

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Az osztódó növényi sejtek szubcelluláris folyamatainak  
vizsgálata cianotoxinokkal**

**Garda Tamás**

**Témavezető: Dr. Máthé Csaba  
Egyetemi Docens**



Debreceni Egyetem  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2017

## 1. Bevezetés

Napjainkban igen komoly környezeti problémát okoznak a felszíni vizekben létrejövő cianobakteriális vízvirágzások. A vízvirágzásokat a feldúsult szerves anyag mennyiség következtében elszaporodott cianobaktériumok okozzák. A cianobaktériumok az egész élővilágban elterjedt fotoszintetizáló prokarióta szervezetek. A vízvirágzás főleg nyáron figyelhető, meg amikor is hosszabb ideig van meleg és napos időjárás (Carmichael, 1992; Walker, 2014). Hazai vízvirágzást eddig a cianobaktériumok néhány faja eredményezett, mint például *Anabaena spiroides*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis* sp. és az *Aphanizomenon flos-aquae* (Vasas és mtsai., 2004). Maguk a cianobakteriális toxinok a vízvirágzások alkalmával dúsulnak fel a felszíni vizekben. Az elmúlt néhány évtizedben széles körben elterjedt az a felismerés, hogy az eutrofizáció miatt megjelenő cianobakteriális toxinok számos egészségügyi és ökológiai kockázatot jelentenek (Carmichael, 1992; Walker, 2014). Ezen fotoszintetizáló szervezetek által termelt metabolitok igen széles skálája ismeretes és nem ritka, hogy ezek a metabolitok hatással vannak az élőlényekre. Mindazonáltal a természetes funkciójuk nem teljesen világos. Jelen tanulmányban két cianobakteriális toxin hatásait és azok biokémiai hátterét vizsgáltuk *Vicia faba* csíranövényekben. Az egyik cianobakteriális toxin az alkaloid típusú cilindrospermopszin (CYN) a másik pedig a heptapeptid típusú mikrocisztin-LR (MCY-LR) (Kankaanpää és mtsai, 2002; Chen és Xie, 2005). A mikrocisztin-LR egy 7 aminosavból felépülő ciklikus heptapeptid, amely magába foglal három D-aminosavat, két variábilis L-aminosavat és két további aminosavat (N-metildehidroalanin (MDHA), 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoát (ADDA)) (Botes és mtsai, 1985). A mikrocisztineket számos cianobaktérium nemzetség termeli, mint például *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* és *Nostoc* nemzetségek (Wiegand és mtsai, 2005). A MCY-LR gátolja az 1 és 2A típusú

szerin/treonin protein foszfatázokat, amely a sejtek protein foszforilációs/defoszforilációs egyensúlyának a felborulásához vezet, illetve oxidatív stresszt is indukál. A protein foszfatáz gátló hatását illetve a ROS indukciót kimutatták növényi és állati sejtekben egyaránt (Pflugmacher, 2002; Gácsi és mtsai, 2009, Campos and Vasconcelos, 2010; Jiang és mtsai, 2011). A MCY-LR által indukált mitotikus orsó rendellenességek tisztázatlanok mind állati mind növényi sejtekben, ennek tisztázása közelebb juttat minket a MCY-LR toxicitásának megértéséhez. A CYN egy hidroximetiluracil csoportot tartalmazó triciklikus guanidin származék, a molekulatömege 416 Da, amelyet főként az *Aphanizomenon* és *Cylindrospermopsis* genuszba tartozó törzsek termelnek. Emlősökben a CYN elsősorban a májra hat, de káros hatása érvényesül a timuszban, a lépben, a szívben és a vesében is (Runnegar és Lu, 1994; Runnegar és mtsai, 1995; Azevedo és mtsai, 2002). Gácsi és mtsai (2009) megfigyelték a mikrofilamentumoknak és a mikrotubulusoknak CYN hatására bekövetkező dezorganizációját az állati sejtekben. A CYN továbbá a fehérjeszintézist is gátolja az eukarióta szervezetekben, bár a pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert (Froschio és mtsai 2008).

## **2. Célkitűzések:**

- 1, Célunk volt, hogy felfedjük a MCY-LR által indukált osztódási orsó rendellenességek összes típusát.
- 2, Továbbá célunk volt annak feltárása, hogy a MCY-LR által indukált protein foszfatáz gátlás vagy a ROS indukció az elsődleges oka a rendellenes mikrotubuláris struktúrák kialakulásának.
- 3, A CYN növekedésre és fejlődésre kifejtett hatásának vizsgálata *V. faba* csíranövényeken.
- 4, A CYN osztódó sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata különös tekintettel az osztódás során kialakuló mikrotubuláris struktúrákra illetve a nem osztódó sejtek kromatin állományára.

5, Célunk volt még a CYN rövidtávú hatásának vizsgálata a mitózisra illetve a fehérje szintézis gátlásra.

### **3. Anyag és módszer**

#### **3.1. A cilindropermopszin és a mikrocisztin-LR tisztítása**

A kísérletekhez felhasznált CYN-t Vasas Gábor és munkatársai tisztították *Aphanizomenon ovalisporum* törzsből (ILC-164) (Vasas és mtsai 2002). A cianobaktériumok összegyűjtése után a sejtek feltárása és extrahálása következett. Az extraktumot méretkizárásos kromatográfia (Toyopearl HW-40; 80 x 3 cm oszlop) segítségével frakcionálták. A végső tisztítást szemipreparatív C-18-as HPLC oszlopon végezték el.

A MCY-LR tisztítását Kós és mtsai, (1995) módosított módszere alapján végezték Vasas Gábor és munkatársai *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 jelű cianobaktérium törzs tenyészetéből. A sejtek centrifugálással történő összegyűjtése után a sejtek feltárása következett. A cianotoxin végső tisztítását DEAE Cellulóz-52 oszlopon végezték el. A MCY-LR-t tartalmazó eluátumokat Toyopearl méretkizárásos kromatográfiával tisztították meg a további szennyezőktől. Mindkét toxin esetében a preparátumok tisztaságát HPLC és kapillaris elektroforézis módszerekkel ellenőrizték.

#### **3.2. Terepi mintavétel**

A terepi minták analízise során felhasznált minták a Gyulán található Bárdos-tóból származtak, amelyeket Vasas Gábor és munkatársai bocsátottak rendelkezésünkre. A mintavétel 2012. szeptember 3.-án történt, amely során a vízvirágzás helyszínéről illetve egy attól távolabb eső kontroll helyszínről történt a *Ceratophyllum submersum* növények begyűjtése.

### 3.3. A *V. faba* csíranövények nevelése, és toxinkezelés

Kísérleteink során három *V. faba* fajtát használtunk (*Standard* és *ARC Egypt Cross* a CYN kezelések során és *Lippói* a MCY-LR kezelések során). A kísérletek előtt a magvakat felületi sterilizálásnak vetettük alá. A magvakat agarral szilárdított táptalajon neveltük. Két táptalajt alkalmaztunk, az egyik a Gamborg vitaminjait és 2 % szacharózt tartalmazó Murashige Skoog (MS\*) táptalaj (Murashige és Skoog, 1962; Gamborg és mtsai, 1968), a másik az Allen táptalaj (Allen, 1968) volt. Az első oldalgyökér kezdemények megjelenése után adagoltuk a táptalajhoz a cianotoxinokat, a kontroll mellett 0,01-20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  koncentrációtartományban. A toxinkezelés időtartama 1, 2, 3 és 6 nap volt.

### 3.4. A kísérletek során használt módszerek

A CYN növekedésre gyakorolt hatását az epikotil és a főgyökér hosszának mérésével valamint az oldalgyökerek számának változásával határoztuk meg a kontrollhoz viszonyítva. Minden paramétert a CYN kezelés kezdetén és végén mértük.

A szövettani, kromatin szerkezet és a mikrotubuláris citoskeleton vizsgálatához paraformaldehiddel (PFA) fixált oldalgyökereket használtunk, amelyekből Leica Histolslide mikrotómmal hossz-, illetve keresztmetszeteket készítettünk. A kromatin jelölését DAPI festéssel, a hiszton H3 (p-H3 Ser10) jelöléseket anti-foszfo-Hiszton H3 ellenanyaggal és Alexa 488 másodlagos ellenanyaggal, a mikrotubulusok jelölését pedig Cy3-mal konjugált anti- $\beta$ -tubulinnal végeztük. A gyökércsúcsok ROS szintjének meghatározásához 2',7'-diklorofluorescein-diacetátot (DCFH-DA) használtunk Guo és mtsai (2008) módszere alapján. A rövidtávú szinkronkísérletek és az in vivo DNS szintézis vizsgálata során a toxin hozzáadása előtt az oldalgyökér merisztéma sejteket hidroxürea (HU) oldattal szinkronizáltuk. A szinkronkísérletek és a DNS szintézis vizsgálata során 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN-t használtunk. Az oldalgyökér csúcsokat 5-BrdU oldatban inkubáltuk majd pedig

Alexa 546 antitesttel tettük láthatóvá az S fázisban lévő sejteket. A mikroszkópos vizsgálatok során Zeiss LSM 510 mikroszkópot (gerjesztési hullámhossz: 351/364 nm: DAPI, 543 nm: Cy3 és 488 nm: Alexa 488), illetve Olympus Provis AX-70 mikroszkópot használtunk (gerjesztési hullámhossz: 320-360 nm: DAPI, 540-580 nm: Cy3 illetve Alexa 546, 450-480 nm: Alexa 488 és 450-480 nm: DCFH-DA).

Az *in vitro* DNS szintézis vizsgálatok során PCR és qPCR technikát használtunk. A PCR reakciókat Riba Milánnal, míg a qPCR reakciókat Simon Ádámmal együtt végeztük el. A PCR és qPCR vizsgálataink során a 16S rRNS géne specifikus primerek segítségével amplifikáltuk a gén egy körülbelül 1100 bp. hosszú szakaszát (359. bázistól a 1492. bázisig). Forward primerként a CYA359F (GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG) (Nübel és mtsai., 1997) cianobaktériumokra specifikus primert használtuk, míg a reverse primer a 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG AC) (Lane, 1991) volt.

Az enzimatiskus antioxidáns (peroxidáz és kataláz) aktivitásokat 7,5%-os natív poliakrilamid gélelektroforézissel határoztuk meg Schlereth és mtsai (2000) módszere alapján. A pirogallol peroxidáz gélek detektálásához 20 mM pirogallolt és 5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t használtunk amely oxidációs terméke barnás sávként jelentkezett a gélen. A kataláz izoenzimek detektálását Weydert and Cullen (2010) módszere alapján végeztük el. A festés során 0,76 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] és 1,5 mM FeCl<sub>3</sub> oldatban inkubáltuk a gélét. A kataláz aktivitás a sötét háttéren megjelenő világos sávok formájában volt detektálható.

A kromoszómapreparátumok készítése során a gyökércsúcsokat 0,1%-os kolchicin (Sigma-Aldrich) oldattal kezeltük, majd fixáltuk 45% ecetsavban. Ezt követően a gyökereket 60°C-on hidrolizáltuk 1N sósavban. A kromoszómákat 5%-os kármin-acetáttal festettük 60°C-on, majd dörzspreparátumokat készítettünk és Olympus Provis AX-70 mikroszkópon vizsgáltuk.

## 4. Eredmények

A MCY-LR nagyszámú osztódási orsó rendellenességet indukált idő- és dózisfüggő módon a *V. faba* merisztéma sejtekben. 1 napos kezelések hatására nem tapasztaltunk a toxin hatására kialakuló osztódási orsó rendellenességet. 2 napos kezelések hatására 7 típusú (szétesett orsó, tripoláris/multipoláris orsó, monopoláris orsó, hiányos orsó, C-alakú orsó, S-alakú orsó, aszimmetrikus orsó), míg a 6 napos kezelések hatására 11 (szétesett orsó, további poláris mikrotubulus kötegek, tripoláris/multipoláris orsó, multipoláris orsók kinetokor mikrotubulusainak túlzott kötegelése, monopoláris orsó, hiányos orsó, C-alakú orsó, S-alakú orsó, további orsó a sejtben, egyenlítői kinetokor mikrotubulus kötegek, aszimmetrikus orsó) típusú osztódási orsó rendellenességet figyeltünk meg, amelyek kontrollhoz viszonyított százalékos aránya a  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR kezelés hatására volt a legmagasabb. Sőt ez a toxin sokkal változatosabb osztódási orsó rendellenességeket indukált, mint más ismert protein foszfatáz gátlók. 1 napos kezelések hatására szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a teljes PP1 és PP2A aktivitásban nagyobb, mint  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  toxin koncentrációban. 2 illetve 6 napos kezelések során a cianotoxin már  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  koncentrációban szignifikánsan gátolta a teljes PP1 és PP2A aktivitást. Megállapíthatjuk, hogy minden osztódási orsó rendellenesség -amelyek 2 és 6 napos kezelések után megjelentek, de 24 órás kezelések után nem- a hosszú távú MCY-LR kezelés által indukált protein foszfatáz gátlással hozható kapcsolatba: a cianotoxin rövid (24 h) és hosszú távon (48 h és 6 nap) egyaránt gátolta a PP1 és a PP2A aktivitást. A *V. faba* antioxidáns enzim aktivitásának vizsgálata során megfigyeltük a peroxidáz és kataláz enzimek szignifikáns növekedését MCY-LR kezelések hatására, ugyanakkor ROS felhalmozódását nem figyeltük meg. Ez általánosan elmondható az összes kezelési időtartamra (1, 2 és 6 nap). Így a *V. faba* egy jó modellnövény a MCY-LR által kiváltott protein foszfatáz gátlás és a mitotikus mikrotubulusok zavara közötti

kapcsolat tanulmányozására, mivel a cianotoxin ROS indukáló hatása nem érvényesül ebben a rendszerben. A MCY-LR által indukált egyes mitotikus orsó rendellenességet elsőként publikáltuk, mint például az osztódási orsóban kialakuló további poláris mikrotubulus kötegek, az egyenlítői mikrotubulusok túlzott kötegelését, a hiányos osztódási orsót, a C- és S-alakú orsókat és az osztódási orsó mellett kialakuló további mikrotubuláris (orsó) struktúrát. A mi véleményünk szerint a MCY-LR egy hatékony eszköz lehet a mitotikus orsó összeszerelődszabályozásának megértésében. Eredményeink új betekintést nyújtanak a protein foszfatázok szubcelluláris folyamatokban betöltött szerepébe a növényi sejtekben és általánosan az eukariótákban. Természetes körülmények között MCY-LR tartalmú cianobaktérium tömegnek kitett *Ceratophyllum submersum* populáció vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a MCY-LR képes olyan mértékben felhalmozódni a felszíni vizekben, amely komoly elváltozásokat tud indukálni az érintett terület növényvilágában mind szöveti mind pedig sejtszinten. Szöveti elváltozások közé tartozik például a nekrozis indukálása, az oldalrügyek korai kialakulása, illetve a hajtás rövidülése. Sejtszinten megfigyelhető volt a DNS degradációja a nekrotikus szövetekben, illetve a hiszton H3-nak a Ser10 pozícióban (pH3-Ser10) történő hiperfoszforilációja a metafázisos sejtekben.

A CYN növekedésre gyakorolt hatását szintén *V. faba* csíranövényeken vizsgáltuk. *V. faba* csíranövények esetében folyamatos megvilágítás mellett detektáltuk a CYN növekedésre gyakorolt átmeneti serkentő hatását különösen a gyökér növekedése során 6 napos kezeléseknél  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  toxin koncentráció mellett. Ez a tendencia mindkét általunk használt fajtában (Standard és ARC Egypt Cross) megfigyelhető volt. A CYN kiváltotta növekedés serkentés egyfajta stresszválasznak is tekinthető, mivel a növény vagy szerv (gyökér) növeli a biomassza tömegét a CYN detoxifikációs kapacitásának növelése érdekében (Kinneer és mtsai, 2008; Beyrer és mtsai, 2009). A CYN növekedésre gyakorolt hatása függ a megvilágítástól, a kezelés időtartamától és a használt *V. faba*

fajtától is. 6 napos kezelések során sokkal intenzívebb és hangsúlyosabb növekedésre gyakorolt hatást detektáltunk, mint 3 napos kezelések során. A sötétben nevelt növények esetén a CYN növekedés serkentő hatása nem volt megfigyelhető az epikotilon és a főgyökéren a „Standard” fajta esetében.

A nekrotikus sejthalált számos biotikus és abiotikus stressz faktor indukálhatja. *V. faba* esetében a nekrotikus mintázat kialakulása dóziszfüggő volt. Alacsonyabb CYN koncentrációban ( $0.1-5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) nekrotikus foltok voltak jellemzőek a gyökérkéregben. Magasabb CYN koncentrációk esetében ( $10-20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) két folyamatos nekrotikus gyűrű volt jellemző, az egyik a kortexben, a másik pedig a rizodermiszben. A gyökér szöveteiben kialakuló nekrotikus foltok és gyűrűk valószínűleg az általános stresszválasz részei a *V. faba* detoxifikációja során, hogy elkerülje a toxin bejutását a közvetlenül a toxinnal nem érintkező szövetekbe (szállítószövet). Ezek a változások nem sorolhatóak a CYN specifikus hatásai közé, mivel sokféle stressz által indukálhatóak.

CYN hatására a bekövetkezett kromatin változások (nuclear blebbing, részleges vagy teljes sejtmag fragmentáció) a nekrozissal együtt azt jelezték, hogy a CYN programozott sejthalált (PCD-t) és a nekrozist egyaránt indukálja a *V. faba* sejtekben. Ezek a kromatin elváltozások viszonylag magas-  $10-20 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására jelentkeztek.

Környezetvédelmi szempontból releváns alacsony CYN koncentráció ( $0,01-0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) 6 napos kezelés során a mitotikus aktivitás serkentését idézi elő, de magasabb koncentrációban ( $2,5-20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) már gátolja a sejtek osztódását *V. faba* csíranövényekben. Ez nemcsak a mitózis egészére, de az egyes mitotikus fázisokra is igaz. Ez azt sugallja, hogy a CYN befolyásolja a sejtciklust anélkül, hogy bizonyos osztódási fázisban megállítaná azt. A CYN indukálta mitotikus hatások azt jelzik, hogy a cianotoxin egy komplex mechanizmus által fejti ki hatását a sejtosztódásra. Rövidebb, 3 napos tesztek során a CYN-nek nincs szignifikáns hatása a mitotikus aktivitásra nézve, viszont magasabb koncentrációban ( $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) 1

napos tesztek során késlelteti a mitózist szinkronizált sejtekben. Ez a hatás megfigyelhető volt *Sinapis alba* csíranövényeken is, ahol ezzel párhuzamosan késleltette a *de novo* fehérjeszintézist a vizsgálati időtartamban (43 óra). Így az egyik lehetséges oka az indukált mitotikus változásoknak a CYN fehérjeszintézis gátló hatása. Szinkronizált *V. faba* oldalgyökér merisztéma sejtekben a CYN gátolta a sejtek S fázisba való belépését is, mivel a szinkronizálás után 12 órával sem volt jelentős emelkedés megfigyelhető az S fázisban sejtek számában. Az *in vitro* DNS szintézis vizsgálatok során nem tapasztaltunk változást a PCR és qPCR vizsgálatok során a keletkező DNS mennyiségében sem alacsony sem pedig magas toxin koncentráció jelenlétében. Az S fázisba történő belépés késleltetése tehát valószínűleg nem a CYN-DNS direkt interakció eredménye. A mitotikus elváltozások részben a CYN által okozott fehérje szintézisben bekövetkezett változásnak tulajdoníthatók.

A CYN okozta rendellenes PPB-k kialakulása minden esetben megfigyelhető volt függetlenül a kezelés időtartamától, a fajtától és a megvilágítástól *V. faba* csíranövényekben. A CYN indukálta dupla, hasadt és aszimmetrikus PPB-k általánosnak mondhatók növényekben, ami közvetlenül kapcsolódik a fehérjeszintézis változásához. Így ez a hatás a CYN specifikus hatásának tekinthető növényekben. Az abnormális PPB formációk kialakulása általában a fehérjeszintézis vagy a fehérjék funkciójának változásához kapcsolható. Ebből adódóan ezt a mikrotubuláris elváltozást, mint indikátort lehetne használni a CYN kimutatására felszíni vizekben olyan helyeken, ahol ez a cianotoxin az egyedüli fehérjeszintézis gátló vegyület. Környezetvédelmi szempontból lényeges CYN koncentrációk ( $\leq 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) befolyásolják a növekedést és citotoxikus hatásuk is van. Ilyen például a nekrozis, ezen kívül nem mitotikus kromatin elváltozásokat okoznak illetve kromoszóma rendellenességeket és abnormális PPB-k kialakulását indukálja. Ezek az eredmények felvetik a CYN citotoxikus hatását a növényekre nézve természetes környezetükben is. Mindenképp új eredmények számítanak: (1) a CYN indukálta kromatin

elváltozások detektálása, amelyek a PCD markerei növényekben, (2) van egy közvetlen bizonyíték a CYN okozta kromoszómaaberrációkra, (3) a CYN hatására bekövetkező mitózis késleltetése, amely kapcsolatban lehet a fehérjeszintézis késleltetésével, (4) illetve hogy a CYN indukálta aszimmetrikus PPB-k és PPB rendellenességek kialakulása befolyásolja az osztódási sík kialakulását is.

**Summary of Ph.D. thesis**

**Investigation of subcellular events in plant cells with  
cyanotoxins**

**Tamás Garda**

**Supervisor: Csaba Máthé, PhD  
Associate professor**



University of Debrecen  
Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and  
Environmental Sciences  
Debrecen, 2017

## 1. Introduction

Nowadays cyanobacterial water blooming in surface freshwaters causes major environmental problems. Water blooming is caused by cyanobacteria which are colonizing due to the presence of organic substances in high quantities. Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotic organisms, which occur worldwide. Water blooming can be observed mainly in summer, when the days are longer and sunny (Carmichael, 1992; Walker, 2014). Some species of Cyanobacteria have resulted water blooming in Hungary so far, for example *Anabaena spiroides*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis sp.* and *Aphanizomenon flos-aquae* (Vasas et al. 2004). Cyanobacterial toxins are enriched during the process of water blooming in freshwaters. Over the past few decades several medical and ecological risks emerged due to cyanobacterial toxins appearing during eutrophication (Carmichael, 1992; Walker, 2014). A wide range of metabolites produced by these photosynthetic organisms are known, and it is not uncommon that these metabolites have an impact on live organisms. Nevertheless, the functions of these substances are not completely understood. In this thesis we studied the cellular effects and their biochemical background of two cyanobacterial toxins in *V. faba* seedlings. One of the cyanobacterial toxins is the alkaloid cylindrospermopsin (CYN) and the other is the heptapeptide microcystin-LR. Both toxins are hepatotoxic (Chen and Xie, 2005; Kankaanpää et al. 2002).

Microcystin-LR (MCY-LR) is a cyclic heptapeptide with seven amino acids, including three D-amino acids, two variable L-amino acids and two unusual amino acids namely, N-methyldehydroalanine (Mdha) and a hydrophobic D-amino acid, 3-amino-9 methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4, 6-dienoic acid (Adda) (Botes és mtsai, 1985). The hepatotoxic MCYs are known to be produced by several bloom forming cyanobacterial genera including *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc* (Wiegand és mtsai, 2005). MCY-LR inhibits the functions of types 1 and 2A

serine/threonine specific protein phosphatases (PP1 and PP2A), which leads to the alteration of phosphorylation/dephosphorylation equilibrium of proteins in the cells, and also induces oxidative stress. Thus, MCY-LR causes both protein phosphatase inhibition and production of ROS, and these were detected equally in plant and animal cells (Pflugmacher, 2002; Gácsi et al. 2009, Campos and Vasconcelos, 2010; Jiang et al. 2011). Alterations of mitotic spindle organization induced by MCY-LR are not well studied either in plant or animal cells, but clarifying it we can get closer to understand the toxicity of MCY-LR.

CYN is a tricyclic guanidine derivative containing a hydroxymethyluracil group. Its molecular weight is 416 Da. CYN is known to be produced by several bloom forming cyanobacterial genus including *Aphanizomenon* and *Cylindrospermopsis*. In mammals, CYN has primarily an impact on liver, but it also has harmful effect on thymus, spleen, heart and kidney (Runnegar and Lu, 1994; Runnegar et al. 1995; Azevedo et al. 2002). Disorganization of microfilaments and microtubules was observed under the influence of CYN in animal cells by Gácsi et al. (2009). Furthermore, the cyanotoxin inhibits the synthesis of proteins in eukaryotic organisms, although the exact molecular mechanism of this effect is not known (Froschio et al. 2008).

## **2. Goals of the study**

- 1, Our purpose was to reveal all types of mitotic spindle alterations induced by MCY-LR in *V. faba*.
- 2, Exploration of the biochemical background of MCY-LR induced microtubule/ mitotic spindle alterations: as to whether protein phosphatase inhibition or the production of ROS induced by MCY-LR is the reason for the abnormal formation of mitotic microtubular structures.
- 3, Study of CYN's impact on the growth and development of *V. faba* seedlings.

4, Examination of CYN's impact on mitotic cell division, particularly the microtubular structures formed during the process of mitosis and chromatin organization of non-dividing cells.

5, Furthermore, our aim was the study of the short-term effect of CYN on mitosis as well as on the inhibition of protein synthesis.

### **3. Material and methods**

#### **3.1. Purification of cylindrospermopsin and microcystin-LR**

The CYN used for the experiments was purified by Vasas et al. from *Aphanizomenon ovalisporum* strain (ILC-164) (Vasas et al. 2002). After the cyanobacteria were collected, the cells were extracted. The extract was fractionated by size exclusion chromatography (Toyopearl HW-40; 80 x 3 cm column). Final purification was performed on a semipreparative C-18 HPLC column.

MCY-LR was purified according to Kós et al (1995) modified method by Vasas Gábor et al., from *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 cyanobacteria strain culture. After the cells were collected by centrifugation, the next step was the extraction. Final purification of cyanotoxin was performed on a DEAE Cellulose-52 column. The eluates containing MCY-LR were purified by Toyopearl Size Exclusion Chromatography. For both toxins, the purity of the preparations was verified by HPLC and capillary electrophoresis.

#### **3.2. Field sampling**

The samples used in the analysis of field samples were derived from Lake Bárdos, located in Gyula (Békés county, Hungary), which were made available by Gábor Vasas and his colleagues. The sampling took place on 3 September 2012, during which the collection of *Ceratophyllum submersum* plants was carried out from the water bloom and from a distant control site.

#### **3.3. Cultivation of *V. faba* seedlings and toxin treatment**

Three *V. faba* varieties were used (Standard and ARC Egypt Cross during CYN treatments and Lippói during MCY-LR treatments). Prior to the experiments the seeds were subjected to surface sterilization. The seeds were grown on agar-solidified medium. Two media were used, one of which was the Murashige Skoog (MS\*) medium containing Gamborg's vitamins and 2% sucrose (Murashige and Skoog, 1962; Gamborg et al., 1968), the other media was Allen medium (Allen, 1968). After the appearance of the first lateral root, the cyanotoxins were added to the medium under the range of 0.01 to 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  concentration. The duration of the toxin treatment was 1, 2, 3 and 6 days.

### **3.4. Methods used in experiments**

Growth of CYN treated seedlings was assayed by means of increase in the length of epicotyls, main roots and number of lateral roots. These parameters were measured at the beginning and at the end of cyanotoxin treatments.

For histological analysis, chromatin staining, microtubule immunohistochemistry, section were made from paraformaldehyde fixed lateral roots, and the longitudinal- and cross sections were prepared with Leica Yung Histoslide 2000 microtome. For chromatin staining we used DAPI (4,6,-diamidino-2-phenylindole), for histone H3 labelling we used anti-phospho-Histone H3 antibody and secondary antibody (Alexa 488 conjugated), for immunostaining of microtubular system we used Cy3 conjugated monoclonal anti- $\beta$ -tubulin antibody. For the assay of ROS levels, we used a modified 2\_,7\_-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) staining method of Guo et al. (2008). In the short-term synchronization experiments and *in vivo* DNA synthesis, cells were synchronized with hydroxyurea (HU) before the toxin was added. During the synchronous experiments and DNA synthesis, 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN was used. The lateral root tips were incubated in 5-BrdU and were visualized the S phase cells with Alexa 546 antibodies. We used the microscopic

examination: Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope (excitation wavelengths: 351/364 nm: DAPI, 543 nm: Cy3 and 488 nm: Alexa 488) and an Olympus Provis AX-70 fluorescence microscope (excitation wavelengths: 320-360 nm: DAPI, 540-580 nm: Cy3 and Alexa 546, 450-480 nm: Alexa 488 and 450-480 nm: DCFH-DA).

For in vitro DNA synthesis assays PCR and qPCR techniques were used. PCR reactions were performed with Milan Riba, while qPCR reactions were performed with Adam Simon. In our PCR and qPCR assays, about 1100 base pair long segment (from base 359 to base 1492) of the gene was amplified by 16S rRNA. Forward primer was CYA359F (GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG) (Nübel et al., 1997), which is specific to cyanobacteria, whereas the reverse primer was 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG AC) (Lane, 1991).

Enzymatic antioxidant (peroxidase and catalase) activities were detected on native 7.5% polyacrylamide gels according to Schlereth et al. (2000). For the detection of pyrogallol peroxidase bands, native gels were incubated in 50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  buffer, pH 7.5, then stained for 15–30 min in the same buffer containing 20 mM pyrogallol and 5 mM  $H_2O_2$ . The oxidation product (purpurogallin) was detected as a pattern of dark brown colored bands. For the detection of catalase bands, gels were incubated in 0.76 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  and 1.5 mM  $FeCl_3$ , pH 7.5, then analyzed. Catalase activities were detected as transparent bands on a dark background (Weidert and Cullen, 2010).

For chromosome preparations, lateral root tips were treated with 0.1% (w/v) colchicine (Sigma–Aldrich), then fixed in 45% (v/v) acetic acid. Fixed samples were hydrolyzed in 1 N HCl at 60 °C, and stained with 5% (w/v) carmine-acetic acid at 60 °C. Chromosome squashes were examined by using the bright-field facilities of the Olympus Provis AX-70 microscope.

#### 4. Summary of results

In *V. faba* lateral root tip meristematic cells MCY-LR induced a large number of mitotic spindle abnormalities in a time and dose dependent manner. One day of treatments with MCY-LR did not induce significant changes in mitotic spindle organization. At 2 days of toxin exposure, we observed 7 types (disrupted spindle, tripolar/multipolar spindle, monopolar spindle, incomplete spindle, C-shaped spindle, S-shaped spindle, asymmetrical (unequal) spindle), while at 6 days of toxin exposure, we observed 11 types (disrupted spindle, additional polar MT bundles, tripolar/multipolar spindle, multipolar spindle with hyperbundling of kinetochore MTs, monopolar spindle, incomplete spindle, C-shaped spindle, S-shaped spindle, additional spindle, midplane kinetochore fiber bundles, asymmetrical (unequal) spindle) of mitotic spindle abnormalities. The number of mitotic spindle abnormalities was highest at  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR for both treatment time. Moreover, this toxin induced much more types of mitotic spindle abnormalities than other well-known protein phosphatase inhibitors. At one day of toxin exposure, we observed the significant decrease on the total PP1 and PP2A activities at higher concentration than  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR. During 2 and 6 days of exposure the toxin inhibited significantly PP1 and PP2A activity at higher concentration than  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR. MCY-LR inhibited PP1 and PP2A activities after 24 h of exposure, when no spindle anomalies were detected. At 48 h and 6 days of exposure these effects were more pronounced and occurred concomitantly with the induction of spindle anomalies. DCFH-DA staining did not reveal significant increases in the ROS levels of *V. faba* lateral root tips, irrespective of the time of MCY-LR exposure and the concentration of toxin. Meanwhile, there were significant increases in the activities of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging enzymes POD and CAT. Since the accumulation of ROS was not detected by dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) labeling, we can assume that all of the detected division spindle abnormalities are related to long-term

protein phosphatase inhibition by MCY-LR exposure. Therefore, *V. faba* is a good model plant for the study of the relationship between protein phosphatase inhibition induced by MCY-LR and the disorganization of mitotic microtubules, because the ROS inducer effect of the cyanotoxin does not prevail in this system. We were the first to publish several types of mitotic microtubule anomalies induced by MCY-LR, including the formation of additional polar microtubule bundles in the mitotic spindle, excessive bundling of the midplane microtubules, incomplete mitotic spindle, spindles with C- and S-shape and additional microtubular (spindle) structures. Our opinion is that MCY-LR can be an efficient tool for understanding the regulation of mitotic spindle assembly. Our results provide insights into the role of protein phosphatases in subcellular processes within plants and generally eukaryotes. By studying a *Ceratophyllum submersum* population naturally exposed to a MCY-LR containing cyanobacterial bloom, we also proved that during the toxic cyanobacterial water blooming process, MCY-LR can accumulate in such a quantity which can induce serious changes in the flora of the affected area both at cell and tissue levels. Among tissue changes the most important are induction of necrosis, early development of lateral buds and shortening of shoots. At the cellular level, we observed the degradation of DNA in necrotic tissues and the hyperphosphorylation of histone H3 at the Ser 10 position (H3S10ph) in the metaphase cells of shoot tip meristems.

The effect of CYN on growth was studied on *V. faba* seedlings. In *V. faba* seedlings, we detected transient stimulation of growth parameters-especially root growth- at 6 d of treatment with  $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN under continuous light, in both *V. faba* cultivars (Standard and ARC Egypt Cross). CYN induced growth stimulation can be considered as a stress response: increases in plant or organ (root) biomass increase the capacity of CYN detoxification (Kinnear et al., 2008; Beyer et al., 2009). Growth effects of CYN depended on exposure time, light conditions and the plant cultivar used for *V. faba*. During 6 days of treatment we detected a much more intense

and more pronounced effect on growth than in the 3-day treatments. When plants were grown in darkness, the stimulatory effects of CYN were not observed for epicotyl and mainroot of cv. “Standard”. Necrotic cell death is induced by many abiotic and biotic stress factors. For *V. faba*, the pattern of necrosis formation was CYN dose dependent. At lower cyanotoxin concentrations (0.1–5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) necrotic patches were characteristic for root cortex. At higher CYN concentrations (10–20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), continuous necrotic rings were formed in root cortical parenchyma and rhizodermis. Besides this, at long-term cyanotoxin exposures, plants avoid entry of cyanotoxin into healthy tissues through vascular tissue by the formation of necrotic patches (0.1 - 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN) and rings (10 – 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN) formed in root tissues. These are part of the general stress response induced by cyanotoxin resulting in *V. faba* detoxification. These alterations cannot be classified as specific effects of CYN because they can be induced by several other types of stress, too.

Changes of chromatin – nuclear blebbing, partial fragmentation of cell nucleus at 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN and complete fragmentation at 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN and necrosis together indicated that CYN induces both programmed cell death (PCD) and necrosis of *V. faba* cells treated with cyanotoxin.

CYN induced stimulation of mitosis and distinct mitotic phases at low, environmentally relevant concentrations (0.01– 0.1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) at six days exposure and inhibited cell division at higher concentrations (2.5–20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) in *V. faba* seedlings. This is true not only for the whole of mitosis, but also for mitotic phases. This suggests that mitosis is affected by CYN in general, without arresting cells in certain mitotic phases. Multiple mitotic effects of CYN indicate that the cyanotoxin acts on cell division by complex mechanisms. At 3 days of exposure, the cyanotoxin does not have significant effects on mitotic activity, but it delays mitosis in synchronized cells at a higher concentration (5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) at one day exposures. This effect can be observed in *S. alba* seedlings as well, where it delays de novo protein synthesis in the time frame studied

(43 h). Thus, one of the possible cause of mitotic changes induced by CYN is its protein synthesis inhibitory effect.

In synchronized *V. faba* lateral root meristem cells CYN also inhibited the cells to enter S-phase, because there was no significant growth in the number of cells being in S-phase 12 hours after hydroxyurea washout. For *in vitro* DNA synthesis we did not experience changes in the amount of DNA formed during the PCR and qPCR reactions in the presence of either low or high CYN concentrations. That is, it is probable that the retardation of entering S-phase does not result from the direct interaction of CYN-DNA. The mitotic alterations observed are partially due to the changes in protein synthesis caused by CYN.

There was one structural mitotic alteration induced by CYN independent of exposure time, cultivar and light conditions in *V. faba*. This was abnormal PPB development. Our research team observed previously this phenomenon in other plants, too (Beyer et al., 2009). Thus, CYN induced abnormal PPBs could be universal in plants, and it might be directly related to its influence on protein synthesis, hence a specific effect of CYN in plants. The alterations in the preprophase band (PPB) organization (double PPB, split PPB, asymmetric PPB) can correlate with the inhibition effect of CYN on specific proteins in plants. Therefore, this microtubular alteration can be used as an indicator of the presence of CYN in surface waters, where this cyanotoxin is the single protein synthesis inhibitor compound. Our results show that environmentally relevant concentrations of CYN ( $\leq 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) affect growth and have cytotoxic effects in *V. faba*. This involves necrosis and non-mitotic chromatin lesions, chromosome aberrations and abnormal formation of PPB. These results clearly show the cytotoxic effect of CYN on plants and raise the possibility of CYN toxicity in natural environments. The novelty of our results consists in: (1) the detection of chromatin alterations induced by CYN, which are markers of PCD in plants, (2) the first direct evidence for chromosome aberrations caused by CYN in plants, (3) the delay of

mitosis resulted by CYN, which can be related to the delay of protein synthesis, (4) as well as the fact that the CYN induced alteration of cell division plane can be correlated to the alterations of PPB organization.

## **Irodalom/References**

1. Allen, M. M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of phycology*, 4(1), 1-4.
2. Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*, 181, 441-446.
3. Botes, D.P.; Wessels, P.L.; Kruger, H.; Runnegar, M.T.C.; Santikarn, S.; Smith, R.J.; Barna, J.C.J.; Williams, D.H. (1985). Structural studies on cyanoginosins-LR,-YR,-YA, and-YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2747-2748.
4. Campos, A., & Vasconcelos, V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International journal of molecular sciences*, 11(1), 268-287.
5. Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of applied bacteriology*, 72(6), 445-459.
6. Chen, J., & Xie, P. (2005). Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu of subtropical China and the risk to human consumption. *Environmental toxicology*, 20(6), 572-584.
7. Froscio, S.M., Humpage, A.R., Wickramasinghe, W., Shaw, G., Falconer, I.R. (2008). Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon*, 51(2), 191-198.
8. Gácsi, M., Antal, O., Vasas, G., Máthé, C., Borbély, G., Saker, M.L., Gyri, J., Farkas, A., Vehovszky, Á., Bánfalvi, G. (2009). Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicology in vitro*, 23(4), 710-718.

9. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.
10. Guo, K., Xia, K., Yang, Z.M., (2008). Regulation of tomato lateral root development by carbon monoxide and involvement in auxin and nitric oxide. *Journal of experimental botany*, 59(12), 3443-3452.
11. Heisler, J.P., Gilbert, J., Burkholder, J., Anderson, D., Cochlan, W., Dennison, W., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H., Sellner, K., Stockwell, D., Stoecker, D., Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful algae*, 8(1), 3-13.
12. Jiang, J., Gu, X., Song, R., Wang, X., Yang, L. (2011). Microcystin-LR induced oxidative stress and ultrastructural alterations in mesophyll cells of submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* (Lour.) Hara. *Journal of hazardous materials*, 190(1), 188-196.
13. Kankaanpää, H., Vuorinen, P. J., Sipiä, V., Keinänen, M. (2002). Acute effects and bioaccumulation of nodularin in sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions. *Aquatic toxicology*, 61(3), 155-168.
14. Kós, P. (1995). A *Microcystis aeruginosa* toxintermelése. Doktori értekezés, MTA SZBK Növénybiológiai Intézet.
15. Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). New York, NY, USA: John Wiley and Sons, pp. 115–175.
16. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
17. Nübel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 63(8), 3327-3332.

18. Pflugmacher, S. (2002). Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental toxicology*, 17(4), 407-413.
19. Runnegar, M. T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z., Lu, S. C. (1995). Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical pharmacology*, 49(2), 219-225.
20. Runnegar, M.T., Lu, S.C. (1994). The role of glutathione (GSH) in the hepatotoxicity caused by the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin (CY). *FASEB. J.* 8, A419 A419.
21. Schlereth, A., Becker, C., Horstmann, C., Tiedemann, J., Müntz, K. (2000). Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa L.*). *Journal of Experimental Botany*, 51(349), 1423-1433.
22. Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, G., Batta, G., Gyémánt, G., M-Hamvas, M., Máthé, C., Grigorszky, I., Molnár, E., Borbély, G. (2002). Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (blue-green *Sinapis* test). *Analytical biochemistry*, 302(1), 95-103.
23. Walker, H. W. (2014). Harmful algae blooms in drinking water: Removal of Cyanobacterial Cells and Toxins. CRC Press.
24. Weydert, C. J., Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*, 5(1), 51-66.
25. Wiegand, C., Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and applied pharmacology*, 203(3), 201-218.
26. Kinnear, S. H. W., Fabbro, L. D., Duivenvoorden, L. J. (2008). Variable growth responses of water thyme (*Hydrilla verticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(2), 187-194.

27. Beyer, D., Suranyi, G., Vasas, G., Roszik, J., Erdódi, F., M-Hamvas, M., Bácsi, I., Bátori, R., Serfőző, Z., Szigeti, M. Zs., Vereb, G., Demeter, Z., Gonda, S., Máthé, Cs. (2009). Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. *Toxicon*, 54(4), 440-449.

## **Publikációs Lista - Publication List**

### **a, Az értekezés alapját képező közlemények – Articles related to the dissertation**

**Garda, T.**, Riba, M., Vasas, G., Beyer, D., Márta, M., Hajdu, G., ... & Máthé, C. (2015). Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *V. faba* cells. *Chemosphere*, 120, 145-153.

**Impakt faktor: 3,698**

**Garda, T.**, Kónya, Z., Tándor, I., Beyer, D., Vasas, G., Erdődi, F., ... & Máthé, C. (2016). Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in *V. faba* by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction. *Journal of Plant Physiology*, 199, 1-11.

**Impakt faktor: 2,971**

### **b, Egyéb közlemények - Other publications:**

Mathe, C., **Garda, T.**, Beyer, D., & Vasas, G. (2017). Cellular Effects of Cylindrospermopsin (Cyanobacterial Alkaloid Toxin) and its Potential Medical Consequences. *Current Medicinal Chemistry*, 24(1), 91-109.

**Impakt faktor: 3,455**

Csaba Máthé, Zita Demeter, Anna Resetár, Sándor Gonda, Andrea Balázs, Éva Szőke, Zoltán Kiss, Ádám Simon, Viktória Székely, Milán Riba, **Tamás Garda**, Boglárka Gere, Zsófia Noszály, Attila V. Molnár, Gábor Vasas (2012) The plant tissue culture collection at Department of Botany, University of Debrecen. *Acta Biologica Szegediensis*, Volume 56(2).

### **c, Konferencia előadások és poszterek - Conference presentations and posters:**

Máthé Cs., Beyer D., Hamvas M.M., **Garda T.**, Jambrovics K., Vasas G. (2015). The effect of microcystin\_LR on plant

developmental events. Signalling in plant development (EMBO conference), Brno. Poster.

Riba, M., **Garda, T.** (2014). A cilindropermopszin (cianotoxin) sejtszintű hatásainak vizsgálata *V. faba* modellnövényben. Fiatal Gyógynövénykutatók Fóruma, Budakalász. Előadás.

**Garda, T.**, Riba, M., Máthé, C., Beyer, D., Vasas, G. (2013). A cilindropermopszin hatásmechanizmusának vizsgálata *Vici faba* gyökérmerisztéma sejtekben. II. Növénybiológiai Workshop, Debrecen. Előadás.

**Garda, T.**, Máthé, C., M-Hamvas, M., Vasas, G. (2017). A mikrocisztin-LR (MCY-LR) által indukált osztódási orsó rendellenességek: Protein foszfatáz gátlás vs. ROS indukció. Magyar Növénybiológiai Társaság, Fiatal Növénybiológusok Előadássorozata, Debrecen. Előadás.



Nyilvántartási szám: DEENK/145/2017.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Garda Tamás  
Neptun kód: FA94F3  
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10057387

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

#### Idégen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

- Garda, T.**, Kónya, Z., Tándor, I., Beyer, D., Vasas, G., Erdődi, F., Vereb, G., Papp, G., Riba, M., Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in *Vicia faba* by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction. *J. Plant Physiol.* 199, 1-11, 2016. ISSN: 0176-1617.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.009>  
IF: 2.971 (2015)
- Garda, T.**, Riba, M., Vasas, G., Beyer, D., Mikóné Hamvas, M., Hajdu, G., Tándor, I., Máthé, C.: Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *Vicia faba* cells. *Chemosphere*. 120, 145-153, 2015. ISSN: 0045-6535.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.035>  
IF: 3.698





További közlemények

Időgen nyelvű közlemények hazai folyóiratban (1)

3. Máthé, C., Demeter, Z., Resetár, A., Gonda, S., Balázs, A., Szőke, É., Kiss, Z., Simon, Á., Székely, V., Riba, M., **Garda, T.**, Gere, B., Noszály, Z., Molnár, V. A., Vasas, G.: The plant tissue culture collection at the Department of Botany, University of Debrecen.  
*Acta biol. Szeged.* 56 (2), 179-182, 2012. ISSN: 1588-385X.

Időgen nyelvű közlemények külföldi folyóiratban (1)

4. Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., **Garda, T.**, Beyer, D., Vasas, G.: Cellular effects of cylindrospermopsin (Cyanobacterial Alkaloid Toxin) and its potential medical consequences.  
*Curr. Med. Chem.* 24 (1), 91-109, 2017. ISSN: 0929-8673.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867329666161028153814>  
IF: 3.455 (2015)

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 10,124**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,669**

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

Debrecen, 2017.05.22.





Registry number: DEENK/145/2017.PL  
Subject: PhD Publikációs Lista

Candidate: Tamás Garda  
Neptun ID: FA94F3  
Doctoral School: Pál Juhász-Nagy Doctoral School of Biology and Environmental Sciences  
MTMT ID: 10057387

### List of publications related to the dissertation

#### Foreign language scientific articles in international journals (2)

1. **Garda, T.**, Kónya, Z., Tándor, I., Beyer, D., Vasas, G., Erdődi, F., Vereb, G., Papp, G., Riba, M., Mikóné Hamvas, M., Máthé, C.: Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in *Vicia faba* by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction. *J. Plant Physiol.* 199, 1-11, 2016. ISSN: 0176-1617.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.009>  
IF: 2.971 (2015)
2. **Garda, T.**, Riba, M., Vasas, G., Beyer, D., Mikóné Hamvas, M., Hajdu, G., Tándor, I., Máthé, C.: Cytotoxic effects of cylindrospermopsin in mitotic and non-mitotic *Vicia faba* cells. *Chemosphere.* 120, 145-153, 2015. ISSN: 0045-6535.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.035>  
IF: 3.698





---

**List of other publications**

Foreign language scientific articles in Hungarian journals (1)

3. Máthé, C., Demeter, Z., Resetár, A., Gonda, S., Balázs, A., Szőke, É., Kiss, Z., Simon, Á., Székely, V., Riba, M., **Garda, T.**, Gere, B., Noszály, Z., Molnár, V. A., Vasas, G.: The plant tissue culture collection at the Department of Botany, University of Debrecen.  
*Acta biol. Szeged.* 56 (2), 179-182, 2012. ISSN: 1588-385X.

Foreign language scientific articles in international journals (1)

4. Máthé, C., Mikóné Hamvas, M., **Garda, T.**, Beyer, D., Vasas, G.: Cellular effects of cylindropermopsin (Cyanobacterial Alkaloid Toxin) and its potential medical consequences.  
*Curr. Med. Chem.* 24 (1), 91-109, 2017. ISSN: 0929-8673.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867323966161028153814>  
IF: 3.455 (2015)

**Total IF of journals (all publications): 10,124**

**Total IF of journals (publications related to the dissertation): 6,669**

The Candidate's publication data submitted to the IDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of Web of Science, Scopus and Journal Citation Report (Impact Factor) databases.

22 May, 2017

