúcsokban. A fiatal oldalgökörekben ezzel szemben a PIN1 és PIN2 szintje nőtt és a PIN3 szintje csökkent, a primordiumokban szintén ezt a tendenciát követték a PIN fehérjék intenzitásai. A PIN-ek vizsgálata után adódott a kérdés, hogy van-e hatása a PIN mennyiségi változásainak az auxin transzportjára? A DR5:GFP riporteraktivitás azt mutatta, hogy a cianotoxin által kiváltott auxin-válaszok csökkenése a primer gyökércsúcsokban a PIN-szintekkel párhuzamosan változik. A fenotipikus vizsgálatok (növekedés, gravistimuláció) során azt láttuk, hogy ezek a változások nem befolyásolták a gyökerek gravitropikus válaszát, valamint kihatnak a gyökér növekedésére és fejlődésére. A MCY-LR kezelés képes volt helyreállítani a *crk5-1* mutánsok (protein kináz hibás növények) megváltozott gravitropikus válaszát. A CRK-5 alapvető szerepet játszik a PIN2 helyes membrán lokalizációjában. Továbbá a MCY-LR-rel kezelt Col-0 növényeknél a primer gyökér növekedése lelassult és a primordiumok száma megnőtt, míg a fiatal oldalgökörek számát szintén visszafogta a kezelés.

Az érdeklődésünk az oxidatív stressz felé fordult. Ennek oka, hogy a PP2A szerin-treonin protein-foszfatazok ugyan számos sejtfolyamatban vesznek részt, azonban szerepük az oxidatív stresszreakciókban és a védekezésben kevésbé ismert. A vizsgálatainkhoz további foszfataz (PP2A) mutáns növényeket választottunk. A *c3c4* C alegység és a *fass* B” alegység mutánsait, valamint az *Arabidopsis th.* Col-0 5 napos csíranövényeit használtuk. Célunk volt, hogy feltárjuk a C (katalitikus) és a B” (szabályozó) alegységek érintettségét a reaktív oxigén formák (ROS) keletkezésében és semlegesítésében. A PP2A inhibitor mikrocisztin-LR (MCY-LR) mellett egy másik direkt ROS indukálására alkalmas szert is használtunk, a diquat-ot (DQ).

A Col-0 és foszfataz mutáns csíranövények gyökerein végzett összes ROS mérést egy fluoreszcens mikroszkópos technika, a diklorodihidro-fluoreszcein diacetát (DCFH-DA) jelöléssel végeztük. A primer gyökerek ROS szintje nagymértékben genotípusfüggő volt, és mind a C, mind a B” alegység mutánsai fokozott érzékenységet mutáltak a kezelésekkel szemben, ami azt jelzi, hogy ezek az alegységek részt vesznek az oxidatív stressz indukációjában. A ROS semlegesítést közvetve a szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitás vizsgálata révén mértük. A SOD izoformák, elsősorban a Cu/Zn SOD és kisebb mértékben a Fe1-SOD aktivitása megváltozott, többnyire fokozott aktivitást mutatnak, főként a *fass* mutánsokban, és fokozott érzékenységet mutatnak a kezelésekre is. A kezeletlen és kezelt B”

mutánsokkal végzett Western blot vizsgálatok bebizonyították, hogy ez az alegység szabályozza a H2AX, egy hiszton variáns foszforilációjának szintjét. A H2AX foszforilációs állapota, amely korrelál az oxidatív stresszválaszokkal, nem függ közvetlenül a PP2A katalitikus alegységeinek aktivitásában bekövetkező változásaitól, viszont a B" szabályozó alegységek igenis képesek befolyásolni a γ H2AX szintjét. *Arabidopsis thaliana*-ban tehát úgy tűnik, hogy a C3 és C4 (és más katalitikus alegységek) által adott PP2A aktivitás kisebb közvetlen szerepet játszik a γ H2AX defoszforilációban, mint a B" alegységekhez kapcsolódó egyéb események.

A B" alegység részvétele a fenti folyamatokban nemcsak a jelenlététől vagy hiányától függ, hanem a PP2A holoenzimhez viszonyított mennyiségétől/aktivitásának mértékétől is, ahogyan azt a *fass-5* és *fass-15* mutánsok homozigóta recesszív és heterozigóta genotípusainak ilyen szempontú összehasonlítása kimutatta. Az eredményeinknek toxikológiai vonatkozása is van. Bár számos vizsgálat azt mutatja, hogy a MCY-LR a protein-foszfátáz gátló hatásától független mechanizmusok révén indukál oxidatív stresszt, mi bizonyítottuk, hogy a PP2A modulálásával oxidatív stresszt is indukál mind a vad típusú növényekben, mind a B/C alegység mutánsokban. Ehhez kapcsolódóan a MCY-LR számos itt vizsgált hatása különbözik a DQ-tól, amely ROS indukáló, és amelynek ROS indukációs mechanizmusai legalább részben függetlenek a PP2A-tól. Tekintettel a MCY-LR és a DQ részben eltérő hatásaira, az oxidatív

stressz indukciója és a válaszok nem függenek teljesen a PP2A-tól *Arabidopsis*-ban.

Összefoglalva, a protein-foszfataz aktivitás gátlása megváltoztatta a PIN- eloszlást és auxin választ, így megváltozott a gyökérfejlődés. Továbbá rámutatunk a PP2A valószínűleg kulcsfontosságú szerepére a növények oxidatív stresszreakcióinak szabályozásában, és előkészítettük az utat a jövőbeli kutatások számára, amelyek feltárhatják az érintett jelátviteli útvonalakat.

Összességében a jelen munka fő következtetései, amelyek új tudományos eredmények, a következők:

1. A primer gyökércsúcsokban MCY-LR kezelések csökkentették a PIN1, PIN2 és PIN7 szintet, de a PIN3 szintjét nem. A fiatal oldalgyökerekben ezzel szemben a PIN1 és PIN2 szintje nőtt és a PIN3 szintje csökkent, a primordiumokban szintén ezt a tendenciát követték a PIN fehérjék jelintenzitásai. A DR5:GFP riporteraktivitás azt mutatta, hogy a cianotoxin által kiváltott auxin válaszok csökkenése a primer gyökércsúcsokban a PIN-szintekkel párhuzamosan változik
2. A MCY-LR kezelés képes volt helyreállítani a *crk5-1* mutánsok (protein kináz hibás növények) megváltozott gravitropikus választ.
3. A PP2A C katalitikus (C3 és C4) és B" (szabályozó) alegységei egyaránt részt vesznek az oxidatív stressz szabályozásában *Arabidopsis*-ban. Mind a B", mind a C alegység mutánsok a Col-0-

hoz képest eltérő ROS szinteket mutatnak, mind a kezeletlen növények, mind a MCY-LR/DQ kezelések hatását illetően.

4. A B" alegység szerepet játszik a SOD aktivitások (elsősorban a Cu/Zn SOD és kisebb mértékben a Fe1-SOD) szabályozásában, amelyek részt vesznek az oxidatív stressz elleni védekezési válaszokban. Releváns bizonyítékok:
 - a. A *c3c4* kezeletlen növényekben a viszonylag alacsony ROS szintek fordított arányosságot mutatnak a viszonylag magas Fe1-SOD és Cu/Zn-SOD aktivitással. Ez azt jelzi, hogy a PP2A C3 és C4 katalitikus alegységeinek izoformái befolyásolják az oxidatív stresszre adott védelmi válaszokat.
 - b. A *fass-5* és *fass-15* mutánsokkal kapott eredményeink azt mutatják, hogy a FASS fehérje, mint B" szabályozó alegység valóban szabályozza az oxidatív stresszt és a ROS semlegesítést, és ez összefügg a hiszton H2AX foszforilációval. A MCY-LR és a DQ kezelések azonban azt mutatják, hogy ez a kapcsolat összetett, számos aspektus további vizsgálatot igényel. Meg kell jegyezni, hogy a B" szabályozó alegység funkcionalitása komplex hatással van a PP2A aktivitására (azaz a funkcionális fehérje hiánya nem jelenti azt, hogy a PP2A/C aktivitása gátolt lesz), és hatással van más protein-foszfatázokra (pl. PP1) is (máshol fogjuk publikálni).
5. A B" alegység részvétele a fenti folyamatokban nemcsak a jelenlététől vagy hiányától függ, hanem a PP2A holoenzimhez viszonyított mennyiségétől/aktivitásának mértékétől is - ahogyan azt

a *fass-5* és *fass-15* mutánsok homozigóta recesszív és heterozigóta genotípusainak ilyen szempontú összehasonlítása kimutatta.

6. Eredményeinknek toxikológiai vonatkozása is van. Bár számos vizsgálat azt mutatja, hogy a MCY-LR a protein-foszfataz gátló hatásától független mechanizmusok révén indukál oxidatív stresszt, mi bizonyítottuk, hogy a PP2A modulálásával oxidatív stresszt idéz elő a B¹/C alegység mutánsokban. Ehhez kapcsolódóan a MCY-LR számos itt vizsgált hatása különbözik a DQ-tól, amely ROS indukáló, és amelynek ROS indukációs mechanizmusai legalább részben függetlenek a PP2A-tól.
7. Tekintettel a MCY-LR és a DQ részben eltérő hatásaira, az oxidatív stressz indukciója és a válaszok nem függenek teljesen a PP2A-tól *Arabidopsis*-ban.
8. Úgy tűnik, hogy a H2AX foszforilációs állapota - amely korrelál az oxidatív stresszválaszokkal - nem függ közvetlenül a PP2A katalitikus alegységeinek aktivitásában bekövetkező modulációktól, de a B¹ szabályozó alegységek igenis modulálják a γ H2AX szintjét. *Arabidopsis*-ban tehát úgy tűnik, hogy a C3 és C4 (és más katalitikus) alegységek által adott PP2A aktivitás kisebb közvetlen szerepet játszik a γ H2AX defoszforilációban, mint a B¹ alegységekhez kapcsolódó egyéb események.

Anyag és módszerek

Vizsgálatainkat *Arabidopsis thaliana* Columbia ökötypusban és annak mutánsaiban végeztük, Col-0 háttérű PIN1:PIN1-GFP, PIN2:PIN2-GFP és PIN3:PIN3-GFP (Benková *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006; Žádníková *et al.*, 2010), DR5rev:GFP fúziós konstrukció (Friml *et al.*, 2003; Žádníková *et al.*, 2010), valamint a *crk5-1* funkcióvesztett mutánsban (Rigó *et al.*, 2013). Camilleri *et al.* (2002), Kirik *et al.* (2012) és Spinner *et al.* (2013) által leírt protein-foszfataz (PP2A) mutánsokkal szintén dolgoztunk. Ezek a *c3c4*, a katalitikus alegységek kettős mutánsa és a B" szabályozó alegység *fass-15* és *fass-5* mutánsok. A növényeket axénikus körülmények között módosított MS (Murashige and Skoog, 1962) táptalajon, kiegészítve Gamborg-vitaminokkal (1968), 2% (w/v) szacharózzal (Molar, Budapest, Magyarország) és 0,8% (w/v) Bacto-agarral (Difco, Lawrence, KS, USA) neveltük. A nevelés körülményei: 14/10 órás fotoperiódus, 22±2°C, 60 μmol/m²/s fotonfluxussűrűség a fényperiódusban.

A GFP fúziós fehérjét tartalmazó növények és a PIN valamint γH2AX immunjelölt növények vizsgálata konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával történt (CSLM).

Az össz-ROS kimutatást DCFH-DA jelölést követően konvencionális epifluorescens mikroszkóppal végeztük. A γH2AX fehérje mennyiség kvantitatív kimutatását western blot technikával végeztük. A SOD-ok enzimaktivitás méréseit nem denaturáló gélelektroforézissel végeztük Giannopolitis és Ries (1977), valamint

Bertrand és Eze (2014) által leírt módszerek adaptációja volt. A foszfatázok aktivitását pedig ^{32}P izotópos technikával mértük korábban leírtak szerint mértük (Erdődi *et al.*, 1995; Máthé *et al.*, 2013; Garda *et al.*, 2018)

A géleképek kiértékeléséhez a GelAnalyzer 19.1® szoftverrel ((www.gelanalyzer.com) Ifj. Lázár István, PhD id. Lázár István, PhD, CSc) történt. A mikroszkópos felvételek elkészítését és elemzését Zen Black 2.3, ZEN Blue 2.3 Lite és Fiji (ImageJ-Win64) szoftverekkel végeztük (Schindelin *et al.*, 2012)

A statisztikai elemzésekhez a Systat Sigma Plot 10.0/ 12.0 ® szoftvert (Systat Software, San Jose, CA), valamint az R Studio 1.2 és ggplot2 grafikus csomagot (Wickham, 2016) használtuk.



Nyilvántartási szám: DEENK/178/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Freytag Csongor
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10068160

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

1. **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: 5.437 (2021)
2. **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

További közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

3. Bódis, J., Takács, A., Óvári, M., Virók, V., Kulcsár, L., Magos, G., Sulyok, J., Nótári, K., Molnár, A., Barna, C., Kuczkó, A., Biró, É., Gerencsér, B., **Freytag, C.**, Budai, J., Molnár, V. Á.: Az év vadvirága 2016-ban: a mocsári kockásliliom (*Fritillaria meleagris*).
Kitaibelia. 25 (1), 79-100, 2020. ISSN: 1219-9672.
DOI: <http://dx.doi.org/10.17542/kit.25.79>





Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

4. Balogh, R., Matus, G., Lőkös, L., Adorján, B., **Freytag, C.**, Mészáros, I., Oláh, V., Szűcs, P., Erzberger, P., Farkas, E.: Cryptogamic communities on flatroofs in the city of Debrecen (East Hungary).
Biologia Futura. Epub, 1-15, 2023. ISSN: 2676-8615.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s42977-023-00166-3>
IF: 1.069 (2021)
5. Balogh, R., Buczkó, K., Erzberger, P., **Freytag, C.**, Homm, T., Lőkös, L., Matus, G., Nagy, Z., Papp, B., Farkas, E.: Taxonomical and chorological notes 15 (153-163).
Studia Bot. Hung. 52 (2), 165-184, 2021. ISSN: 0301-7001.
DOI: <http://dx.doi.org/10.17110/StudBot.2021.52.2.165>

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (9)

6. 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: 6.208 (2021)
7. Juhász, G. P., Kéki, S., Dékány-Adamoczy, A., **Freytag, C.**, Vasas, G., Máthé, C., Garda, T.: Microcystin-LR, a Cyanobacterial Toxin, Induces Changes in the Organization of Membrane Compartments in Arabidopsis.
Microorganisms. 11 (3), 1-13, 2023. EISSN: 2076-2607.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11030586>
IF: 4.926 (2021)
8. Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., Vasas, G., Garda, T., **Freytag, C.**: Subcellular Alterations Induced by Cyanotoxins in Vascular Plants: A Review.
Plants-Basel. 10 (5), 1-18, 2021. ISSN: 2223-7747.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants10050984>
IF: 4.658
9. Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., **Freytag, C.**, Garda, T.: The Protein Phosphatase PP2A Plays Multiple Roles in Plant Development by Regulation of Vesicle Traffic? Facts and Questions.
Int. J. Mol. Sci. 22 (2), 1-18, 2021. ISSN: 1661-6596.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22020975>
IF: 6.208
10. Máthé, C., Garda, T., **Freytag, C.**, Mikóné Hamvas, M.: The role of serine-threonine protein phosphatase PP2A in plant oxidative stress signaling: facts and hypotheses.
Int. J. Mol. Sci. 20 (12), 2019. ISSN: 1661-6596.
DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20123028>
IF: 4.556

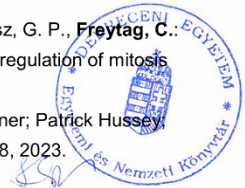




11. Garda, T., Kónya, Z., **Freytag, C.**, Erdődi, F., Gonda, S., Vasas, G., Szűcs, B., Mikóné Hamvas, M., Kiss-Szikszai, A., Vámosi, G., Máthé, C.: Allyl-isothiocyanate and microcystin-LR reveal the protein phosphatase mediated regulation of metaphase-anaphase transition in *Vicia faba*. *Front. Plant Sci.* 9, 1-15, 2018. EISSN: 1664-462X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01823>
IF: 4.106
12. Nagy, M., Kéki, S., Rác, D., Mathur, J., Vereb, G., Garda, T., Mikóné Hamvas, M., Chaumont, F., Bóka, K., Böddi, B., **Freytag, C.**, Vasas, G., Máthé, C.: Novel fluorochromes label tonoplast in living plant cells and reveal changes in vacuolar organization after treatment with protein phosphatase inhibitors. *Protoplasma.* 255 (3), 829-839, 2018. ISSN: 0033-183X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-017-1190-0>
IF: 2.633
13. Resetár, A., **Freytag, C.**, Kalydi, F., Gonda, S., Mikóné Hamvas, M., Ajtay, K., Papp, L., Máthé, C.: Production and antioxidant capacity of tissue cultures from four Amaryllidaceae species. *Acta Soc. Bot. Pol.* 86 (1), 1-12, 2017. ISSN: 0001-6977.
DOI: <https://doi.org/10.5586/asbp.3525>
IF: 0.876
14. **Freytag, C.**, Pabar, S., Demeter, Z., Simon, Á., Resetár, A., Molnár, V. A., Sramkó, G., Máthé, C.: Production and Characterization of Tissue Cultures of Four Crocus Species from the Carpathian Basin. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 59 (2), 31-39, 2017. ISSN: 0001-5296.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/abcsb-2017-0009>
IF: 0.8

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (5)

15. Mikóné Hamvas, M., **Freytag, C.**, Kondor, A., Nouar, A., Tótki, A., Molnár, V. A., Máthé, C.: Investigation of stems containing different types of fibres by using bright-field, polarized and conventional fluorescence microscopy.
In: Botanical Microscopy Meeting 2023 / Kim Findlay, Christine Faulkner; Patrick Hussey; Ulla Neumann; Richard Smith; Imogen Sparkes, RMS, Norwich, 79-80, 2023.
16. 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.





17. 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.
18. Máthé, C., Beyer, D., Kónya, Z., Garda, T., **Freytag, C.**, Erdődi, F.: Subcellular and developmental effects of serine-threonine protein phosphatase inhibition in higher plants.
In: VISCEA - International Conference Plant Physiology and Biochemistry : Programme and Abstracts : Vienna, Austria, July 9-10, 2018, Vienna International Science Conferences and Events Association (VISCEA), Bécs, 25, 2018.
19. Demeter, Z., Resetár, A., Simon, Á., **Freytag, C.**, Pabar, S., Beyer, D., Máthé, C.: The establishing of tissue cultures and plant regeneration from *Crocus heuffelianus* and *Crocus scepusiensis*.
In: European Researchers Day, [s.n.], Tokyo, 5, 2015.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 50,42

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az érkekezés alapjául szolgáló közleményekre): 14,38

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

Debrecen, 2023.05.30.



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

**PP2A protein-phosphatase regulates both auxin-
transport and oxidative stress responses in
Arabidopsis thaliana seedlings.**

by Csongor Freytag

Supervisor: Prof. Dr. Csaba Máthé



UNIVERSITY OF DEBRECEN

Juhász-Nagy Pál Doctoral School

Debrecen, 2023

Introduction

One of the characteristics of the life of plants is that they are unable to actively change their location themselves, so they must respond locally to all environmental changes. Life processes such as growth, cell division and differentiation are composed of various biochemical processes and their regulatory mechanisms and signaling pathways. Stimuli caused by external and internal changes gain meaning in signaling pathways and trigger reactions and changes in the biochemical processes.

The focus of my dissertation is on the role of protein phosphorylation in developmental processes related to auxin transport and distribution, in which the protein phosphatases PP2AC3 and C4 play an important role (Ballesteros *et al.*, 2013). Secondly, we studied dephosphorylation regulation in oxidative stress, where we know much less about the role of these two subunits and of Fass (B” regulatory) subunits (Durian *et al.*, 2020; Máthé *et al.*, 2023).

Microcystin- LR (MCY-LR) is an excellent tool for the simultaneous study of phosphatase inhibition and oxidative stress. MCY-LR is one of the most abundant cyanobacterial heptapeptide toxins, produced mainly by freshwater cyanobacteria. It strongly inhibits the protein phosphatases PP2A and PP1 (MacKintosh *et al.*, 1990). Furthermore, the ability to induce oxidative stress processes is considered an important feature of MCY-LR (Máthé *et al.*, 2019).

Aims of the study

In my dissertation, we investigated 2 aspects of plant life processes in *Arabidopsis thaliana* seedlings in addition to protein phosphatase activities. The first, PIN transmembrane protein, is responsible for the distribution of the plant hormone auxin, which regulates root growth. One form of auxin transport is polar transport, in which auxin moves from cell to cell along the longitudinal axis of plant. Auxin influx is primarily provided by AUX1/LAX permease, while PINs regulate efflux (Michniewicz *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2018). The function of the PIN protein family depends on its reversible phosphorylation and is crucial for plant ontogenesis (Zwiewka *et al.*, 2019).

The second aspect is the scavenging of reactive oxygen species (ROS) produced during stress and life processes. Superoxide dismutases (SODs) are the main scavengers of ROS and convert the superoxide anion substrate into hydrogen peroxide, a less toxic form of ROS. There are several isoforms of SOD according to their metal dependence. The isoenzymes of Fe-SOD are mainly localised in the chloroplasts, but also occur in the cytosol and nucleus. As far as roots are concerned, most of Fe-SOD is localised in the apical region, but it is present throughout the primary root system of young seedlings, where it contributes to the development of salt stress tolerance (Dvořák *et al.*, 2021). Mn-SOD is mainly localised in mitochondria and peroxisomes, but a putative

apoplastic form has also been identified in *Arabidopsis thaliana* roots (Chen *et al.*, 2022). Cu/Zn-SOD is mainly localised in plastids but also occurs in the cytosol (Kliebenstein *et al.*, 1998). Not much is known about their direct or indirect regulation by phosphorylation in plants.

Finally, we studied the phosphorylation level of histone protein H2AX, which typically indicates ROS -induced DNA double-strand breaks. H2AX is a variant of histone 2A in eukaryotes. Its carboxy-terminally phosphorylated form is termed γ H2AX and plays a role in initiating DNA double-strand repair (Fillingham *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006).

1. We aimed to explore the harmful effects of MCY-LR on the distribution of PIN and the auxin response in the roots of *Arabidopsis thaliana* and to investigate its effects on root development.
2. We wanted to gain new insights into the role of PP2A B" and C subunits in oxidative stress in plants. We also wanted to answer the following question: Does PP2A regulate the phosphorylation status of histone H2AX, the signalling molecule for double-stranded DNA breaks?

Results

First, root growth and lateral root development were studied in 3-5 day old seedlings of *Arabidopsis thaliana* (Columbia ecotype; Col-0).

Based on confocal laser scanning microscopy (CLSM) studies, we found that relatively short-term (24 h) MCY-LR treatments reduced PIN1, PIN2 and PIN7 levels but not PIN3 levels in primary root tips. In the young lateral roots, however, the levels of PIN1 and PIN2 increased and the level of PIN3 decreased. The intensities of the signals for PIN proteins also followed this trend in the lateral root primordia. After examining PINs, the question arose whether changes in the local amounts of PINs have an influence on auxin transport? DR5:GFP reporter activity showed that the decrease in cyanotoxin-induced auxin responses in the primary root tips was consistent with the amounts of PINs. In the phenotypic tests (growth, gravistimulation), we found that these changes did not affect the gravitropic response of the roots. Treatment with MCY-LR was able to restore the altered gravitropic response of *crk5-1* mutants (plants with protein kinase defect) and plays an essential role in the correct membrane localisation of PIN2. Moreover, in Col-0 plants treated with MCY-LR, primary root growth slowed down, and the number of primordia increased, while the number of young lateral roots was also reduced by the treatment.

Our next interest was focused on oxidative stress. This is because the serine-threonine protein phosphatases PP2A are involved in many cellular processes, but their role in oxidative stress responses and defence is less well understood. We selected additional phosphatase (PP2A) mutants for our studies. Mutants of the *c3c4* C subunit and the *fass* B'' subunit, as well as 5-day-old seedlings of *Arabidopsis thaliana* Col-0 were used. Our aim was to investigate the involvement of the C (catalytic) and B'' (regulatory) subunits in the generation and neutralisation of reactive oxygen species (ROS). In addition to the PP2A inhibitor microcystin- LR (MCY-LR), we also used another agent that can directly induce ROS, diquat (DQ).

Measurements of all ROS in the roots of Col-0 and phosphatase mutants were made using a fluorescent microscopic technique, dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) labelling. Concentrations of ROS in primary roots were strongly genotype-dependent, and both C and B'' subunit mutants showed increased sensitivity to the treatments, suggesting that these subunits are involved in the induction of oxidative stress. ROS scavenging was measured indirectly by determining superoxide dismutase (SOD) activity. The activity of the SOD isoforms, mainly Cu/Zn SOD and to a lesser extent Fe1- SOD, has been found to change, showing mostly increased activity, mainly in *fass* mutants, and they also showed increased sensitivity to treatments. Western blot studies with untreated and treated B'' mutants have shown that this subunit

regulates the level of phosphorylation of H2AX, a histone variant. The phosphorylation state of H2AX, which correlates with oxidative stress responses, is not directly dependent on changes in the activity of the catalytic subunits of PP2A, but the B" regulatory subunits are able to influence the level of γ H2AX. In *Arabidopsis thaliana*, C3 and C4 (and PP2A activity provided by other catalytic subunits) appear to play a smaller direct role in the dephosphorylation of γ H2AX than other events associated with B" subunits.

The involvement of the B" subunit in the above processes depends not only on its presence or absence, but also on their amount/activity in the PP2A holoenzyme, as shown by comparing the homozygous-recessive and heterozygous genotypes of the *fass-5* and *fass-15* mutants from this point of view. The toxicological aspect of our results: although many studies show that MCY-LR induces oxidative stress by mechanisms independent of its inhibitory effect on protein phosphatase, we have shown that it also induces oxidative stress by modulating PP2A in both wild-type plants and the B/C subunit in mutants. In this context, many of the effects of MCY-LR studied here differ from those of DQ, which is a ROS inducer and whose ROS induction mechanisms are at least partially independent of PP2A. Given the partially different effects of MCY-LR and DQ, the induction and responses to oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* are not entirely dependent on PP2A.

In summary, inhibition of protein phosphatase activity altered PIN distribution and auxin response, thus altering root development. Furthermore, we point to the likely key role of PP2A in the regulation of oxidative stress responses in plants and pave the way for future research that may reveal the signaling pathways involved.

Overall, the main, scientifically novel findings of this work are as follows:

1. In primary root tips, the treatments with MCY-LR decreased PIN1, PIN2 and PIN7 levels, but not PIN3 levels. In the young lateral roots, the levels of PIN1 and PIN2 increased and the level of PIN3 decreased. The signal intensities of the PIN proteins also followed this trend in the lateral root primordia.
2. DR5:GFP reporter activity showed that the decrease in cyanotoxin-induced auxin levels/responses in the primary root tips varied in parallel with the PIN levels
3. MCY-LR treatment was able to restore the altered gravitropic response of *crk5-1* mutants (protein kinase-defective plants).
4. Both the C (catalytic C3 and C4) and B" (regulatory) subunits of PP2A are involved in the regulation of oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. Both subunit 'B" and subunit 'C' mutants have different ROS levels compared to Col-0, both in untreated plants and in response to MCY-LR /DQ treatments.

5. The B" subunit plays a role in regulating SOD activities (mainly Cu/Zn SOD and to a lesser extent Fe1-SOD) involved in defence responses against oxidative stress. Relevant evidence:
- a. The relatively low ROS values in the *c3c4* untreated plants are inversely proportional to the relatively high Fe1- SOD and Cu/Zn-SOD activities. This suggests that the isoforms of the C3 and C4 catalytic subunits of PP2A influence the protective responses to oxidative stress.
 - b. Our results with *fass-5* and *fass-15* mutants show that the FASS protein as regulatory subunit B" indeed regulates oxidative stress and ROS neutralisation and that this is related to phosphorylation of histone H2AX. However, the MCY-LR and DQ treatments show that this relationship is complex, and several aspects require further investigation. It should be noted that the functionality of the regulatory subunit 'B" has a complex effect on PP2A activity (i.e. the absence of a functional protein does not mean that PP2A/C activity is inhibited) and also affects other protein phosphatases (e.g. PP1).
6. The involvement of the 'B' subunit in the above processes depends not only on its presence or absence, but also on the amount/activity of PP2A relative to the holoenzyme - as shown by comparing the homozygous recessive and heterozygous genotypes of the *fass-5* and *fass-15* mutants in this regard.

7. Our results also have toxicological implications. Although several studies have shown that MCY-LR induces oxidative stress by mechanisms independent of the phosphatase inhibitory effect of the protein, we have shown that it induces oxidative stress by modulating PP2A in both wild-type plants and B"/C subunit mutants. In this context, many of the effects of MCY-LR studied here differ from those of DQ, which induces ROS and whose ROS induction mechanisms are at least partially independent of PP2A.
8. Given the partially divergent effects of MCY-LR and DQ, the induction and responses to oxidative stress in Arabidopsis are not entirely dependent on PP2A.
9. It appears that the phosphorylation state of H2AX, which correlates with oxidative stress responses, is not directly dependent on modulations in the activity of the catalytic subunits of PP2A, but that regulatory subunit " B" modulates γ H2AX levels. Thus, in Arabidopsis, PP2A activity conferred by catalytic subunits C3 and C4 (and others) appears to play less of a direct role in γ H2AX dephosphorylation than other events associated with the B" subunits.

Material and methods

Our studies were performed in *Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype and its mutants, PIN1:PIN1-GFP, PIN2:PIN2-GFP and PIN3:PIN3-GFP in Col-0 background (Benková *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006; Žádníková *et al.*, 2010), DR5rev:GFP fusion construct (Friml *et al.*, 2003b; Žádníková *et al.*, 2010), and in the *crk5-1* loss-of-function mutant (Rigó *et al.*, 2013). Protein phosphatase (PP2A) mutants described by Camilleri *et al.* (2002), Kirik *et al.* (2012a) and Spinner *et al.* (2013) used in this work were *c3c4*, a double mutant of the catalytic subunit and regulatory subunit B" *fass-15* and *fass-5* mutants.

Plants were grown under axenic conditions on modified MS (Murashige and Skoog, 1962) medium supplemented with Gamborg vitamins (1968), 2% (w/v) sucrose (Molar, Budapest, Hungary) and 0.8% (w/v) Bacto agar (Difco, Lawrence, KS, USA). Growth conditions: 14/10 h photoperiod, 22±2°C, 60 μmol/m²/s photon flux density in the photoperiod.

GFP fusion protein-containing plants and PIN and γH2AX immunolabelled plants were examined by confocal laser scanning microscopy (CSLM).

DCFH-DA signals from ROS were detected by conventional epifluorescence microscopy. Quantitative detection of γH2AX protein was performed using the western blot technique. SODs enzyme activity was measured by non-denaturing gel electrophoresis using methods

adopted from Giannopolitis and Ries (1977) and Bertrand and Eze (2014). Phosphatase activity was measured using the ^{32}P isotope technique as previously described (Garda *et al.*, 2018; Máthé *et al.*, 2013)

For the evaluation of gel images, GelAnalyzer 19.1® software ((www.gelanalyzer.com) Ifj. István Lázár, PhD id. István Lázár, PhD, CSc) was performed. Microscopic sections were prepared and analysed using Zen Black 2.3, ZEN Blue 2.3 Lite and Fiji (ImageJ-Win64) software (Schindelin *et al.*, 2012).

Statistical analyses were performed using Systat Sigma Plot 10.0/12.0 ® software (Systat Software, San Jose, CA) and R Studio 1.2 and ggplot2 graphics package (Wickham, 2016).

Irodalomjegyzék/References

Barbosa, I.C.R., Hammes, U.Z. and Schwechheimer, C. (2018) 'Activation and Polarity Control of PIN-FORMED Auxin Transporters by Phosphorylation', *Trends in Plant Science*, 23(6), pp. 523–538. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.03.009>.

Benková, E. *et al.* (2003) 'Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation', *Cell*, 115(5), pp. 591–602.

Bertrand, R.L. and Eze, M.O. (2014) 'Modifying Polyacrylamide Background Color for the Nitroblue Tetrazolium-Based Superoxide Dismutase Staining Assay', *Advances in Enzyme Research*, 02(02), pp. 77–81. Available at: <https://doi.org/10.4236/aer.2014.22008>.

Camilleri, C. *et al.* (2002) 'The Arabidopsis TONNEAU2 Gene Encodes a Putative Novel Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit Essential for the Control of the Cortical Cytoskeleton', *The Plant Cell*, 14(4), pp. 833–845. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.010402>.

Chen, H. *et al.* (2022) 'MSD2, an apoplasmic Mn-SOD, contributes to root skotomorphogenic growth by modulating ROS distribution in Arabidopsis', *Plant Science*, 317, p. 111192. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111192>.

Dvořák, P. *et al.* (2021) 'In vivo light-sheet microscopy resolves localisation patterns of FSD1, a superoxide dismutase with function in root development and osmoprotection', *Plant, Cell & Environment*, 44(1), pp. 68–87. Available at: <https://doi.org/10.1111/pce.13894>.

Erdődi, F. *et al.* (1995) 'Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 269(5), pp. C1176–C1184. Available at: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.5.C1176>.

Fillingham, J., Keogh, M.-C. and Krogan, N.J. (2006) ‘ γ H2AX and its role in DNA double-strand break repair This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 27th International West Coast Chromatin and Chromosome Conference, and has undergone the Journal’s usual peer review process.’, *Biochemistry and Cell Biology*, 84(4), pp. 568–577. Available at: <https://doi.org/10.1139/o06-072>.

Friml, J. *et al.* (2003) ‘Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of Arabidopsis’, *Nature*, 426(6963), pp. 147–153. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature02085>.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968) ‘Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells’, *Experimental Cell Research*, 50(1), pp. 151–158.

Garda, T. *et al.* (2018) ‘Allyl-Isothiocyanate and Microcystin-LR Reveal the Protein Phosphatase Mediated Regulation of Metaphase-Anaphase Transition in *Vicia faba*’, *Frontiers in Plant Science*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01823>.

Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977) ‘Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants’, *PLANT PHYSIOLOGY*, 59(2), pp. 309–314. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>.

Kirik, A., Ehrhardt, D.W. and Kirik, V. (2012) ‘TONNEAU2/FASS Regulates the Geometry of Microtubule Nucleation and Cortical Array Organization in Interphase Arabidopsis Cells’, *The Plant Cell*, 24(3), pp. 1158–1170. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.111.094367>.

Kliebenstein, D.J., Monde, R.-A. and Last, R.L. (1998) ‘Superoxide Dismutase in Arabidopsis: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization’, *Plant Physiology*, 118(2), pp. 637–650. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.637>.

MacKintosh, C. *et al.* (1990) ‘Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants’, *FEBS letters*, 264(2), pp. 187–192.

Máthé, C. *et al.* (2019) ‘The Role of Serine-Threonine Protein Phosphatase PP2A in Plant Oxidative Stress Signaling—Facts and Hypotheses’, *Int. J. Mol. Sci.*, p. 18.

Máthé, C., M-Hamvas, M. and Vasas, G. (2013) ‘Microcystin-LR and cylindrospermopsin induced alterations in chromatin organization of plant cells’, *Marine Drugs*, 11(10), pp. 3689–3717. Available at: <https://doi.org/10.3390/md11103689>.

Michniewicz, M., Brewer, P.B. and Friml, J. (2007) ‘Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution’, *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 5. Available at: <https://doi.org/10.1199/tab.0108>.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) ‘A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures’, *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473–497. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Rigó, G. *et al.* (2013) ‘Inactivation of Plasma Membrane-Localized CDPK-RELATED KINASE5 Decelerates PIN2 Exocytosis and Root Gravitropic Response in *Arabidopsis*’, *The Plant Cell*, 25(5), pp. 1592–1608. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.113.110452>.

Schindelin, J. *et al.* (2012) ‘Fiji: an open-source platform for biological-image analysis’, *Nature Methods*, 9(7), pp. 676–682. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

Spinner, L. *et al.* (2013) ‘A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division’, *Nature Communications*, 4, p. 1863. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms2831>.

Tanaka, T. *et al.* (2006) ‘Constitutive Histone H2AX Phosphorylation and ATM Activation, the Reporters of DNA Damage by Endogenous Oxidants’, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(17), pp. 1940–1945.

Wickham, H. (2016) *ggplot2*. Cham: Springer International Publishing (Use R!). Available at: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>.

Xu, J. *et al.* (2006) ‘A Molecular Framework for Plant Regeneration’, *Science*, 311(5759), pp. 385–388. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1121790>.

Žádníková, P. *et al.* (2010) ‘Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*’, *Development*, 137(4), pp. 607–617. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.041277>.

Zwiewka, M. *et al.* (2019) ‘The Nuts and Bolts of PIN Auxin Efflux Carriers’, *Frontiers in Plant Science*, 10, p. 985. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00985>.



Registry number: DEENK/178/2023.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Csongor Freytag

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

MTMT ID: 10068160

List of publications related to the dissertation

Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **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: 5.437 (2021)
2. **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

List of other publications

Hungarian scientific articles in Hungarian journals (1)

3. Bódis, J., Takács, A., Óvári, M., Virók, V., Kulcsár, L., Magos, G., Sulyok, J., Nótári, K., Molnár, A., Barna, C., Kuczkó, A., Biró, É., Gerencsér, B., **Freytag, C.**, Budai, J., Molnár, V. Á.: Az év vadvirága 2016-ban: a mocsári kockásliliom (*Fritillaria meleagris*).
Kitaibelia. 25 (1), 79-100, 2020. ISSN: 1219-9672.
DOI: <http://dx.doi.org/10.17542/kit.25.79>





Foreign language scientific articles in Hungarian journals (2)

4. Balogh, R., Matus, G., Lőkös, L., Adorján, B., **Freytag, C.**, Mészáros, I., Oláh, V., Szűcs, P., Erzberger, P., Farkas, E.: Cryptogamic communities on flatroofs in the city of Debrecen (East Hungary).

Biologia Futura. Epub, 1-15, 2023. ISSN: 2676-8615.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s42977-023-00166-3>

IF: 1.069 (2021)

5. Balogh, R., Buczkó, K., Erzberger, P., **Freytag, C.**, Homm, T., Lőkös, L., Matus, G., Nagy, Z., Papp, B., Farkas, E.: Taxonomical and chorological notes 15 (153-163).

Studia Bot. Hung. 52 (2), 165-184, 2021. ISSN: 0301-7001.

DOI: <http://dx.doi.org/10.17110/StudBot.2021.52.2.165>

Foreign language scientific articles in international journals (9)

6. 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: 6.208 (2021)

7. Juhász, G. P., Kéki, S., Dékány-Adamoczy, A., **Freytag, C.**, Vasas, G., Máthé, C., Garda, T.: Microcystin-LR, a Cyanobacterial Toxin, Induces Changes in the Organization of Membrane Compartments in Arabidopsis.

Microorganisms. 11 (3), 1-13, 2023. EISSN: 2076-2607.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11030586>

IF: 4.926 (2021)

8. Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., Vasas, G., Garda, T., **Freytag, C.**: Subcellular Alterations Induced by Cyanotoxins in Vascular Plants: A Review.

Plants-Basel. 10 (5), 1-18, 2021. ISSN: 2223-7747.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/plants10050984>

IF: 4.658

9. Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., **Freytag, C.**, Garda, T.: The Protein Phosphatase PP2A Plays Multiple Roles in Plant Development by Regulation of Vesicle Traffic? Facts and Questions.

Int. J. Mol. Sci. 22 (2), 1-18, 2021. ISSN: 1661-6596.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22020975>

IF: 6.208

10. Máthé, C., Garda, T., **Freytag, C.**, Mikóné Hamvas, M.: The role of serine-threonine protein phosphatase PP2A in plant oxidative stress signaling: facts and hypotheses.

Int. J. Mol. Sci. 20 (12), 2019. ISSN: 1661-6596.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20123028>

IF: 4.556

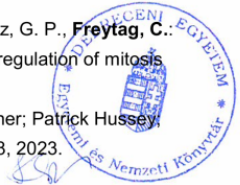




11. Garda, T., Kónya, Z., **Freytag, C.**, Erdódi, F., Gonda, S., Vasas, G., Szücs, B., Mikóné Hamvas, M., Kiss-Szikszai, A., Vámosi, G., Máthé, C.: Allyl-isothiocyanate and microcystin-LR reveal the protein phosphatase mediated regulation of metaphase-anaphase transition in *Vicia faba*. *Front. Plant Sci.* 9, 1-15, 2018. EISSN: 1664-462X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01823>
IF: 4.106
12. Nagy, M., Kéki, S., Rác, D., Mathur, J., Vereb, G., Garda, T., Mikóné Hamvas, M., Chaumont, F., Bóka, K., Böddi, B., **Freytag, C.**, Vasas, G., Máthé, C.: Novel fluorochromes label tonoplast in living plant cells and reveal changes in vacuolar organization after treatment with protein phosphatase inhibitors. *Protoplasma.* 255 (3), 829-839, 2018. ISSN: 0033-183X.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-017-1190-0>
IF: 2.633
13. Resetár, A., **Freytag, C.**, Kalydi, F., Gonda, S., Mikóné Hamvas, M., Ajtay, K., Papp, L., Máthé, C.: Production and antioxidant capacity of tissue cultures from four Amaryllidaceae species. *Acta Soc. Bot. Pol.* 86 (1), 1-12, 2017. ISSN: 0001-6977.
DOI: <https://doi.org/10.5586/asbp.3525>
IF: 0.876
14. **Freytag, C.**, Pabar, S., Demeter, Z., Simon, Á., Resetár, A., Molnár, V. A., Sramkó, G., Máthé, C.: Production and Characterization of Tissue Cultures of Four Crocus Species from the Carpathian Basin. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 59 (2), 31-39, 2017. ISSN: 0001-5296.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/abcsb-2017-0009>
IF: 0.8

Foreign language abstracts (5)

15. Mikóné Hamvas, M., **Freytag, C.**, Kondor, A., Nouar, A., Tóti, A., Molnár, V. A., Máthé, C.: Investigation of stems containing different types of fibres by using bright-field, polarized and conventional fluorescence microscopy.
In: Botanical Microscopy Meeting 2023 / Kim Findlay, Christine Faulkner; Patrick Hussey; Ulla Neumann; Richard Smith; Imogen Sparkes, RMS, Norwich, 79-80, 2023.
16. 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.





17. 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.
18. Máthé, C., Beyer, D., Kónya, Z., Garda, T., **Freytag, C.**, Erdődi, F.: Subcellular and
developmental effects of serine-threonine protein phosphatase inhibition in higher plants.
In: VISCEA - International Conference Plant Physiology and Biochemistry : Programme and
Abstracts : Vienna, Austria, July 9-10, 2018, Vienna International Science Conferences and
Events Association (VISCEA), Bécs, 25, 2018.
19. Demeter, Z., Resetár, A., Simon, Á., **Freytag, C.**, Pabar, S., Beyer, D., Máthé, C.: The
establishing of tissue cultures and plant regeneration from *Crocus heuffelianus* and *Crocus
scepusiensis*.
In: European Researchers Day, [s.n.], Tokyo, 5, 2015.

Total IF of journals (all publications): 50,42

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 14,38

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

30 May, 2023

