



**A cilindropermopszin és a mikrocisztin-LR
(cianotoxinok) citológiai hatásai *in vitro* előállított nád
(*Phragmites australis*) növényekben**

Doktori (PhD) értekezés

Beyer Dániel Ernő

Témavezetők: Dr. Máthé Csaba

Dr. Borbély György

Debreceni Egyetem
Természettudományi Doktori Tanács
Juhász Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2010

**A cilindropermopszin és a mikrocisztin-LR (cianotoxinok)
citológiai hatásai *in vitro* előállított nád (*Phragmites australis*)
növényekben**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a biológia
tudományágban

Írta: Beyer Dániel Ernő okleveles biológus/biotechnológus
Készült a Debreceni Egyetem Juhász Nagy Pál doktori iskolája
(biológia doktori programja) keretében

Témavezetők: Dr. Máthé Csaba
Dr. Borbély György

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 20...

Az értekezés bírálói:

Dr.

Dr.

Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.

tagok: Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20...

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász Nagy Pál Doktori Iskola biológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2010.

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy doktorjelölt 20..- 20. . . között a fent megnevezett Doktori Iskola biológia .programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2010.

a témavezető aláírása

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzések.....	1
1.1.	Bevezetés.....	1
1.2.	Célkitűzések	2
2.	Irodalmi áttekintés.....	3
2.1.	A nád mint modellnövény	3
2.2.	A cianobakteriális toxinok	5
2.3.	A cilindropermopszin	6
2.4.	A mikrocisztinek	10
2.5.	A növényi mikrotubuláris citoszkeleton	14
2.6.	A növényi sejtciklus szabályozása	16
2.7.	A sejthalál növényekben	18
3.	Anyag és módszer	20
3.1.	A cilindropermopszin tisztítása	20
3.2.	A mikrocisztin-LR tisztítása.....	20
3.3.	A nádnövények előállítása szövettenyésztéssel	21
3.4.	A nádnövények toxinkezelése és a növekedés vizsgálata.....	22
3.5.	A hisztokémiai, a citológiai és a szövettani vizsgálatok	22
3.6.	A β -tubulin vizsgálata Western blot segítségével	24
4.	Eredmények.....	26
4.1.	A cilindropermopszin a nád növekedésre gyakorolt hatásai ..	26
4.2.	A CYN szövettani hatásai	28
4.3.	A CYN mikrotubulus rendszerre és sejtosztódásra gyakorolt hatásai	30
4.4.	A CYN a kromatin szerkezetre gyakorolt hatásai.....	35
4.5.	A MCY-LR mikrotubuláris citoszkeletonra gyakorolt hatásai	38
4.7.	A MCY-LR kromatin szerkezetre gyakorolt hatásai.....	44
5.	Az eredmények megbeszélése.....	46
6.	Összefoglalás.....	54
7.	English summary.....	57
7.1.	Introduction	57
7.2.	Goals of the study.....	58
7.3.	Results and discussion.....	58
8.	Köszönetnyilvánítás	62
9.	Irodalomjegyzék.....	63
10.	Függelék	73

A rövidítések jegyzéke

BSA: borjú szérum albumin
CDK: ciklin dependens kináz
CHO-K1: kínai hörcsög ovárium sejtenyészet
CMT: kortikális mikrotubulus
CYN: cilindrospermopszin
DAPI: diamidino fenilindol
EMT: endoplazmatikus mikrotubulusok
IC₅₀: 50%-os gátló koncentráció
MAP: mikrotubulus asszociált protein
MCY: mikrocisztin
MCY-LR: mikrocisztin-LR
PBS: foszfát pufferelt sóoldat
PP1: protein foszfatáz 1
PP2A: protein foszfatáz 2A
PPB: pre-profázisos köteg
Rb: retinoblasztóma protein
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling

1. Bevezetés és célkitűzések

1.1. Bevezetés

A cianobaktériumok az egész élővilágban igen elterjedt fotoszintetizáló prokarióta szervezetek, számos fajuk képes különböző kémiai tulajdonságú toxikus vegyületeket, azaz cianotoxinokat előállítani. Az eutrofizáció során a természetes vizek cianobaktériumai a nagy koncentrációban jelen lévő tápanyagok következtében nagymértékben elszaporodhatnak, és cianotoxinjaik révén számottevő egészségügyi, és ökológiai kockázatot jelentenek (Carmichael, 1992).

A cianotoxinok károsak az emberre és haszonállatokra, emellett a vízi ökoszisztémák fenntartásában szerepet játszó állatokra is (Carmichael 1994). Két cianotoxinról ismeretes, hogy a növényekre is káros hatású. Az egyik az alkaloid típusú cilindrospermopszin (CYN), amelyet főként az *Aphanizomenon* és *Cylindrospermopsis* genuszba tartozó törzsek termelnek, a másik a heptapeptid típusú mikrocisztinek (MCY) családja, amelyeket főként a *Microcystis spp.* termel (Sivonen és Jones 1999). Gerinces állatokban mindkét toxin elsősorban májkárosító hatású, és számos esetben okozott emberi megbetegedéseket is (Jochimsen és mtsai, 1998; Humpage és Falconer, 2003). Kutatócsoportunk vetette fel először a CYN és a MCY-ek növényekre gyakorolt toxikus hatásának kérdését (Vasas és mtsai, 2002; Kós és mtsai, 1995). Azóta több szerző is foglalkozott a cianotoxinok növényekre gyakorolt hatásával (M-Hamvas és mtsai, 2003; Pflugmacher 2004; Máthé és mtsai, 2007; 2009), de a toxikus hatás hátterében álló sejt- és szövetszintű változások kevésbé ismertek.

A vízi ökoszisztémákat igen súlyosan érintheti, ha az uralkodó növényzet károsodik, vagy elpusztul. Az európai nádasok az utóbbi évtizedekben egy lassú pusztulási folyamaton mennek keresztül, amely hátterében számos tényező mellett a cianobakteriális toxinok is szerepet játszhatnak (Ostendorp, 1989; Yamasaki és mtsai, 1993). A vízvirágzások során a partok mentén, ahol gyakran találkozhatunk nádasokkal, a cianobaktérium tömeg vastag réteget alkothat, amely nagy mennyiségben tartalmazhat cianotoxinokat (Máthé és mtsai, 2007). Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy a MCY-LR toxikus hatású a *Phragmites australis* növényekre (Máthé és mtsai, 2007).

A MCY-ek citotoxikus hatásairól állati sejtekben számos adat áll rendelkezésre, az 1 és 2A típusú protein foszfatázok specifikus

gátlószereiként a foszforilációval szabályozott folyamatokkal interferál, így elsősorban a citoszkeleton szerveződését, ezen kívül a sejtek növekedését és a programozott sejthalált befolyásolja (Toivola és Eriksson, 1999; Lankoff és mtsai, 2003). A CYN az állatokban és a növényekben egyaránt gátolja a fehérjeszintézist (Froschio és mtsai, 2001; Metcalf és mtsai, 2004), továbbá állati sejtekben bizonyított a cianotoxin DNS károsító hatása (Humpage és mtsai, 2000). Állati sejtekben a mikrotubulusok és a mikrofilamentumok dezorganizációját indukálja (Gácsi és mtsai, 2009). A CYN a vörösvértestekben jellegzetes morfológiai elváltozást okoz (Sukénik és mtsai, 2006). A fentiekből kitűnik, hogy a két ismert és kutatott cianobakteriális toxin, a CYN és a MCY sejtszintű hatásai viszonylag ismertek az állati sejtekben, mindkét cianotoxin hatást gyakorol a citoszkeletális elemekre és a kromatin szerkezetére. A növényi sejtekkel kapcsolatosan azonban, mindezidáig kevés az irodalmi adat (a CYN esetében, egyáltalán nincs tudomásunk a toxin által a növényi sejtben okozott elváltozásokról). Ennek megfelelően, a célkitűzéseinket az alábbiakban fogalmazzuk meg.

1.2. Célkitűzések

a. A CYN növekedésre gyakorolt hatásának vizsgálata az *in vitro* előállított axenikus nád (*Phragmites australis*) növényekben, amely magában foglalja a hajtások és a gyökök hosszanti növekedésének és az új gyökök képződésének felmérését.

b. A CYN szövettani hatásának analízise az axenikus nádnövények gyökereiben, a merisztematikus és a differenciált szövetekben.

c. A CYN és a MCY-LR mikrotubuláris citoszkeletonra gyakorolt hatásainak megfigyelése osztódó és differenciált nádgyökér sejtekben, fluoreszcens mikroszkópos technikák alkalmazásával.

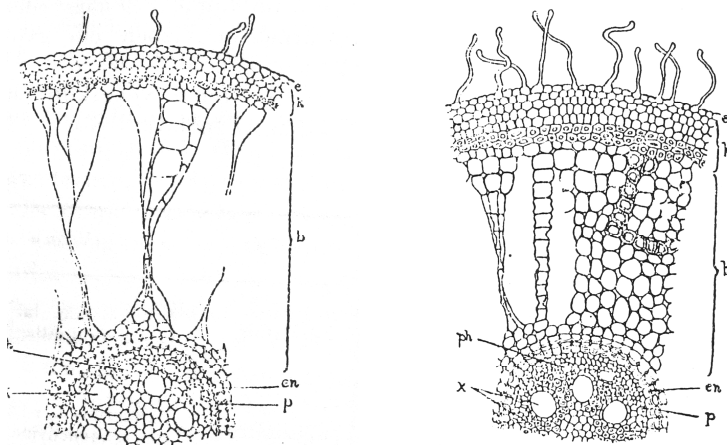
d. Célul tűztük ki a cianotoxinok a nád gyökércsúcsi merisztéma sejtek osztódóképességére kifejtett hatásának vizsgálatát.

e. A CYN és a MCY-LR a kromatin állományra gyakorolt hatásának megértése kromatin festési technikák és TUNEL módszer segítségével.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A nád mint modellnövény

A nád (*Phragmites australis* /Cav./ Trin. Ex Steud.) kozmopolita egyszikű növényfaj. A vízi élőhelyek fontos állományalkotója. Előfordul a partmenti sekélyesekben, mind a brakkvizekben mind az édesvizekben, de a szárazföldi nádasok sem tekinthetők ritka jelenségnek (Haraszty, 1931). A nád a *Poaceae* családba tartozó rizómával rendelkező nagytermetű (1-4 m magas) növény. Üreges fásodott szalmaszárral rendelkezik, amely a benne található szilárdító szövetnek köszönhetően igen ellenálló. Gyökerei a vízi életmódhoz való adaptáció következtében lizigén átszellőztető alapszövettel rendelkeznek, amely redukáltabb formában megfigyelhető a szárazföldi egyedekben is (1. ábra; Haraszty, 1931).



1. ábra: A *Phragmites australis* gyökerének szöveti struktúrája (Haraszty, 1931)

Hazánkban a nádasok számos őshonos, veszélyeztetett állatfajnak adnak otthont, példaként megemlíthetők a nádasainkban fészkelő madárfajok a nádi poszták (*Acrocephalus spp.*) a kócsagok (*Egretta garzetta*; *E. alba*), a vörös gém (*Ardea purpurea*) és más madarak (Heinzel és mtsai, 2000).

A nádnövények képesek nagy hatásfokkal felvenni bizonyos nehézfémeket (Mn, Cd, Cr, Pb, Zn, Hg, Cu) ezáltal részt vesznek a vizek öntisztulásában (Simon, 1992). Lehetővé teszik az antropogén valamint a

természetes eredetű szennyeződések biomonitorozását (Bonanno és Lo Giudice 2010). Európában a nádasok lassú pusztulása figyelhető meg (Ostendorp, 1989, Armstrong és Armstrong, 2001). A jelenségért számos biotikus és abiotikus tényező okolható. A folyótorkolatokban a csatornaépítések következtében megváltozott sótartalom (Hanganu és mtsai, 1999), az eutrofizáció során megnövekedett szerves sav- illetve szulfidtartalom az üledékben (Armstrong és Armstrong, 1999), mechanikai sérülések valamely emberi tevékenység következtében (aratás) vagy a fiatal nádhajtásokat lelegető, behurcolt állatok (pl. nutria, pézsmapocok, amur) lehetnek a felelősek az Európában tapasztalható nád pusztulásért (Ostendorp, 1989). Nem hagyható figyelmen kívül a toxikus cianobaktérium törzsek potenciális szerepe. Yamasaki és mtsai, (1993) egy eutróf tóban (Teganuma tó, Japán), ahol *Microcystis aeruginosa* vízvirágzás jelentkezett, a nádasok jelentős pusztulását figyelték meg.

A nádnövények (*Phragmites australis*) képesek felvenni a mikrocisztineket és a cianotoxinok hatást gyakorolnak az enzimeik aktivitására, elsősorban az oxidatív stresszel szembeni védekezést szolgáló enzimekre (Pflugmacher és mtsai, 2001), ezen felül *in vitro* előállított nádnövények mikrocisztin-LR-el történő kezelése növekedésgátlást, sárgulást, és szövettani elváltozásokat okozott (Máthé és mtsai, 2007). Kevésbé ismert, hogy egyéb cianobakteriális toxinok, mint pl. a cilindropermopszin hogyan hatnak a *Phragmites australis* növényekre.

A *Phragmites australis*-ból már több szerző állított elő szövettenyészeteket. 1975-ben Sangwan és Gorenflot sejtszuspenziós kultúrát hozott létre, amely azonban nem bizonyult embriogénnek. Embriogén nádkalluszokat és növényregenerálást, később több kutatónak sikerült megvalósítani (Máthé és mtsai, 2000; Wang és mtsai, 2001). Nád szövettenyészeteket már több esetben használtak ökofiziológiai kísérletekben (Cui és mtsai, 2002). A MCY-LR nád növényekre gyakorolt hatását a szövettenyésztéssel előállított nádnövények segítségével igazolták (Máthé és mtsai, 2007). A szövettenyészetek számos előnyt kínálnak. Mivel axenikus kultúrák, lehetővé teszik, hogy mikroorganizmusok vagy egyéb tényezők befolyása nélkül kapjunk választ a nád és a vizsgált toxinok lehetséges interakciójáról jól kontrollálható kísérleti körülmények között (Máthé és mtsai, 2007).

2.2. A cianobakteriális toxinok

A cianotoxinok termeléséért a névadó baktériumcsoportba, a cianobaktériumok törzsébe tartozó toxikus baktériumok a felelősek. Tudományos érdeklődésre emberi és állati mérgezéses esetek kapcsán tettek szert (Carmichael, 1994, Sivonen és Jones 1999).

Csoportosításuk leggyakrabban az emberi, illetve az állati szervezetben okozott patológiás elváltozások alapján történik. A májat károsító toxinok vagy más néven hepatotoxinok közé tartoznak a ciklikus oligopeptid természetű mikrocisztinek (MCY) és nodularinok valamint az alkaloidokhoz tartozó cilindropermopszin (CYN). Az idegrendszeri elváltozásokat okozó cianotoxinok legfontosabb csoportjai az alkaloid természetű szaxitoxin, illetve az anatoxinok (Carmichael, 1992). Ezen kívül dermatotoxikus (aplysiatoxinok és lyngbyatoxin) illetve irritatív cianotoxinok (lipopoliszacharid) is ismertek (Sivonen és Jones, 1999).

A toxintermelő képesség nem tekinthető a cianobaktérium fajok definitív tulajdonságának, minden toxikus cianobaktérium fajban fellelhetők toxikus és nem toxikus törzsek. Toxikus törzsek találhatók pl. a *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon ovalisporum* és *Cylindropermopsis raciborskii* fajokban (Carmichael, 1992). A toxikus törzsek között jelentős különbség lehet a toxintermelés mértékében. Jelenleg nem ismert, hogy a cianobaktériumok milyen okból termelnek toxikus szekunder metabolitokat, nincsenek adatok arra vonatkozóan, hogy a cianotoxinok milyen evolúciós előnyt biztosítanak a cianobaktériumok számára (Carmichael, 1992, Sivonen és Jones, 1999).

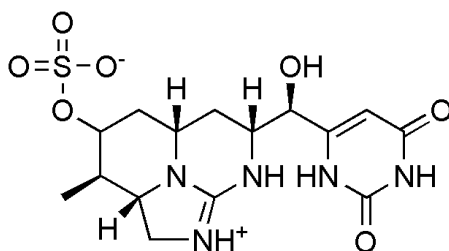
A természetes vizekben a cianotoxinok koncentrációja a cianobakteriális vízvirágzások során emelkedhet veszélyes szintre (Carmichael, 1994). A cianobakteriális vízvirágzások kialakulásának hátterében leggyakrabban a tavak eutrofizációja áll, ugyanis az eutrofizáció során a tavakban feldúsulnak a szervesanyagok, lehetővé téve a cianobaktériumok tömeges elszaporodását (Mur és mtsai, 1999). Az eutrofizáció a természetes vizeket érintő globális probléma, kialakulása a legtöbb esetben antropogén hatásoknak (műtrágyázás, szennyvíz, stb.) köszönhető (Smayda, 2008).

2.3. A cilindropermopszin

A cilindropermopszin (CYN) ciklikus alkaloid természetű cianotoxin. Elsőként a *Cylindropermopsis raciborski*-ban figyelték meg, majd később más cianobaktérium fajokban is megtalálták, mint az *Umezakia natans*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *A. flos-aquae*, *Lyngibia wollei*, *Anabaena lapponica*, és a *Raphidopsis curvata* (Banker és mtsai, 1997; Harada és mtsai, 1994; Spoof és mtsai, 2006; Li és mtsai, 2001; Preussel és mtsai, 2006). Mérgező hatására egy ausztráliai víztározóban kialakult vízvirágzás hívta fel a figyelmet, melynek során CYN került az ivóvízbe, és 148 ember betegedett meg (Griffiths és Saker, 2003). Potenciálisan CYN termelő cianobaktériumok - főként *Cylindropermopsis raciborskii* - tömeges elszaporodása, a trópusokon igen gyakori, azonban számos esetben a mérsékelt övi országokban is előfordult (Preussel és mtsai, 2006). Hazánkban is több esetben előfordult *Cylindropermopsis* vízvirágzás (Kovács és mtsai, 1999), azonban a CYN jelenlétét ezekben az esetekben nem sikerült kimutatni (Vasas és mtsai, 2002b). A nyílt vízben a CYN koncentrációja a nagyobb vízvirágzások során 12,4 µg l⁻¹ lehet (Rucker és mtsai, 2007). Falconer és mtsai (1999) szerint a szél hatására a partok mentén feltorlódó, vastag, cianobaktérium sejteket tartalmazó habban, felszíni cianobaktérium rétegben a cianotoxinok koncentrációja a nyílt vízben mért koncentrációhoz képest 1000 szer nagyobb lehet. A szerzők elsősorban a MCY-t vizsgálták, de az elvük más cianotoxinok esetén is alkalmazható.

A CYN szulfát csoportot tartalmazó triciklikus guanidino uracil származék, a szakirodalom az alkaloidok csoportjába a guanidin rész bázikus csoportja miatt sorolja (alkaloidok: növényi eredetű nitrogén tartalmú bázikus karakterű aromás vegyületek), azonban a CYN a szulfát csoport miatt ikerionos szerkezetű (Ohtani és mtsai, 1992; 2. ábra). A toxikus hatás kialakulásához, Banker és mtsai (2001) vizsgálatai szerint, az uracil rész—feltétlenül szükséges. A CYN vízben kiválóan oldódó viszonylag stabil molekula, cianobaktérium nyers kivonatban közvetlen napfény hatására gyorsan degradálódik, azonban a pH és a hőmérséklet változására a CYN nem érzékeny, a felezési idő 50 °C-on 8-10 hét. A természetes vizekben élő baktérium közösségek, úgy tűnik, nem képesek a CYN gyors bontására. Így elképzelhető, hogy a cianotoxin napfénynek kevésbé kitett vizekben (pl. nádasokkal borított part menti vizekben) hosszabb ideig megmaradjon (Chiswell és mtsai, 1999; Wormer és mtsai, 2008).

A CYN gátolja a fehérjeszintézist állati és növényi sejtekben, azonban a gátlás pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert (Froscio és mtsai, 2001; 2003; 2008; Metcalf és mtsai, 2004). Froscio és mtsai (2008) radioaktívan jelölt CYN segítségével vizsgálták a cianotoxin kötődését a riboszómához. Gélzsűrűségi kísérleteik során azt tapasztalták, hogy a CYN molekula 0,02 : 1 molarányban kötődik a riboszómákhoz, míg a riboszómális fehérjeszintézist gátló vegyületek mindig 1 : 1 arányban kötődnek. Emellett megfigyelték, hogy a csak kevés riboszómát tartalmazó frakciókban is nagy mennyiségben megtalálható a CYN. Mindezekből a szerzők arra következtettek, hogy a CYN nem közvetlenül a riboszómához kötődik, hanem a fehérje szintetizáló apparátus más elemeihez, valószínűleg az iniciációs, vagy az elongációs faktorokhoz. A CYN nem kompetitív módon gátolja az UMP (uridin monofoszfát) szintáz komplexet és ezáltal a pirimidin nukleotidok szintézisét (Reisner és mtsai, 2004). Runnegar és mtsai (1994) patkány hepatocita tenyészetben kimutatták, hogy a CYN gátolja a glutation szintézisét, azonban a szerzők nem tárgyalták részletesen a gátlás hátterében álló biokémiai változásokat. A CYN-ból a sejtekben, eddig ismeretlen szerkezetű, a CYN-nél sokkal toxikusabb vegyületek keletkeznek a méregtelenítésben résztvevő citokróm P-450 rendszer működése következtében, azonban a CYN és a belőle keletkező metabolitok fehérjeszintézist gátló hatása között nincs számottevő különbség (Humpage és mtsai, 2005; Norris és mtsai, 2002). A citokróm P-450 rendszer számos szekunder metabolitot úgy alakít át, hogy az reakcióképessé válik, és a DNS-hez, illetve a fehérjékhez kötődve úgynevezett adduktokat hoz létre (Mandl, 2002). Shaw és mtsai (2000) kimutatták, hogy a CYN a sejtekben képes ilyen komplexeket létrehozni a DNS molekulákkal.



2. ábra: A CYN szerkezeti képlete (Ohtani és mtsai, 1992, nyomán)

Az állati illetve az emberi szervezetben a CYN elsősorban a májat károsítja, de más szervekben is előidézi szövetkárosodást (Hawkins 1985). A CYN mérgezés jellemző tünetei, a Palm Island-en történt esetben, a májenzimek mennyiségének növekedése a vérben, a máj megnagyobbodása, véres vizelet, valamint véres széklet (Byth, 1980). A CYN centrilobuláris nekrozissal jellemezhető májkárosító hatása minden emlősben megfigyelhető (Seawright és mtsai, 1999; Bernard és mtsai, 2003; Griffiths és Saker, 2003; Humpage és Falconer, 2003), a májsejtek erőteljesen vakuolizálódnak, a sejtek közötti tér kitágul (Falconer és mtsai, 1999a). A CYN a vesét is károsítja, a nephrotubulusok proximális részén az epitél sejtek elpusztulnak, a glomerulusokban vörösvértestek jelennek meg (Falconer és mtsai, 1999a). Egerekben a toxin magzatkárosító hatása is ismert (Rogers és mtsai, 2007). A CYN kis dózisban hosszú időn keresztül adagolva, a vörösvértestek deformációját idézi elő egerekben (Suknik és mtsai, 2006). A CYN *in vitro* és *in vivo* kísérletekben DNS károsító hatásának bizonyult (Humpage és mtsai, 2000; Bazin és mtsai, 2010; Shen és mtsai, 2002). A CYN a CHO-K1 sejtekben mikrofilamentumok és a mikrotubulusok dezorganizációját, valamint a kromatin szerkezet megváltozását idézte elő (Gácsi és mtsai, 2009).

A növények esetében igen kevés tanulmány foglalkozott a CYN toxikus hatásaival, az adatok ráadásul ellentmondóak. Vasas és mtsai, (2002) mustár csíranövény tesztben vizsgálták a CYN-t, a cianotoxin gátolta a növények növekedését, az IC_{50} érték $18,2 \mu\text{g ml}^{-1}$. A *Hydrilla verticillata* növényekben a $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN-t tartalmazó *Cylindrospermopsis raciborskii* nyers kivonat enyhe növekedésserkentő hatásának bizonyult (Kinnear, 2008). A CYN növényekre gyakorolt citológiai hatásairól kevés adat áll rendelkezésre. Metcalf és mtsai (2004) a növényekben is kimutatták a CYN fehérjeszintézis gátló hatását.

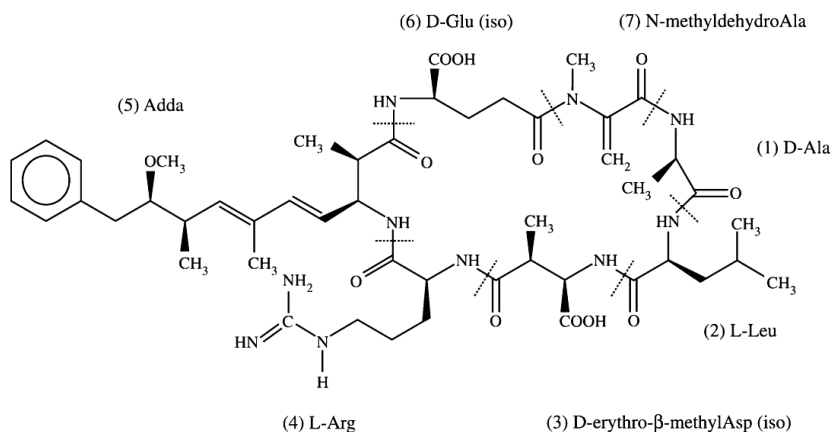
1. táblázat: a CYN hatásai	Makroszkópikus hatás	Mikroszkópikus hatás	Biokémiai hatás	Szerzők
Emberre és állatokra gyakorolt hatás			gátolja a fehérjeszintézist	Froscio és mtsai, 2001; 2004; 2008
			gátolja az UMP szintetáz, így a piridin nukleotidok szintézisét	Reisner és mtsai, 2004
			gátolja a glutation szintézist	Runnegar és mtsai, 1994
			a belőle keletkező metabolitok kovalensen kötődnek a DNS-hez	Shaw és mtsai, 2000
		a CHO-K1 sejtekben: mikrotubulusok és mikrofilamentumok dezorganizációja; kromatin szerkezet változások		Gácsi és mtsai, 2009
	májkárosító hatású	a májsejtek vakuolizálódnak, a sejtek közti tér kitágul		Falconer és mtsai, 1999a
Növényekre gyakorolt hatás	vese károsító hatású	nefrotubulusok nekrozisa		Falconer és mtsai, 1999a
			gátolja a fehérjeszintézist	Metcalf és mtsai, 2004
	gátolja a mustár csíranövények növekedését			Vasas és mtsai, 2002
	serkenti a Hydrilla verticillata növények növekedését			Kinnear, 2008

2.4. A mikrocisztinek

A mikrocisztinek (MCY) szintézisét legelőször a toxikus vízvirágzásokért leggyakrabban felelőssé tehető *Microcystis aeruginosa* toxikus törzseiben figyelték meg. Később számos más cianobaktérium nemzetségben találtak különféle MCY variánsokat, ilyen genusok a teljesség igénye nélkül pl. az *Anabaena*, a *Plankthotrix*, az *Oscillatoria*, az *Anabaenopsis*, az *Oscillatoria*, a *Nostoc*, a *Hapalosiphon* stb. (Carmichael, 1992, Skulberg és mtsai 1993, Sivonen és Jones, 1999). Sok szerző úgy véli, hogy a MCY-ek endotoxinok, a sejten belül találhatók a tilakoid membránhoz kötötten (Shi és mtsai, 1995). Koncentrációjuk az állóvizekben a nyár végi hidegebb időben a sejtek pusztulása következtében igen nagy lehet. Hazánkban több felszíni víztérben, így a Velencei-tóban és a Kis-Balatonban fordult elő rendszeres toxikus *Microcystis* vízvirágzás (Törökné Kozma és mtsai, 1986; Törökné Kozma és Mayer, 1988; Kós, 1995; Törökné Kozma és mtsai, 2000). A MCY viszonylag stabil vegyület, akár hónapokig is megmaradhat egy vízvirágzás után (Carmichael, 1994). A MCY koncentrációja a nyílt vizekben egy nagyobb vízvirágzás során a nM-os nagyságrendet is elérheti. Azonban a partok mentén, ahol a felgyülemlett sejtek vastag (akár több cm-es) réteget képeznek, a lokális MCY koncentráció értékek a nyílt vízben mérhetőnél akár 3-4 nagyságrenddel is nagyobbak lehetnek, 20 μM -os vagy nagyobb toxinkoncentrációk is előfordulhatnak (Falconer és mtsai, 1999; Máthé és mtsai, 2007)

A mikrocisztinek ciklikus heptapeptid szerkezetű cianobakteriális toxinok, felépítésükben a hagyományos L-aminosavak mellett D-aminosavak és különleges aminosavak, mint a hidrofób β -aminosav, a 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-dienoát (ADDA) és az N-metildehidroalanin (MDHA) is részt vesznek (3. ábra). Több mint 80 féle MCY ismeretes, melyek többsége toxikus, közöttük az eltérés főként az L-aminosavakban található. A MCY-LR esetében a 2. aminosav L-leucin, a 4. L-arginin (Botes és mtsai, 1985; Boaru és mtsai, 2005). A hatásmechanizmusukat tekintve, a MCY-ek a PP1 és PP2A típusú protein foszfatázok specifikus inhibitorai. A MCY-LR foszfatáz gátlásra vonatkozó IC_{50} értéke a legtöbb eukarióta szervezetben 0,1 és 0,25 nM között található (Wiegand és Pflugmacher, 2005). A MCY-ek képesek kovalensen kötődni a MDHA karbonil csoportján keresztül a PP1 katalitikus alegységéhez és PP2A-hoz, ez a hatás nem szükséges a protein foszfatáz aktivitás gátlásához. A MCY-ek gátló hatásáért az ADDA rész a

felelős, mert a hidrofób szénlánc behatol a protein foszfatázok aktív centrumába (Goldberg és mtsai, 1995).



3. ábra: A MCY szerkezeti képlete (Wiegand és Pflugmacher, 2004)

A MCY reaktív oxigén formák képződését indukálja, a kutatók szerint a MCY megköti a redukált glutationt, így a sejtek nem képesek a szabadgyököktől megszabadulni, ennek következtében a ROS mennyisége megnő (Boucha és Maatouk, 2004).

A MCY-LR élettani hatásai az állati és humán szervezetben elég jól ismertek, ugyanis a haszonállatok körében viszonylag gyakran előfordulnak fatális kimenetelű mérgezések, ráadásul egy braziliai dialízis állomáson emberek halálát okozták a toxikus heptapeptidek (Jochimsen és mtsai, 1998).

A MCY-LR toxikus hatásai elsősorban a májat és az emésztőrendszert érintik, a hepatociták és az enterociták már kis cianotoxin koncentráció esetén is képesek a MCY-LR-t felvenni, mivel az úgynevezett szerves anion transzport fehérjék (OATP) megtalálhatók bennük. Ezek a fehérjék felelősek az epesavak transzportjáért, de a MCY-LR-t is képesek a sejtbe juttatni (Daily és mtsai, 2010). Más sejttípusok is képesek felvenni a MCY-eket, de csak abban az esetben, ha a letálisnál jóval nagyobb koncentráció-tartományokban vannak jelen (Alverca és mtsai, 2009; Lankoff és mtsai, 2003). A MCY-LR mérgezés jellemző tünetei, a fentieknek megfelelően, a gastroenteritisz és a májdiszfunkció, melynek hátterében a máj szöveti struktúrájának felbomlása következtében létrejövő bevérzések állnak (Carmichael, 1994; Billam és mtsai, 2008). A MCY-LR kis koncentrációban serkenti a sejtek osztódását (Lankoff és mtsai 2003), sok szerző szerint a serkentő hatás a MAP kináz

kaszkádrendszerek stimulációja révén valósul meg (Gehring, 2004). A előbbiek miatt sok szerző úgy gondolja, hogy a MCY szubletális koncentrációban karcinogén hatású lehet (Nishiwaki 1992, Ueno és mtsai, 1996).

A MCY hatására a sejtek citoszkeletonja dezorganizálódik, a jelenség mindhárom komponens: a mikrofilamentumokat, a mikrotubulusokat és az intermediér filamentumokat egyaránt érinti, ennek hatására a sejtek összeesnek, szövetkárosodást eredményezve. Megfigyelhető a citoszkeletális proteinek hiperfoszforilációja, (Toivola és Eriksson, 1999, Wickstrom és mtsai, 1995). CHO-K1 sejtekben a MCY-LR a mitotikus orsó dezorganizációját és rendellenes mitózist, valamint a sejtek apoptózist okozta (Lankoff és mtsai, 2003). A MCY apoptogén hatásáért feltehetően a reaktív oxigénformák (ROS) mennyiségének a növekedése a felelős (Campos és Vasconcelos, 2010).

A MCY a növényekre is toxikus hatású, a *Microcystis aeruginosa* nyers kivonat és a tisztított MCY-LR hatására a mustár csíranövények növekedésgátlását, az antocián tartalom csökkenését és az egyszálú DNS-t hasító enzimek aktivitásának a megnövekedését figyelték meg (Kós és mtsai, 1995; M-Hamvas és mtsai, 2003). A *Phaseolus vulgaris* levelekben a MCY gátolta a fotoszintézist (Abe és mtsai, 1996). A vízinövények a MCY mérgező hatásának leginkább kitett növények. A *Lemna gibba*, a *Ceratophyllum demersum*, a *Phragmites australis*, a *Spirodela oligorrhiza* és más vízinövények bizonyítottan képesek felvenni a MCY-eket, és a cianotoxin hatására csökken a növekedésük, szövettani elváltozások jelennek meg bennük és klorotikussá válnak. Egyes vízinövényeknél (*C. demersum*, *P. australis*) a MCY-LR hatására megemelkedik az oxidatív stressz kapcsolt enzimek aktivitása: növekvő peroxidáz és glutathion-S-transzferáz aktivitásokat mértek. Ráadásul, ezekben a növényekben a glutathion a MCY-LR-el konjugálódott, amely arra utal, hogy detoxifikáló mechanizmusok indukciója következett be (Saqrane és mtsai, 2007; Máthé és mtsai, 2007; Mitrovic és mtsai, 2005; Pflugmacher és mtsai, 2001; Pflugmacher, 2004; Romanowska-Duda és Tarczyska, 2002).

A MCY citológiai hatásai növényekben kevésbé ismertek. Dohány BY-2 illetve *Arabidopsis* sejttenyészetekben a MCY megnövelte a reaktív oxigénformák mennyiségét, és a sejtekben apoptózist utaló elváltozásokat indukált, a kromatin marginálisan kondenzálódott és a sejtmagok összezsugorodtak (Yin és mtsai, 2005; 2006).

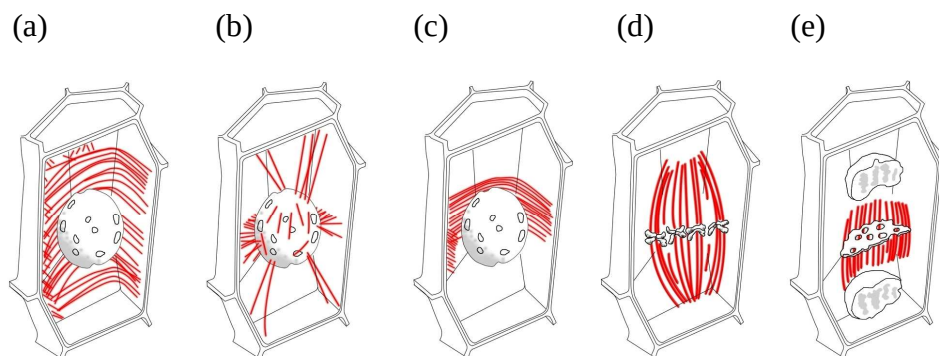
2. táblázat: A MCY hatásai	Makroszkópikus hatás	Mikroszkópikus hatás	Biokémiai hatás	Szerzők
Emberre és állatokra gyakorolt hatás			Az 1 és 2 A típusú protein foszfatázok specifikus gátlószere	Wiegand és Pflugmacher, 2005; Goldberg és mtsai, 1995
	bevérvések keletkeznek a májban és a bélben	A májsejtek citoszkeletonja dezorganizálódik, a szöveti struktúra megbomlik,		Carmichael, 1994; Billam és mtsai, 2008
		Kis koncentrációban serkenti a CHO-K1 sejtek és a májsejtek osztódását	A MAP kináz kaskádrendszer stimulálja	Lankoff és mtsai 2003 Gehringer, 2004
	Kis koncentrációban, hosszú időn keresztül adagolva májdaganatok kialakulásához vezethet			Nishiwaki 1992, Ueno és mtsai, 1996
		mitotikus rendellenességek; apoptózis (CHO-K1-ben)		Lankoff és mtsai 2003
		A citoszkeleton mindhárom elemét befolyásolja	A citoskeletális elemek hiperfoszforilációját okozza	Toivola és Eriksson, 1999, Wickstrom és mtsai, 1995
Növényekre gyakorolt hatás			ROS képződést indukál	Campos és Vasconcelos, 2010
			Az 1 és 2 A típusú protein foszfatázok specifikus gátlószere	Wiegand és Pflugmacher, 2005 Máthé és mtsai, 2009
	A mustár és a nád növények növekedését gátolja	gyökér nekrózis;		Kós és mtsai, 1995; M-Hamvas és mtsai, 2003; Máthé és mtsai, 2007
		Apoptotikus jeleket mutató sejthalált indukál, a dohány BY2 tenyészetekben	ROS képződést indukál	Yin és mtsai, 2005; 2006

2.5. A növényi mikrotubuláris citoszkeleton

A mikrotubulusok az eukarióta szervezetek sejtjeiben előforduló citoszkeletális elemek, számos a sejtek számára nélkülözhetetlen funkciót látnak el, mint a sejtmegosztódás, a vezikuláris transzport, a sejtek alakjának illetve polaritásának meghatározása (Dowling és Nogales 1998). A mikrotubulusok minden eukarióta sejtben megtalálható konzervált GTP kötő fehérjékből, α - és β -tubulinból álló 13 db párhuzamos protofilamentumból épülnek fel, 25-37 nm-es vastagságú cső alakú struktúrák. Jellemzőjük, hogy polárisak, rendelkeznek „+” (β) és „-” (α) véggel (Dowling és Nogales 1998). Rendkívül dinamikus struktúrák, állandóan lebomlanak a „-” végen, vagy felépülnek a „+” végen, illetve gyakran a két jelenség egyszerre megy végbe, ilyenkor beszélhetünk „taposómalom” effektusról. A dinamikus instabilitás lehetővé teszi, hogy a mikrotubulusok viszonylag gyorsan átrendeződjenek, illetve, hogy aktív mozgást végezzenek (Nogales, 1999). A mikrotubulusokhoz számos különféle MAP (mikrotubulus asszociált protein) kapcsolódik. Egyesek a mikrotubulusok stabilitását szabályozzák, mások keresztkötések kialakításával képesek mikrotubulus kötegeket létrehozni, ezek mellett ismertek a motor proteinek, amelyek a mikrotubulusok mentén a „+” vagy a „-” vég felé vándorolnak (Nogales, 1999). A legtöbb eukarióta sejtben jól körülhatárolható organellumok, centroszómák végzik a mikrotubuláris citoszkeleton szervezését, a növényekben azonban nem található mikrotubulus szervező organellum, a mikrotubulusok nukleációját a sejtmag membrán illetve a sejtmembrán közelében elhelyezkedő viszonylag kevésbé ismert fehérje komplexek végzik, amelyek γ -tubulint tartalmaznak (pl. γ -tubulin ring complex; Stoppin-Mellet és mtsai, 1999).

A növényi sejtekben legalább öt féle mikrotubuláris struktúra található meg (4. ábra). Az interfázisban és a differenciált sejtekben kortikális mikrotubulusokat (CMT) találhatunk (Erhardt és Shaw, 2006). A kortikális mikrotubulus rendszer a növekedés tengelyére merőleges, ferde vagy spirális lefutású, egymással párhuzamos mikrotubulus kötegekből épül fel (4. a ábra). A CMT orientációja azonban számos stimulusra megváltozhat, pl. hormonhatásokra illetve számos stressz faktor hatására, és a tengellyel párhuzamossá válhat (Yuan és mtsai, 1994). A CMT feladata a sejtek direkcionális növekedésének szabályozása, a legelfogadottabb elmélet szerint a kortikális mikrotubulusok mentén épülnek fel a cellulóz mikrofibrillumok a sejten kívül, így a növekedés gyakorlatilag csak a tengely mentén valósulhat meg (Paradez és mtsai,

2006). Az osztódó sejtekben a CMT-t felváltja a sejtmaghoz kapcsolódó endoplazmatikus mikrotubulus struktúra (EMT; 4. b ábra), amelyből később kialakul a preprofázisos köteg (PPB; 4. c ábra). A PPB szerepe sok szerző szerint az osztódási sík kijelölése (Dhonukshe és mtsai, 2005). A PPB eltűnése után kialakul a mitotikus orsó (4. d ábra), majd a testvér kromatidák szegregációja után a PPB által kijelölt helyen megjelenik a fragmoplaszt (4. e ábra), amelynek szerepe, hogy az új sejthatárt képező vezikulumokat a sejtosztódás síkjába szállítsa (Wright és Smith, 2007).



4. ábra: a növényi sejtekben található mikrotubuláris struktúrák. (a): CMT. (b): EMT. (c): PPB. (d): mitotikus orsó. (e): fragmoplaszt. A mikrotubulusok piros színnel láthatók (Goddard és mtsai, 1994 valamint Dhonukshe és mtsai, 2004 nyomán)

A növényekben a mikrotubuláris rendszer szabályozása kevésbé ismert, mint az állatok esetében. Számos adat arra utal, hogy a mikrotubuláris citoszkeleton szabályozásában a protein foszforiláció fontos szerepet játszik. A *ton2* gén egy PP2A regulációs alegységet kódol, mutációja a kortikális mikrotubulusok random orientációját okozza és meggátolja a PPB kialakulását (Traas és mtsai, 1995; Camilleri és mtsai, 2002). Hasonló elváltozásokat tapasztaltak PP2A gátlószerek (pl. kallikulin-A, endothall) hatására, azonban ilyen esetekben a mitotikus orsó és a fragmoplaszt is érintettnek bizonyultak (Ayaydin és mtsai, 2000). A fenti eredmények arra utalnak, hogy a tubulin vagy valamely eddig ismeretlen MAP foszforilációja csökkenti a mikrotubulusok stabilitását, ezáltal a sejtek képesek azokat átrendezni a sejtosztódás lebonyolításához szükséges struktúrákká (Wright és Smith, 2007). Fontos megemlíteni, hogy maguk a tubulin fehérjék számos poszttranszlációs módosuláson eshetnek át, mint a C-terminális poliglutamiláció, a detiroziniláció, illetve a deglutamiláció, az acetiláció, valamint a foszforiláció, azonban az

előbbieik szerepe a mikrotubuláris rendszer működésének szabályozásában egyelőre kevésbé ismert (Smertenko és mtsai, 1997)

Viszonylag kevés növényi mikrotubulus asszociált fehérje ismert, azonban jelentőségük nem elhanyagolható. A MAP65 fehérje család tagjainak fontos szerepük van a mikrotubulus kötegek kialakulásában, a *mor-1* (mikrotubule organization 1) illetve a *tmbp200* (200 kDa tobacco microtubule binding protein) gének termékei a XMAP 215 fehérjével rokon mikrotubulus stabilizáló fehérjék. A *mor-1* mutációja a kortikális mikrotubulusok diszrupcióját és a PPB eltűnését idézi elő, valamint rövid, gyakran szétesett fragmoplasztokat eredményez (Hussey és Hawkins, 2001). Említést érdemel továbbá a *tangled* gén terméke amely részt vesz a fragmoplaszt szerveződésében, a MAP190 fehérje, amely a mikrotubulusokat az aktin filamentumokkal kapcsolja össze, valamint a kinezin fehérjék, amelyeknek fontos szerepet tulajdonítanak a mitotikus orsó szerkezetének kialakításában és a kromoszómák pozicionálásában (Ambrose és Cyr, 2007).

2.6. A növényi sejtciklus szabályozása

A sejtciklus stádiumait és azok szerepét tekintve, a növényi sejtek nagyon hasonlóak a többi eukarióta szervezet sejtjeihez. A G1 fázisban a sejtek előállítják az osztódás lebonyolításához szükséges erőforrásokat, és eléri a kritikus sejtméretet, az S fázisban a DNS replikálódik, a G2 fázisban a sejt ellenőrzi a kromatin állomány integritását, megkezdődik a mikrotubuláris rendszer átrendeződése, majd az M fázisban lejátsszódik az osztódás (Darvas és László, 1999).

A sejtciklus szabályozásában a növények esetén is a ciklinek és a ciklin dependens kinázok (CDK) játszanak központi szerepet. A sejtciklus különböző stádiumainak megfelelő ciklin fehérjék tranziensen expresszálódnak, mennyiségük megnő, majd lecsökken, a jelenségért a ciklin fehérjék indukciója, majd azok ubiquitin mediált lebontása a felelős (Erdei, 2004). A ciklinek a ciklin dependens kinázokhoz kapcsolódnak, amelyek foszforilálják a sejtciklus lebonyolításához szükséges fehérjéket. A növényi sejtciklus szabályozásában fontos szerepet kapnak a citokininek, és a fény cirkadián változása is (Laureys és mtsai 1998; Menges és mtsai, 2003; Doerner, 2007; Bouget és mtsai 2007).

A sejtciklus lebonyolításához elengedhetetlenül szükséges új fehérjék szintézise. A növényi sejtciklus transzkripciós szintű szabályozása számos eltérést mutat más eukarióta szervezetekhez képest, éppen ezért viszonylag kevésbé ismert, azonban tartalmaz konzervált, az emlősökben

is megtalálható elemekkel homológ komponenseket, mint például a retinoblasztóma (Rb) fehérjével homológ retinoblastoma related (RbR) fehérje, és az E2F fehérjék. A G1/S átmenetnél, az RbR fehérje kapcsolódik az E2F transzkripció faktorhoz és gátolja annak működését. Megfelelő mitogén stimulusok és elegendő ciklin D felgyülemzése esetén aktiválódik a CDKA-CycD (ciklin dependens kináz komplex) és hiperfoszforilálja a RbR fehérjét, amely elengedi az E2F-t és így megkezdődhet az S fázis specifikus fehérjék (ciklinek és egyéb proteinek) kifejeződése (Shen, 2007). Kifejezetten növényi komponensek a HEX illetve OKT motívumok, amelyek a hiszton gének promóter régiójában találhatóak, és fontos szerepük van a hiszton fehérjék kifejeződésének szabályozásában az S fázisban, továbbá az M specifikus aktivátor (MSA) motívumok, amelyekhez Myb típusú transzkripció faktorok kapcsolódhatnak, szerepük a G2/M átmenet szabályozása (Doerner, 2007).

A sejtciklus foszforilációs szabályozása az eukarióta szervezetekben erősen konzervált. A növényekben eddig 6 féle CDK-t írtak le, amelyeket CDKA-tól CDKF-ig neveztek el. A CDKA szerepe a G1/S fázis szabályozása, a CDKB a G2/M átmenetenél működik. A CDKD és CDKF ciklin dependens kináz aktiváló kinázként működnek. A növényekben a ciklinek számos csoportja ismert. A G1/S átmenet vezérlésében az A típusú ciklinek és a B típusú ciklinek vesznek részt, a növényekben eddig még nem sikerült E típusú ciklineket kimutatni. A G2/M átmenetnél a B típusú ciklineknek van kitüntetett szerepe (de Jager és mtsai 2005). Egyes CDK-ciklin komplexek a PPB-n mások a mitotikus orsóban vagy a fragmoplasztban lokalizálódnak, az anafázisban CDK-ciklin komplexek helyezkednek el a kromoszómákon, tehát feltehetőleg direkt szerepük van a mikrotubuláris citoskeleton szervezésében és a kromatin elválásában (Mironov és mtsai, 1999). A növényekben is megtalálhatóak a MAP kináz kaszkádok, amelyeket a CDK-ciklin komplexek indítanak el, és fontos szerepük van az M fázis lebonyolításában. Az NPK1 (dohány) és az ANP1, 2, 3 (*Arabidopsis*) proteinek MAP-kináz-kináz kináz fehérjék amelyeket a ciklin dependens kinázok képesek foszforiláció segítségével módosítani. Az NPK1/ANP fehérjék foszforilálják a MAP-kináz kinázokat (NQK1 dohányban illetve ANQ1 *Arabidopsis*-ban) amelyek azután aktiválják a MAP kinázokat (NRK1/ANR1) amelyek részt vesznek a mitotikus apparátus szabályozásában. A MAP-kinázok fontos célpontjai a MAP65 fehérjék (Sasabe és Machida, 2007). A növényekben is megtalálhatóak a G2/M ellenőrzési pontot működtető wee1 kináz és cdc25 tirozin foszfatáz enzimek homológjai (de Jager és mtsai, 2005). Élesztő sejtekben kimutatták, hogy a protein foszfatáz 2A-nak fontos szerepe van a sejtciklus szabályozásában, gátolt működés esetén a sejtek korán lépik át

a G2/M határt, teljes blokkolás esetén azonban a sejtek megrekednek a G2 fázisban (Jiang, 2006), hasonló mechanizmus növényeknél is elképzelhető.

A sejtciklus szabályozásában igen fontos szerepe van az ubiquitin mediált proteolízisnek, növényekben is ismert az APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) fehérje komplex, amely egy E3 ubiquitin ligáz és fontos szerepe van a kromoszómákat összetartó fehérjék lebontásában és ezáltal az anafázis elindításában. Növényekben megtalálták az ugyancsak ubiquitin ligáz aktivitással rendelkező SCF komplexet, amelynek szerepe a ciklinek lebontása, miáltal biztosítja a sejtciklus egyirányúságát (Doerner, 2007; Yamamoto és mtsai, 2004).

2.7. A sejthalál növényekben

A klasszikus nézet szerint az eukarióta sejtekben a sejthalálnak két alapvető formája ismert. Az egyik a nekrozis, amely a sejt tolerancia küszöbét meghaladó stressz hatására kialakuló, a citoplazmamembrán integritásának megszűnésével járó passzív sejthalálforma. A másik a programozott sejthalál, amely során valamely stimulus hatására a sejtben olyan aktív ATP igényes folyamatok zajlanak le, amelyek végeredménye a sejt elpusztulása a membrán integritásának megszűnése nélkül (Wyllie és mtsai, 1980). A programozott sejthalál egy speciális esete az apoptózis, amelynek során a DNS internukleoszómális hasítása valósul meg a kromatin kondenzációja mellett, később a sejtmag szétesik. Az apoptózis karakterisztikus jele a gélelektroforézis során megjelenő DNS létra (Wyllie és mtsai, 1984).

A programozott sejthalált eredetileg állatokban írták le (Kerr és mtsai, 1972), ahol fontos szerepe van az ontogenezisben (Brill és mtsai, 1999), és az immunrendszer működésében. Az autoreaktív antitestet termelő limfociták valamint a transzformálódott és vírussal fertőzött sejtek elpusztítása ilyen módon valósul meg (Giovanetti és mtsai, 2008). A javíthatatlan DNS károsodást szenvedett sejtek eliminációja apoptózissal történik (Meulmeester és Jochemsen 2008)

A növények fejlődése és életműködései szempontjából is fontos a programozott sejthalál. Ilyen módon alakulnak ki a tracheák és a lizigén aerenchimák (Dangl, 1995, Evans, 2003). Az aleuron réteg sejtjei is hasonló módon pusztulnak el (Bethke és mtsai, 1999). A növényi szövetek előregedése aktív folyamat, amelyben a programozott sejthalál fontos szereppel bír. A patogének által kiváltott hiperszenzitív reakció, amely a patogének toxinjai által indukált sejthalál, a sejt aktív részvételével

történik, tehát a programozott sejthalálra emlékeztet (Wang és mtsai, 1996).

Számos esetben a növényi programozott sejthalál az apoptózis jellegzetes tüneteit mutatja, így például a paradicsom levelén kiváltott hiperszenzitív reakció során (Greenberg, 1997), az aerenchima képződés kukoricában (Ewans, 2003), vagy sok esetben a szenescencia (Noodén és mtsai, 1997). Az állatokhoz hasonlóan az UV fény hatására bekövetkező DNS károsodás, a sejtek apoptotikus elpusztulását eredményezi a növényekben (Danon és Galois, 1998). A nekrózis és a programozott sejthalál között nem húzható éles határ, előfordul, hogy apoptózisra utaló jeleket, pl: a kromatin állomány feldarabolódását a sejt nekrotikus jellegű elpusztulása követi (Kosslak és mtsai, 1997).

Az apoptózis szabályozása állatokban elég jól ismert. Kiválthatják a megfelelő ligand kapcsolódása esetén (pl: Tumor nekrózis faktorok) a DED (death effektor domain) doménnel rendelkező membrán receptorok, amelyek a kaspázokat aktiválják, vagy DNS károsodása esetén a p53 és a hasonló fehérjék. Végso soron endonukleázok szintetizálódnak, amelyek végrehajtják a DNS degradációját (részletek: White 1996).

Növényekben az apoptózis jellegű sejthalál szabályozására vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésre. A jelen dolgozat szempontjából lényeges, hogy a növényekben is új fehérjék szintézise, illetve az újonnan szintetizálódott fehérjék mintázatának megváltozása szükséges a programozott sejthalál kivitelezéséhez (Vacca és mtsai, 2004). Ismert továbbá, hogy a protein foszforilációnak is fontos szerepe van a növényi apoptózis szabályozásában (He és mtsai, 1996; Kuo és mtsai, 1996).

3. Anyag és módszer

3.1. A cilindropermopszin tisztítása

A kísérleteinkhez szükséges CYN-t, egy az 1994-évben az izraeli Kinneret-tóban jelentkezett *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) vízvirágzásból származó cianobaktérium törzsből (ILC-164) tisztítottuk a Vasas és mtsai, (2002) által közölt módszer szerint. A cianobaktérium fonalakat kötött nitrogénnel dúsított Allen táptalajban neveltük (Allen, 1968) 28 °C hőmérsékleten, állandó, $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erősségű megvilágítás mellett 4 literes lombikban. A növekedéshez szükséges széndioxidot a tenyészet állandó buborékoltatásával biztosítottuk. A 10 napig nevelt tenyészeteket centrifugáltuk (10000 x g, 10 perc, Beckman Avanti J25 centrifuga, szobahőmérséklet), majd a keletkezett üledéket -20 °C hőmérsékleten tároltuk. A fagyasztott, mintegy 20-30 g sejtet felolvasztottuk, majd két ismétlésben újrafagyasztottuk és hagytuk felengedni. A kivonáshoz a sejteket egy éjszakán át 90 % (v/v) metanolban tartottuk (1:3 nedves tömeg:térfogat) folyamatos rázatás mellett 4 °C-on. Centrifugálás után az üledéket még kétszer átmostuk 100 ml 90 % (v/v) metanollal majd az elegyített felülúszókat 40 °C hőmérsékleten bepároltuk (Büchi Rotavapor-R). A bepárolt mintát 50 % (v/v) etanolban feloldottuk, majd 20 perc 20000 x g-n történő centrifugálás után a felülúszót gélikromatográfia (Toyopearl HW-40; 80 x 3 cm oszlop) segítségével frakcionáltuk. A frakciókat mustár csíranövény teszt (BGST, Kós és mtsai, 1995) segítségével ellenőriztük. A toxikus frakciókat elegyítettük, majd a töményítés után szemipreparatív C-18-as HPLC oszlopra vittük fel. Az elúciót 1-10 % (v/v) majd 10-30 % (v/v) metanol grádiens segítségével végeztük. A preparátum tisztaságát HPLC és kapilláris elektroforézis módszerekkel ellenőriztük, Vasas és mtsai (2002a, 2004) módszere szerint.

3.2. A mikrocisztin-LR tisztítása

A MCY-LR-t a *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 jelű cianobaktérium törzs tenyészetéből tisztítottuk. A törzs egy 1992-es Velencei-tavi vízvirágzásból származik. A sejteket 28 °C hőmérsékleten $160 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

fényerősség mellett neveltük Allen táptalajban. A toxin tisztítását Kós és mtsai, (1995) módosított módszere alapján végeztük. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttük. A sejteltáráshoz a sejteket kétszer lefagyasztottuk, hagytuk felengedni, majd az üledék tömegének megfelelő, kétszeres mennyiségű vízben vettük fel. A kivonást és a fehérjementesítést 45 mM perklórsavval végeztük 16 órán keresztül 0 °C-on. A kivonat felülúszóját 10 N KOH oldattal pH 7.5-re állítottuk be. 2 óra 0 °C-on történő inkubálás után a kivonatot centrifugáltuk (17400 x g, 10 perc, 4 °C). A felülúszót C18-as töltet (Waters Sep-Pak) segítségével sótalanítottuk. Az apoláris tulajdonságú mikrocisztinek kötődnek a C18-as töltethez, míg a poláros szennyeződések desztillált vizes, ill. 10 % metanolos mosással eltávolíthatók. A mikrocisztineket 70 %-os metanollal eluáltuk a töltetről. Az eluátumot Büchi vákumbepárló segítségével bepároltuk, majd 5 mM 7,5-ös pH-jú Tris-HCl pufferben szuszpendáltuk fel. A cianotoxin végső tisztítását DE-52 oszlopon végeztük. Az eluált mintasorozat elemzése során három cianotoxin elválását észleltük. A legelőször eluálódott toxin a MCY-LR. A MCY-LR-t tartalmazó eluátumokat C18-as töltet segítségével sótalanítottuk. A kinyert mikrocisztin-LR koncentrációját és tisztaságát fotometriás (240 nm), HPLC (magas nyomású folyadékkromatográfia), valamint kapilláris elektroforézis módszerek segítségével állapítottuk meg (Vasas és mtsai, 2004).

3.3. A nádnövények előállítása szövettenyésztéssel

A kísérletekben felhasznált, kalluszból regenerált axenikus „mini” nádnövényeket Máthé és munkatársai (2000) módszere alapján hoztuk létre. A kalluszok eredetileg Debrecen-Józsáról származó, a Debreceni Egyetem Növényteni Tanszékén fenntartott axenikus nádnövények nóduszaiból készültek. A nádkalluszokat B5 vitaminokkal (Gamborg és mtsai, 1968) dúsított, 2 % (m/v) szacharózt (Reanal) tartalmazó 0,8 % (m/v) agarral (Difco) szilárdított Murashige-Skoog (Murashige és Skoog, 1962) táptalajon (MS+B5) tartottuk fenn, amelyhez 4,5 μM 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavat adtunk. A kalluszokat növényregenerálás céljából hormonmentes szilárd MS+B5 táptalajra helyeztük. A növényregeneráló táptalajon kinőtt 1-2 cm-es hosszúságú hajtással rendelkező növényeket folyékony MS+B5 táptalajban neveltük tovább 24 ± 2 °C hőmérsékleten. Az optimális növekedés érdekében 14/10 órás fotoperiódust alkalmaztunk, 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fényerősség mellett. A szövettani vizsgálatok szükségessé tették legalább 0,3 mm vastag gyökök jelenlétét, amelyet úgy értünk el,

hogy a táptalajhoz a növények nevelése és a cianotoxin kezelések során 2,7 μM α -naftil-ecetsavat (Reanal) adtunk. A szövettenyésztett nádnövények gyökérzetének szöveti struktúrája a vadon élő nádnövényekhez viszonyítva csak a méretarányokban tér el (lásd az irodalmi áttekintésben).

3.4. A nádnövények toxinkezelése és a növekedés vizsgálata

A cianotoxin kezeléseket 160 mm magas és 15 mm átmérőjű kémcsövekben végeztük 2 ml folyékony, 2,7 μM α -naftil-ecetsavat tartalmazó MS+B5 táptalajban Máthé és mtsai (2007; 2009) által leírt módszer szerint. Egy kémcsőben egyszerre egy növényt kezeltünk. A kezdeti hajtáshosszúság minden esetben 20-30 mm volt, a gyökerek közül a leghosszabbak minden növényen 10-20 mm-esek voltak. A CYN kezelések 10 napig tartottak 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -től 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -ig terjedő (1,2-96,4 μM) toxinkoncentrációk mellett. A MCY-LR kezelések időtartama 2-20 napig terjedt, az alkalmazott MCY-LR koncentrációk a 0,1 - 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -es (0,1-40,2 μM) tartományba estek. A növekedés vizsgálatához minden esetben legalább három kísérletet végeztünk, a kontroll és CYN kezelt növényekben lemértük a gyökerek és a hajtások hosszát, megszámoltuk az újonnan képződött gyökerek számát a kísérlet kezdetén és a végén. A szórások kiszámítását és az adatok grafikus megjelenítését a Sigma Plot 8.0 program segítségével végeztük.

3.5. A hisztokémiai, a citológiai és a szövettani vizsgálatok

A sejt- és szövettani vizsgálatokhoz a hosszmetaszeteket mikrotómmal készítettük (Leica Jung Histoslides). A gyökércsúcs darabokat előzőleg 16 órán keresztül fixáltuk 4 % formaldehid tartalmú 1 $\times$ PBS-ben (phosphate buffered saline), ezután 2 $\times$ 5 percig mostuk 1 $\times$ PBS-ben. A szöveti struktúra jobb megőrzése érdekében a szövetdarabokat 5 órára 40 % szacharózt tartalmazó 1 $\times$ PBS-be helyeztük. A metszéshez a szövetdarabokat szövet fagyasztó médiumba ágyasztuk be (TBS), majd széndioxid segítségével lefagyasztottuk és a nád gyökércsúcsokból 20 μm -es metaszeteket készítettünk.

A mikrotubuláris citoszkeletont a Zhang és mtsai, (1992) által közölt és általunk módosított módszer szerint tettük láthatóvá. A metaszeteket 20 percig permeabilizáltuk 0,5 % (v/v) Triton X-100-at tartalmazó PBS-sel, majd 16 óráig festettük Cy3 konjugált monoklonális anti β -tubulin elleni

ellenanyaggal (Sigma-Aldrich), amelyet, 1 % (m/v) borjú szérum albumin (BSA) tartalmú 1×PBS-ben oldottunk. A citoszkeleton megjelölése után a metszeteket 2×5 percig tartó PBS-es mosást követően 1 órán keresztül $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ diamidino-fenilindollal (DAPI, Merck) festettük a kromatin láthatóvá tétele érdekében.

A genotoxikus hatás kimutatásását Roche-tól beszerzett TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) készlet segítségével végeztük a gyártó által leírt és általunk módosított módszer szerint. A fixálást és a metszetek készítését a mikrotubulus jelölésénél leírtak szerint végeztük. A 20 percig tartó permeabilizálás után (0,5 % (v/v) Triton X-100 1×PBS-ben, laborhőmérséklet), a metszeteket 30 percig 37 °C hőmérsékleten 10 mM Tris-HCl-ben, pH. 8,0 oldott 20 $\mu\text{g/ml}$ Proteináz-K-val (Fermentas) kezeltük. Pozitív kontrollként néhány metszethez DNáz enzimet adtunk (Fermentas) amelyet 50 mM (pH 7,5) Tris-HCl-el hígítottunk 10-szeresére, a kezelést 45 percig végeztük 37 °C-os hőmérsékleten. A jelöléshez 1× PBS-sel 5-szörösére hígított TUNEL-enzim oldatot 1 : 9 arányban elegyítettük az 1×PBS-sel 3-szorosára hígított TUNEL-label oldattal, a jelölést 2,5 óráig végeztük 37 °C-on. A TUNEL enzim FITC-el jelöli meg a DNS végeket, azonban az ebből származó fluoreszcencia detektálása a sejtek autofluoreszcenciája miatt nehéz, ezért 2-szeresére hígított alkalikus foszfatáz konjugált FITC elleni ellenanyaggal (Sigma-Aldrich) 16 órán keresztül jelöltük a mintákat 20 °C hőmérsékleten. Az előhívást 100 mM pH 8,0 Tris-HCl ben oldott Fast-Red (Sigma) segítségével végeztük (fél tabletta ml-enként).

A mikroszkópos vizsgálatokat OLYMPUS Provis AX70-fluoreszcens mikroszkóppal, hagyományos világos látóterű mikroszkóppal, illetve Zeiss LSM 510 konfokális pásztázó lézer mikroszkóppal végeztük. A gerjesztő hullámhosszak: a hagyományos fluoreszcens mikroszkóp esetén a Cy3 konjugált tubulin elleni ellenanyaggal jelölt mikrotubulusokat 540–580 nm-es, az autofluoreszcenciát 450–480 nm-es, a kromatin állományt 320–360 nm-es filterek segítségével vizsgáltuk. A konfokális lézermikroszkópos vizsgálatokhoz kétféle gerjesztő lézert használtunk: a DAPI festés értékeléséhez 351/364 nm hullámhosszúságú UV lézert, a Cy3 konjugált anti β -tubulin esetén a 543 nm-es zöld lézert. A fluoreszcenciát 560–615 nm és 385–470 nm sávszűrők beiktatásával vizsgáltuk. A gyökércsúcs hosszmetsetekből 1-1,5 μm vastagságú optikai szeleteket vettünk fel.

A sejtek osztódóképességének vizsgálatakor minden osztódási stádiumot külön megszámloltunk, az adatokból kifejeztük a mitotikus indexet az alábbi képlet segítségével:

mitotikus index = osztódó sejtek száma/összes sejtek száma $\times 100$.

Kiszámoltuk az egyes mitotikus stádiumokban lévő sejtek arányát. A sejtek számolásakor figyelmen kívül hagytuk a nyugvó centrum, a kialakuló szállító szövet, és a gyökérsüveg sejtjeit. A mitotikus aktivitás mellett a rendellenes mitózisban lévő sejtek arányát, a dezorganizált mikrotubulusokkal rendelkező és a TUNEL-pozitív sejteket tartalmazó gyökércsúcs merisztémák, ill. egyéb gyökér fejlődési zónák számát is vizsgáltuk. A TUNEL reakció megfigyelése során nem vettük figyelembe azokat a sejteket/szöveteket, amelyek természetes apoptotikus folyamaton esnek át (vízszállító elemek, aerenchyma), ennek megfelelően csak a csúcsmerisztémát, a kéregparenchymát (aerenchymával nem rendelkező fejlődési zónában) és a fiatal gyökerek rizodermiszét vizsgáltuk. Amennyiben mégis vizsgáltunk olyan fejlődési zónákat, ahol tracheák, tracheidák vagy átszellőztető alapszövet volt jelen (pl. elágazási zóna, oldalgökörek kilépési helye), ott az ilyen sejteket/ szöveteket nem vettük figyelembe.

A kísérleti adatok szórásának kiszámítását és az adatok grafikus megjelenítését a Sigma Plot 8.0 program segítségével végeztük.

3.6. A β -tubulin vizsgálata Western blot segítségével

A mikrotubuláris citoszkeletont felépítő tubulin mennyiségének kimutatására Western blot technikát alkalmaztunk, Hurkman és Tanaka (1986) módszere alapján. A kontroll és CYN kezelt nádnövényeket folyékony nitrogén segítségével lefagyasztottuk, majd $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött dörzsmozsárban elporítottuk. Az elporított mintához még a felolvadás előtt $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hevített extrakciós puffert adtunk. Az extrakciós puffer $62,5\text{ mM}$ Tris-HCl-t ($\text{pH } 6,8$), $2\text{ \%}$ (m/v) SDS-ot (nátrium-dodecil-szulfát), $10\text{ \%}$ (v/v) glicerolt, $5\text{ \%}$ [v/v] β -merkaptóetanolt (Sigma-Aldrich), és $0,5\text{ \%}$ (v/v) proteáz gátló oldatot (Roche) tartalmazott. A mintákat 3 percig tartottuk $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, hogy a lehető legnagyobb hatásfokkal vonjuk ki a fehérjéket. A mintákat ezután 10 percig centrifugáltuk $20000 \times g$ -n, és a felülúszót megtartottuk. A fehérjetartalom méréséhez a mintákat Everitt és Maksimova (1984) módszere alapján készítettük elő. A felülúszókból vett minták fehérjetartalmát $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra hűtött acetonnal kicsaptuk, hogy eltávolítsuk a SDS-ot, majd centrifugálás után a fehérjéket $0,25\text{ N}$ NaOH-dal visszaoldottuk. A fehérje koncentrációt Bradford (1976) módszerével mértük meg. A többi felülúszót a Western blothoz használtuk fel. Az elektroforézis során mintánként $25\text{ }\mu\text{g}$ fehérjét és a molekulatömeg markert (Fermentas) $10\text{ \%}$ -os poliakrilamid gélen futtattuk Laemmli

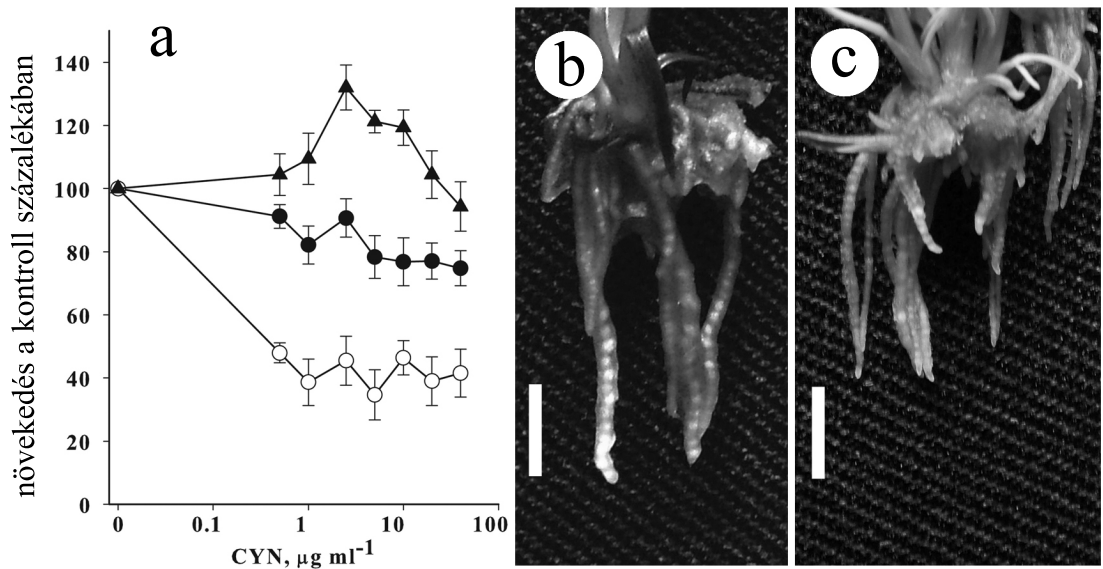
(1970) módszere szerint. A fehérjét elektroblot módszer segítségével nitrocellulóz membránra (Millipore) vittük át. A membránt ezután 2 % BSA-t tartalmazó mosó pufferben ($1\times$ PBS, 0.1 % [v/v] Tween-20) 2 órán keresztül blokkoltuk. A jelöléshez nyúlban készült, a β -tubulin konzervált C terminális peptid szakasza elleni poliklonális ellenanyagot (Abcam) használtunk, mint elsődleges antitest, amelyet $2000\times$ -re hígítottunk 1 % (m/v) BSA tartalmú mosópufferrel. A másodlagos, kecskében készült nyúl IgG elleni alkalikus foszfatáz konjugált ellenanyagot (Abcam) $1500\times$ -ra hígítottuk az elsődleges jelölésnél használt pufferrel. A jelölések között, illetve azok után a membránt háromszor mostuk a mosópufferrel. Az előhíváshoz az alkalikus foszfatázok hatására kékes csapadékot létrehozó NBT-BCIP-t (Fluka) használtunk, amelyet 200 szorosára hígítottunk 0,5 mM MgCl_2 -t tartalmazó pH 9,5-ös 100 mM-os Tris-HCl pufferrel.

4. Eredmények

4.1. A cilindropermopszin a nád növekedésre gyakorolt hatásai

A szövettenyésztett nádnövények toxinérzékenységének megítélése érdekében a CYN kezelések esetén mind a hajtásra, mind a gyökérre gyakorolt növekedésgátló hatást megvizsgáltuk. Tapasztalataink szerint a 10 napos CYN kezelés nem gátolta jelentősen a hajtás növekedését, amely $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN esetén is csak $21 \pm 5 \%$ -al csökkent a kontrollhoz viszonyítva. A gyökerek növekedését a 10 napos CYN kezelés, a vizsgált koncentráció tartományban, jelentősen csökkentette. A CYN 50 %-os gátló koncentrációja (IC_{50}) $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ a gyökerekben. ($1,2 \mu\text{M}$). A gyökérnövekedést gátló hatás, már $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($6 \mu\text{M}$) CYN hatására elérte a maximális $65 \pm 5 \%$ értéket (5. ábra).

Az újonnan képződött gyökerek száma $0,5$ és $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($1,2$ és $24 \mu\text{M}$) koncentráció tartományban a CYN hatására jelentősen növekedett, a hatás $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ -es ($6 \mu\text{M}$) toxin koncentrációnál érte el a maximumát, ahol $44 \pm 6 \%$ -al több új gyökér képződött, mint a kontroll növényekben (5. ábra). Nagyobb koncentrációknál a gyökérképződést serkentő hatás csökkent, $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($48 \mu\text{M}$) CYN esetén az új gyökerek képződése a kontroll szintjére esett vissza (5. a ábra).

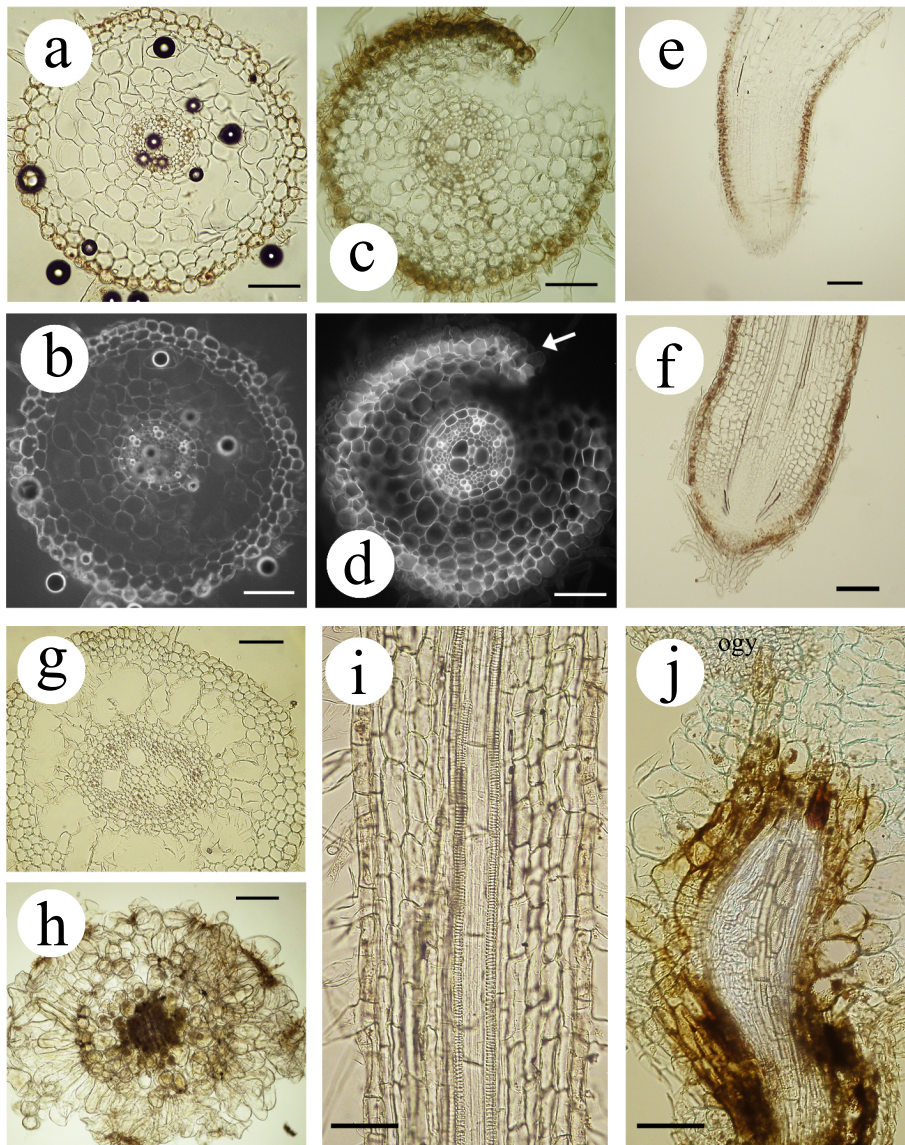


5. ábra: A CYN növekedésre gyakorolt hatásai. (a): A hajtáshossz (fekete kör), a gyökérhossz (üres kör) és a gyökérszám (fekete háromszög) kontrollhoz viszonyított növekedése. (b): kontroll nádgyökerek. (c): $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt nádgyökerek. Lépték: 10 mm

4.2. A CYN szövettani hatásai

A CYN jól látható szövettani elváltozásokat okozott a nád gyökerekben. A gyökerek több régiójából (gyökércsúcs, elongációs zóna, elágazási zóna) készített hosszmetseteken megfigyeltük, hogy míg a kontroll gyökerekben a rhizodermisz és a kéregparenchima sejtek tengely irányban megnyúltak, addig az $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($12 \mu\text{M}$) és ennél nagyobb koncentrációjú CYN kezelése hatására számos gyökércsúcsban a sejtek tengely irányú megnyúlás helyett radiális expanziót mutattak. A jelenséget a gyökércsúcsi merisztéma sejtekben és differenciált sejtekben is megfigyeltük (6. f ábra). Sok gyökércsúcs a kontrollhoz képest (6. e ábra) láthatóan vastagabb volt a toxin kezelt növényekben (6. f ábra).

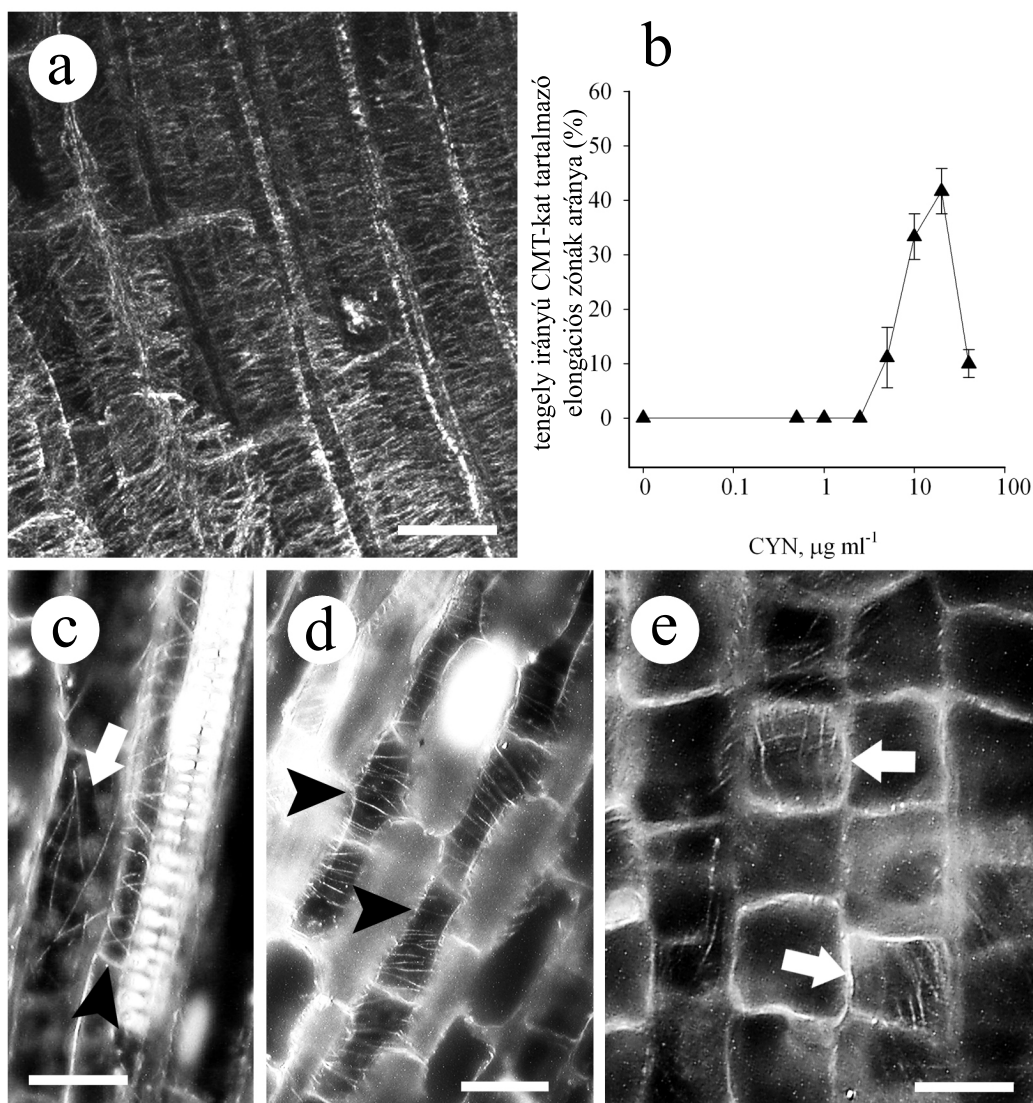
A kereszt- illetve hosszmetsetek vizsgálata során, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($24 \mu\text{M}$) CYN kezelést követően, szöveti nektrózisokat figyeltünk meg az összes gyökérszónában. A gyökércsúctól 10-15 mm-re készített metsetekben csak az epidermiszben láttunk nektrózisokat (6. c ábra). A gyökér idősebb régióiban a nektrózisok a mélyebb szövetekben is megjelentek (6. j ábra). A nekrotikus sejtek jól láthatóan barna színűek, bennük az autofluoreszcencia megszűnt (6. d ábra). A kontroll gyökerekben nem találtunk szöveti nektrózisokat, sem a rhizodermiszben sem a mélyebb szövetekben (6. a, b, g, i ábra). Számos gyökérben a sejtek, a szöveti struktúrát megbontva kalluszos burjánzásba kezdtek, szélsőséges esetben az egész cortex helyét kalluszos szövet vette át (6. h, j ábra). A gyökerek elágazási zónájában (a gyökércsúctól 20 mm-re) és attól proximálisan elhelyezkedő méretező szellőző járatokat (aerenchima), a CYN kezelt növények egy részében, kallusz szerű szövet töltötte ki (6. h, j ábra). A kontroll gyökerek differenciáltabb zónáiban minden esetben szabályos lizigén aerenchimákat láttunk (6. g ábra). Fontos megemlíteni, hogy a kalluszosodás és a nektrózis, annak ellenére, hogy sok helyen látható a kalluszosodó szövetek nektrózisa, láthatólag nem egymásból következő jelenségek, ugyanis a kalluszosodó szövetek nem mindig nektróizálódnak, másrészt a nektrózis olyan szövetrészekben is megtalálható, ahol nincs kallusz képződés.



6. ábra: A CYN szövettani hatásai nád gyökerekben. (a-b): Kontoll gyökér keresztmetszet az elongációs zónából, világos látóterű (a), és autofluoreszcens képe (b). (c-d): rhizodermisz nekrotizisok (barna) 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökerek elongációs zónájában, világos látóterű (c), és autofluoreszcens (d) képen. A nyíl az autofluoreszcencia megszűnését mutatja a nekrotikus szövetben. (e): kontroll gyökércsúcs hosszszelvény. (f): 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt megduzzadt gyökércsúcs benne deformált sejtekkel. (g): kontroll gyökér átszellőztető alapszöve a teljesen kifejlett gyökérrégióban. (h): a kéregszövet kalluszos burjánzása egy 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökér kifejlett régiójában. (i): Differenciált gyökérszóna hosszszelvénye kontroll gyökérből. (j): A kéregszövet nekrotizisa, és az aerenchimák kalluszos eltömődése 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökér elágazási zónájában (ogy: oldalgyökér). Lépték: 150 μm .

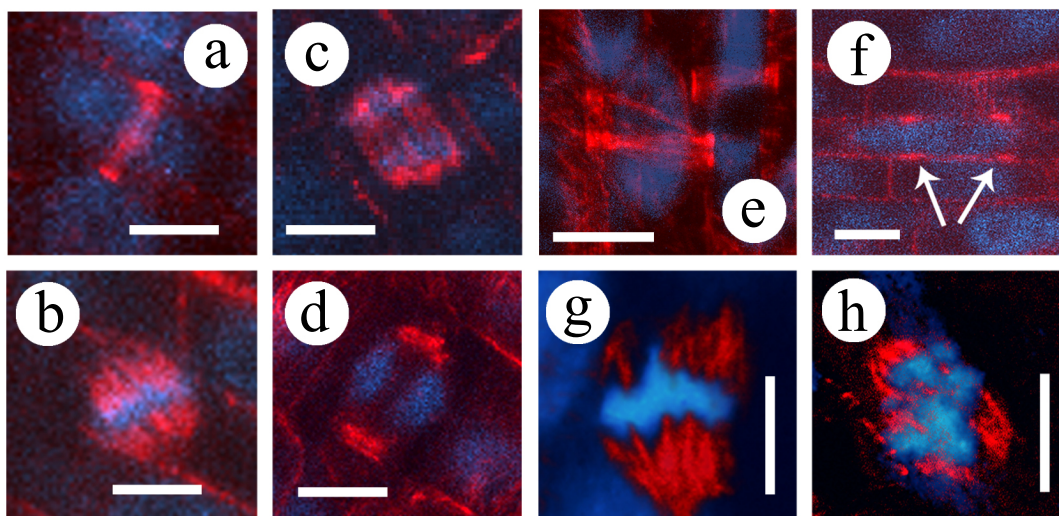
4.3. A CYN mikrotubulus rendszerre és sejtosztódásra gyakorolt hatásai

A mikrotubuláris citoszkeleton CYN hatására bekövetkező változásait fluoreszcens mikroszkóp segítségével tanulmányoztuk. A CYN kezelés következtében az interfázisos és a differenciált sejtekben a mikrotubuláris citoszkeleton dezorganizációjának két aspektusát figyeltük meg, amelyek 5-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -es toxinkoncentráció tartományban jelentkeztek. Egyrészt, számos differenciált és interfázisos sejtben a mikrotubulus kötegek denzitása a kontrollhoz képest látványosan csökkent (6. c, d ábra), másrészt, gyakran (de nem minden esetben) a CMT denzitás csökkenésével együtt a mikrotubulusok a kontroll sejtekben tapasztalható transzverz lefutás helyett longitudinális orientációt mutattak (7. b, c, e ábra). A reorientált mikrotubulusokat tartalmazó sejtek, a longitudinális növekedés helyett, laterális növekedést mutattak. A kontroll sejtekben a kortikális mikrotubulus hálózat minden esetben sűrű szabályos transzverz vagy ferde lefutást mutatott (7. a ábra).

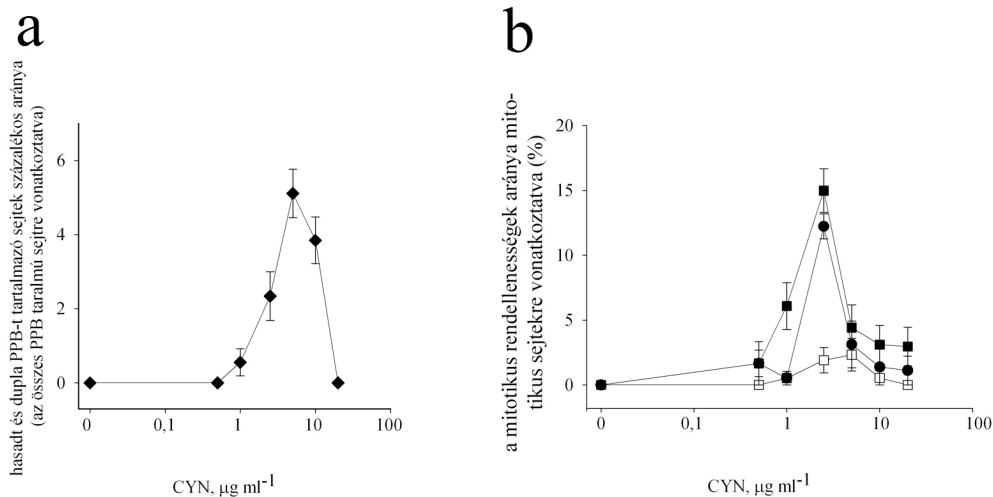


7. ábra: A CYN hatása a kortikális mikrotubulusok (CMT) szerveződésére az elongációs zónában. (a): kontroll sejtek CMT hálózata (b): az elongációs zónában a hossztengety irányában lefutó CMT-kat tartalmazó gyökek arányának változása a toxinkoncentráció függvényében. (c): 10 napos $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelés hatására gyűrűlt és átrendeződött kortikális mikrotubulusok. (d): kis denzitású CMT hálózat $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökek elongációs zónájában a kortexben. (e): reorientálódott CMT $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ kezelt gyökek kéregszövetében, a sejtek megnyúlásos növekedése csökkent, ezért izodiametrikusak. Lépték: $25 \mu\text{m}$. Nyilak: reorientált mikrotubulusok; Nyílhegyek: csökkent denzitású mikrotubulus hálózat.

A mitotikus sejtek mikrotubuláris citoszkeletonja számos eltérést mutatott $0,5\text{-}10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ($1,2\text{-}24\text{ }\mu\text{M}$) CYN hatására. Az osztódásban résztvevő mikrotubuláris struktúrák rendellenességeit az összes mitotikus stádiumban megfigyeltük. A profázist megelőző stádiumban a kettős vagy hasadt preprofázisos kötegeket figyeltünk meg, amelyek a kontrollban soha nem jelentek meg (8. e, f ábra). $5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ($12\text{ }\mu\text{M}$) CYN kezelés hatására a preprofázisos sejtek mintegy 6%-ában figyeltünk meg hasonló elváltozásokat (9. a ábra). A metafázisban a CYN a mitotikus orsó dezorganizációját okozta, feldarabolódott illetve tripoláris orsók jelentek meg (8. g ábra). A szétesett mitotikus orsók eredményeként a kromatin szétválasztása és az azt követő citokinezis a legtöbb esetben nem megy végbe szabályosan. A CYN kezelés hatására számos telofázisos sejtben szétesett fragmoplasztot, valamint sok esetben a fragmoplaszt síkjában maradt kromatin állományt figyeltünk meg (8. h ábra). A mitotikus rendellenességek legnagyobb számban az $5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ($12\text{ }\mu\text{M}$) CYN kezelés következtében jelentek meg, ahol az összes osztódó sejtek több mint 15 %-a mutatott valamilyen mitotikus rendellenességet (9. b ábra). A kontroll gyökerekben egyáltalán nem találtunk hibás mitózisokat. A kontroll sejtekben szabályos PPB-t, hézagmentes kompakt bipoláris metafázisos és anafázisos orsókat, valamint szabályos fragmoplasztokat láttunk (8. a, b, c, d ábra).

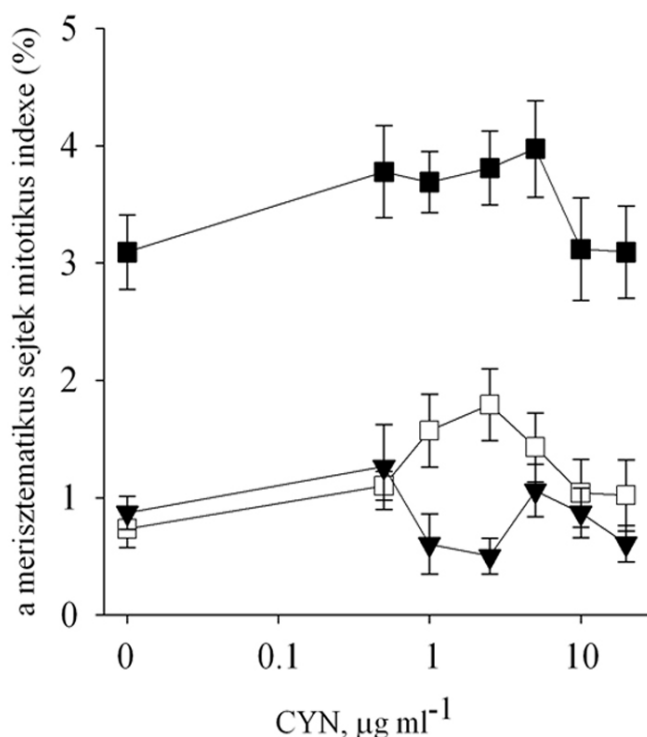


8. ábra: A CYN hatására kialakuló mitotikus rendellenességek. (a): kontroll profázis, a preprofázisos köteggel (PPB). (b): kontroll metafázis. (c): kontroll anafázis. (d):kontroll telofázis . (e): hasadt PPB 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökércsúcsban. (f): kettős preprofázisos köteg, 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökérben. A nyilak jelzik a PPB-ket. (g) tripoláris metafázisos orsó (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN). (h) Hibás telofázis, középen maradt kromatin állománnyal. Lépték: 10 μm . Kék színnel jelöltük a DAPI festett kromatint, pirossal a mikrotubuláris citoszeleket.



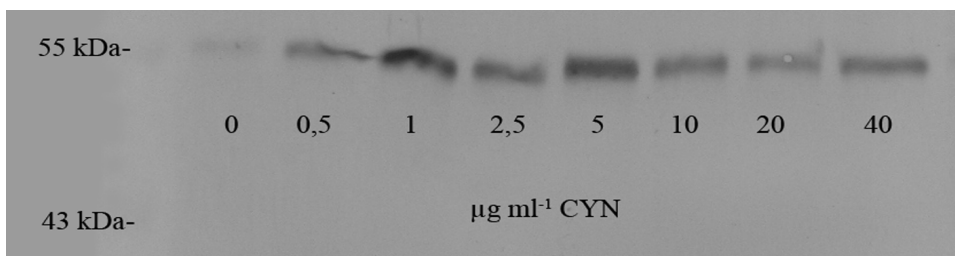
9. ábra: A CYN hatásai a mikrotubuláris citoszelekre az osztódó nádgyökér sejtekben. (a): A hibás PPB-k arányának változása CYN kezelés hatására (b): A CYN által okozott mitotikus elváltozások arányának változása a toxinkoncentráció függvényében, a fekete négyzet az összes mitotikus rendellenességek, az üres négyzet a hasadt PPB-k, a fekete kör késői mitózist érintő elváltozások arányát jelzi.

A CYN-t $0,5-5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($1,2-12 \mu\text{M}$) koncentráció tartományban alkalmazva az osztódó sejtek arányának növekedését okozta. A hatás $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($12 \mu\text{M}$) toxinkoncentrációnál érte el a maximumát, ahol a kontrollhoz képest mintegy 30 %-al (a kontrollt 100 %-nak véve) nőtt az osztódó sejtek száma. Magasabb toxinkoncentrációknál a mitotikus index a kontroll szintjére esett vissza. A mitotikus indexet stádiumonként vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy $1-5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($2,4-12 \mu\text{M}$) koncentráció tartományban a CYN hatására megnőtt a korai mitózisban, azaz preprofázisban és profázisban tartózkodó sejtek aránya, míg a metafázisban lévő sejtek száma csökkent (10. ábra).



10. ábra: A CYN hatása a sejtek osztódóképességére a nád gyökércsúcsokban. A fekete négyzet a mitotikus indexet, a fehér negyzetek a korai mitózisok arányát, a fekete háromszögek a metafázisok arányát jelzik.

A CYN hatására bekövetkező CMT denzitás csökkenés és reorientáció, valamint a mitotikus apparátus dezorgaizációjának hátterében álló biokémiai változások jobb megértése érdekében Western blot módszerrel vizsgáltuk a sejtekben található β -tubulin mennyiségét. Az egész nád növények fehérjekivonataiban az adott antitesttel jelölődő β -tubulin mennyisége a sejtekben látványosan növekedett, 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelésnél mutatta a legnagyobb értéket (11. ábra). Mivel a citológiai és hisztológiai vizsgálatokban elsősorban a gyökök különböző fejlődési zónáit tanulmányoztuk, a Western blot kísérleteket gyökök fehérjekivonataival is elvégeztük, és az egész növény fehérjekivonatával azonos eredményeket kaptunk (a gyökérkivonatokkal végzett Western blot kísérleteket itt nem mutatjuk be).



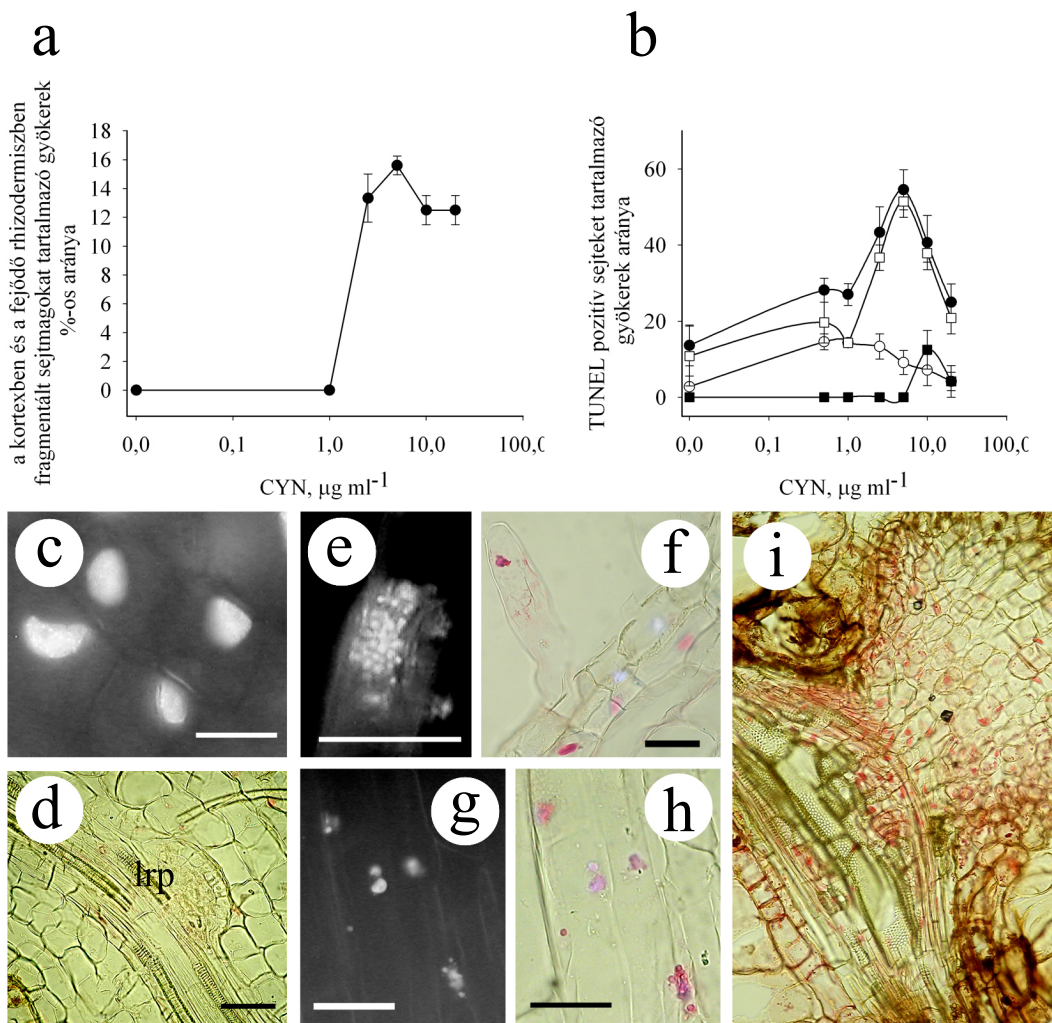
11. ábra: A nád növényekből készült fehérjekivonat β -tubulin tartalmának Western blot analízise.

4.4. A CYN a kromatin szerkezetre gyakorolt hatásai

Az 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -nél nagyobb koncentrációjú CYN-nel kezelt növényekben apoptózisra utaló jeleket tapasztaltunk. A kromatin szerkezet DAPI festéssel történő vizsgálatakor az elongációs zónában fragmentált kromatinállományú sejteket találtunk. A hatás maximuma 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (12 μM) CYN koncentrációnál látható, ahol a gyökök több mint 18 %-a tartalmazott az elongációs zónában fragmentált sejtmagokat. (12. a, e, g ábra) Megjegyzendő, hogy kontroll gyökökben egyáltalán nem találtunk fragmentált kromatint (12. a, c ábra).

A sejtmagok TUNEL módszerrel történő vizsgálata a DNS-en keletkezett nick-ek kimutatását teszi lehetővé (Che és mtsai, 1999). Kísérletünkben a sejtmag fragmentációt kiváltó (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ azaz 2,4 μM feletti) CYN kezelések esetén számos sejtben találtunk TUNEL pozitív sejtmagot, a fejlődő kéregben, a rhizodermiszben és a fejlődő oldalgökökben. Az összes szövetrészt vizsgálva az 1-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN

koncentrációknál a TUNEL pozitív sejteket tartalmazó gyökerek aránya megnőtt, a maximális hatást $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációnál tapasztaltuk, ahol a gyökerek közel 55 %-a tartalmazott TUNEL pozitív sejtmagokat, majd $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN koncentrációnál ez az arány a kontroll szintjére esett vissza (12. b ábra). A gyökerek mintegy 15 %-ában a kontroll esetén is találtunk TUNEL pozitív sejteket. A fejlődő kéreg az $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökerek kb 50 %-ában, míg a kontroll gyökerek 10 %-ában tartalmazott TUNEL pozitív sejtmagokat (12. b, h ábra). A rhizodermiszben is megjelentek a DNS hasítást elszenvedő sejtek, a hatás mértéke viszont kisebb volt, mint a kortex esetén. A hatás a maximumát ebben az esetben $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelésnél érte el, ahol a gyökerek 10 %-a tartalmazott TUNEL pozitív sejteket a rhizodermiszben, a kontrollban a gyökerek alig 5 %-a tartalmazott ilyen sejteket (12. b, f ábra). A sejtmagok DNS állományának degradációja, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelés hatására, a fejlődő oldalgyökerek merisztematikus szöveteiben is megjelent, a gyökerek 10 %-ában találtunk TUNEL pozitív sejteket (12 b, i ábra). A kontroll oldalgyökerekben a sejtek DNS állománya intakt maradt (12. d ábra).

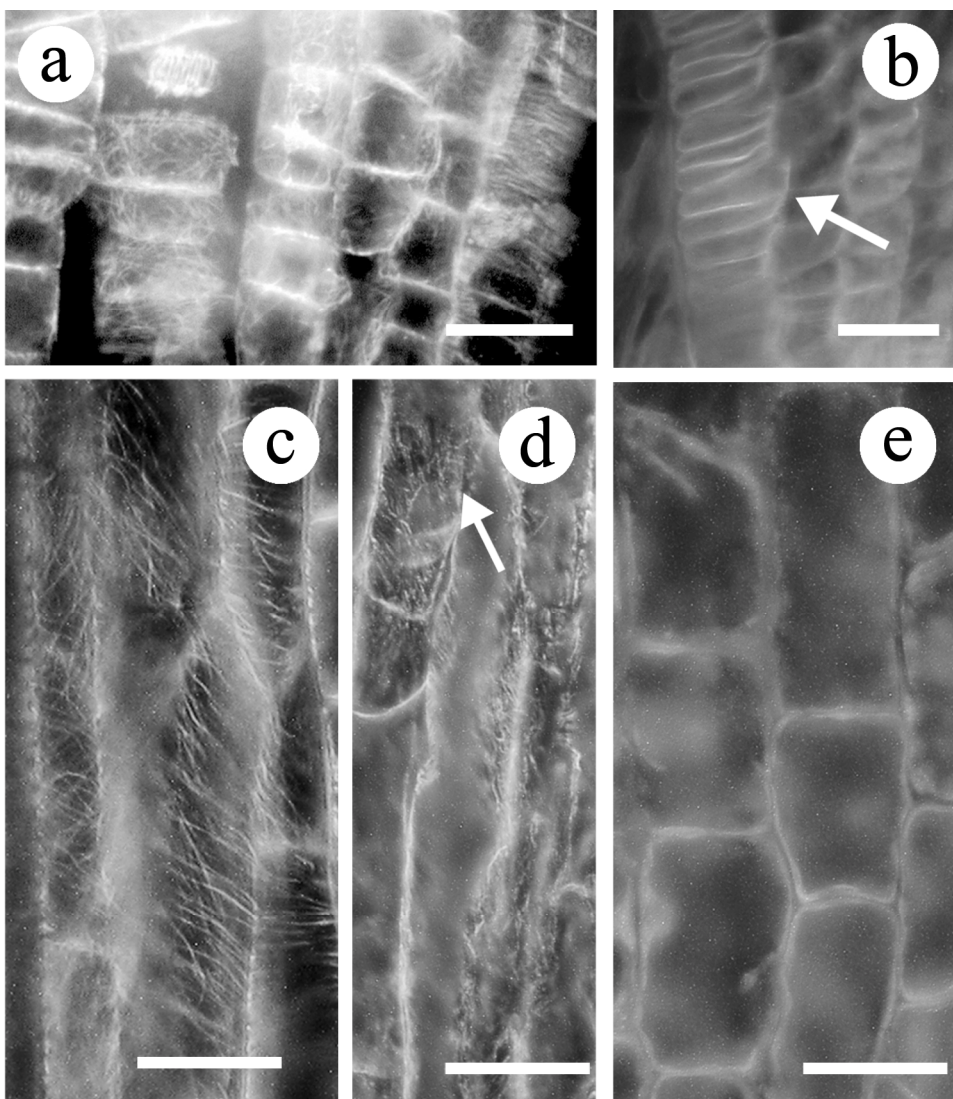


12. ábra: A CYN hatása a kromatin szerkezetére a nád gyökök sejtjeiben. (a): A fragmentált sejtmagok aránya a kortexben és a rhizodermiszben. (b): A TUNEL pozitív sejtmagokat tartalmazó gyökök aránya. Az üres karika a rhizodermiszben, az üres négyzet a kéregben, a fekete négyzet az oldalgökökben, a fekete kör a bármely szövetrészben TUNEL pozitív sejteket tartalmazó gyökök arányát jelzi. (c): DAPI festett kontroll kéregsejtek. (d): Kontroll TUNEL jelölt gyökér benne fejlődő oldalgökökkel (lrp: oldalgökök primordiumok). (e): Szétesett sejtmagot tartalmazó rhizodermisz sejt 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökérben. (f): TUNEL pozitív sejtek 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökök rhizodermiszében és kérgében. (g): Szétesett sejtmagok 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelt gyökök kéreg sejtjeiben. (h): A (g) ábrán látható sejtek TUNEL képe. (i): TUNEL pozitív sejteket tartalmazó oldalgökök 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelés után, az oldalgökök kilépésénél jól látható nekrotikus foltok jelentek meg. Lépték: 30 μm .

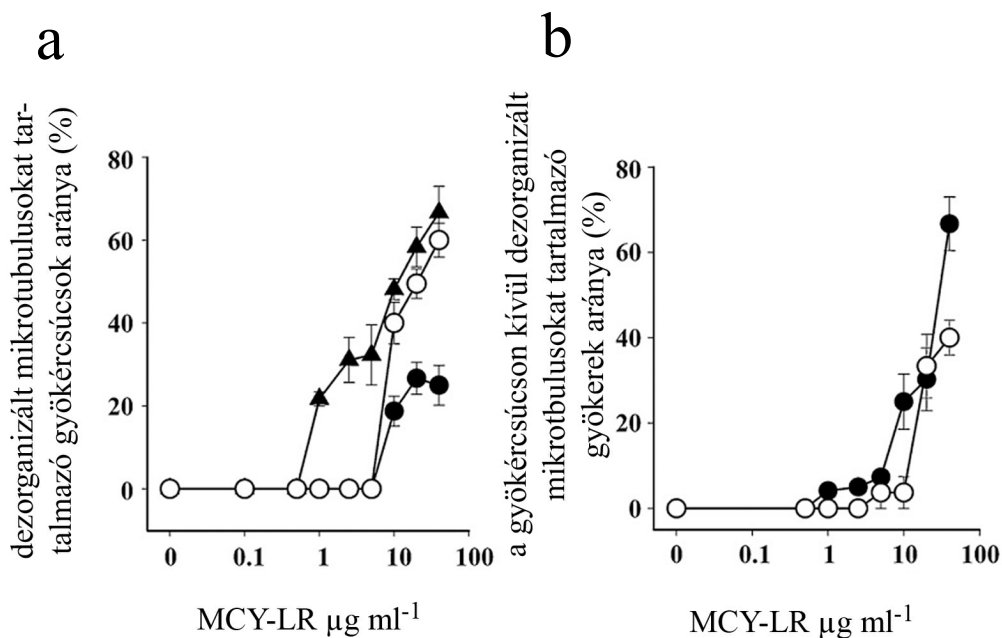
4.5. A MCY-LR mikrotubuláris citoszkeletonra gyakorolt hatásai

A nagy koncentrációjú MCY-LR kezelés hatására számos gyökérben, a merisztematikus és differenciált szövetekben a mikrotubuláris citoszkeleton dezorganizációját figyeltük meg. A sejtekből gyakorlatilag teljesen eltűntek a kortikális mikrotubulusok. A kontrollban látható szabályos ferde vagy transzverz lefutású kortikális mikrotubulus kötegek (13. a, c ábra) helyett a mikrotubulus rendszer részleges dezorganizációját (13. d ábra), majd a citoplazma diffúz festődését tapasztaltuk (13. b, e ábra). A mikrotubuláris citoszkeleton eltűnését gyakran a sejtek laterális expansziója követte (13. b, e ábra).

Az elsődleges gyökércsúcsokban a 2-5 napig kezelt gyökerekben a mikrotubulusok eltűnését $10\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ($10\ \mu\text{M}$) feletti MCY-LR koncentrációknál tapasztaltuk. Hosszabb távú kezelések esetén (10 nap) a mikrotubuláris citoszkeleton rendellenességei már $1\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ($1\ \mu\text{M}$) MCY-LR hatására megjelentek (14. a ábra). Az oldalgyökerek érzékenyebbnek bizonyultak a MCY-LR-re, $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ($5\ \mu\text{M}$) MCY-LR már két napos kezelést követően a kortikális mikrotubuláris rendszer eltűnését okozta (14. b ábra). Az elongációs és az elágazási zóna differenciált szöveiben a kortikális mikrotubuláris rendszer dezorganizációja már $1\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ($1\ \mu\text{M}$) MCY-LR-el 2 napig kezelt gyökerekben megjelent (14. b ábra), a mikrotubulusok depolimerizálódtak vagy a kontroll sejtektől eltérően szabálytalan csomós szerkezetűvé váltak (13. d, e ábra).

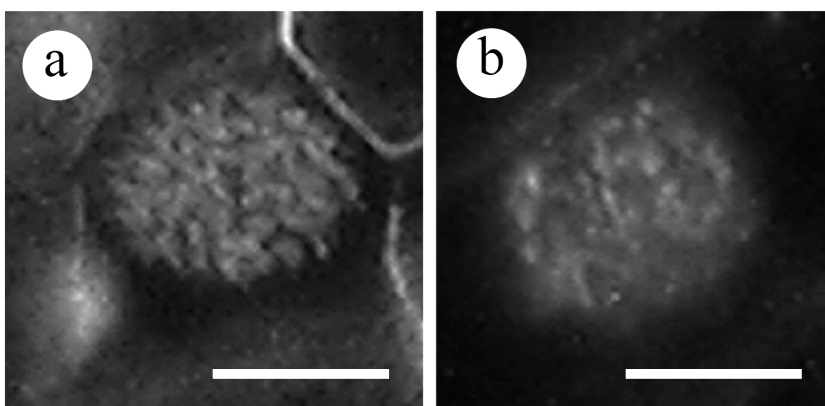


13. ábra: A CMT hálózat dezorganizációja a MCY-LR kezelés hatására. (a): kontroll gyökércsúcs. (b): 20 napos, 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelt gyökércsúcs. A nyíl a depolimerizált tubulint tartalmazó oldal irányban expandálódott sejteket mutatja. (c): kontroll elongációs zóna szabályos kortikális mikroubulusokkal. (d): dezorganizált CMT-k. (20 nap 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR). (e): depolimerizált tubulint tartalmazó elongációs zóna (10 nap 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR). Lépték: 30 μm .

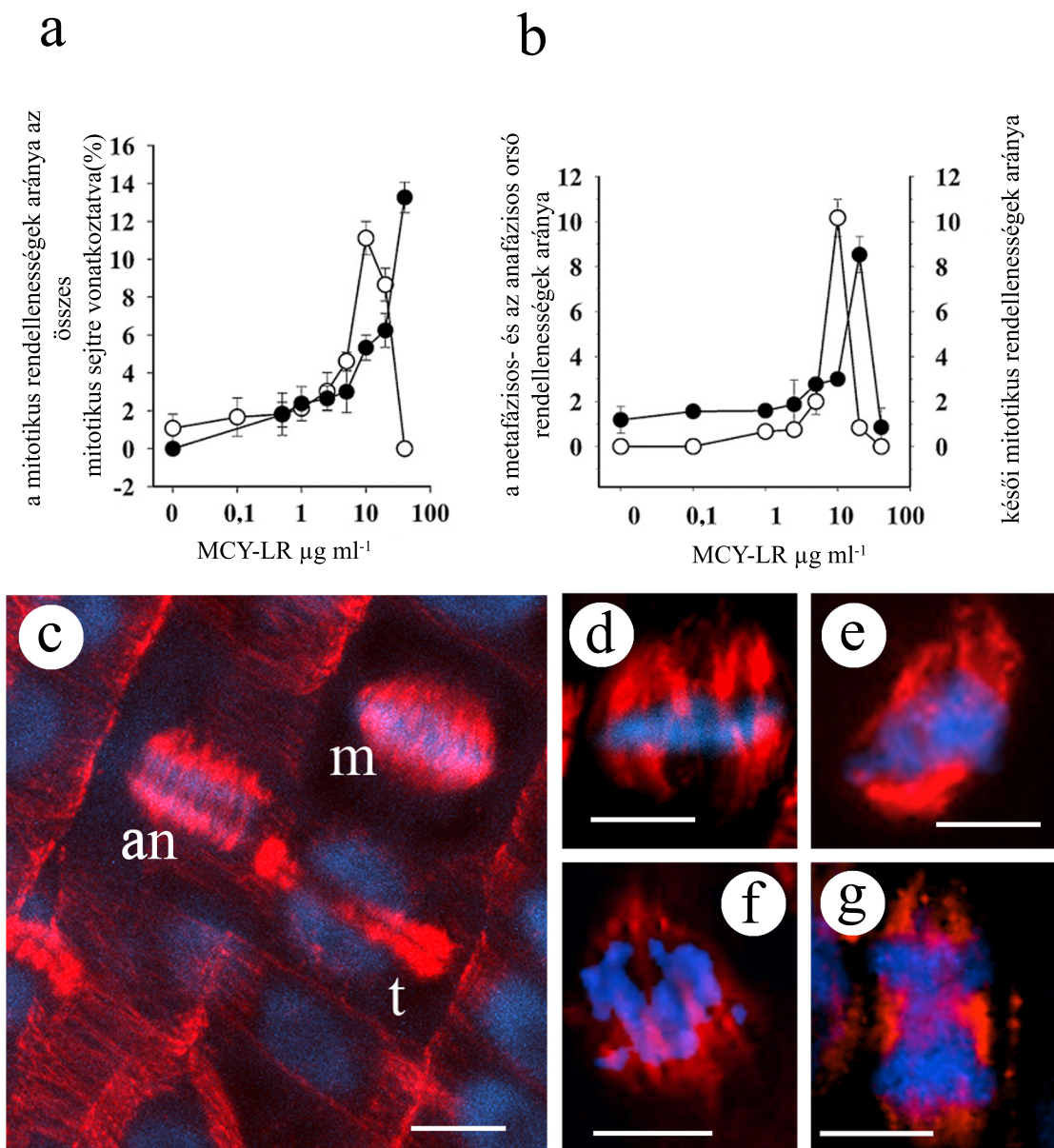


14. ábra . A MCY-LR által okozott mikrotubulus dezorganizáció mértéke az interfázisos és differenciált sejtekben. (a): A MCY-LR kezelések hatása a CMT rendellenességeket tartalmazó gyökércsúcsok arányára. Fekete kör: 2 napos kezelés, üres kör: 5 napos kezelés, fekete háromszög: 10 napos kezelés. (b): A mikrotubulus dezorganizáció mértéke az idősebb gyökérzónákban (fekete kör) és a fejlődő oldalgyökerekben (üres kör).

A MCY-LR az osztódó sejtek mikrotubuláris citoskeletonjában számos elváltozást okozott. A metafázisban és a korai anafázisban számos sejtben a mitotikus orsó rendellenességeit tapasztaltuk a MCY-LR kezelést követően, a mitotikus orsót alkotó mikrotubulusok szabálytalan kötegelését figyeltük meg (15. b. ábra) szemben a kontroll sejtekkel, ahol a mikrotubulus kötegek rendezettek voltak (15.a ábra). Ezen felül a MCY-LR kezelt növényekben a mitotikus orsó gyakran hézagokat tartalmazott, vagy tripolárisrá vált (16. d, e ábra). A dezorganizált orsó nem képes a kromatidákat maradéktalanul széthúzni, így kromoszómák maradhatnak az osztódás síkjában (16. f, g ábra). A mitózis késői szakaszában hibás fragmoplasztok kialakulását tapasztaltuk. A rövidtávú (2 napos) kezeléseknél a mitotikus rendellenességek $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ feletti MCY-LR koncentrációknál jelentek meg és arányuk $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelésnél volt a legmagasabb. Hosszabb távú (20 napos) kezelés hatására már $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR hatására megjelentek hibás mitotikus apparátusok (16.a ábra). Mind a metafázis és a korai anafázis, mint pedig a késői mitózis rendellenességei, már 2 napos $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelés hatására megjelentek, 20 napos kezelésnél már $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelést követően megfigyeltük a mitózis hibáit. A rendellenes metafázisok és korai anafázisok aránya $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelésnél érte el a maximális $10 \pm 2 \%$ értéket, a késő telofázis és a citokinezis hibáinak aránya $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR-nél volt a legnagyobb (16. b ábra). A kontroll sejtekben szabályos PPB-t, hézagmentes kompakt bipoláris metafázisos és anafázisos orsókat, és szabályos fragmoplasztokat láttunk (16. c ábra).



15. ábra. A mitotikus orsó felülnézeti képe kontroll (a) és $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelt (b) sejtekben a nád gyökércsúcsokban. A kontroll sejtben láthatóan rendezettebb a mikrotubulusok alkotta struktúra mint a toxinkezelt sejtekben. Lépték: $15 \mu\text{m}$.

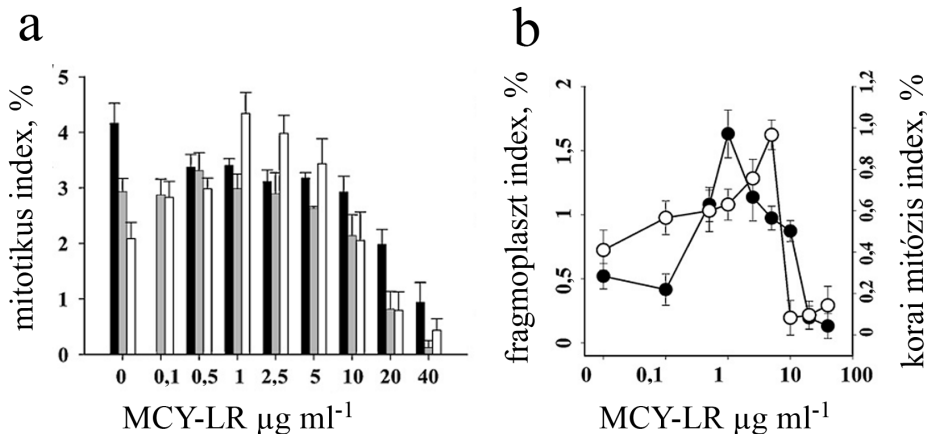


16. ábra: A MCY-LR által okozott mitotikus rendellenességek a nád gyökércsúcsokban. (a): a hibás mitózisok mitotikus sejtekre vonatkoztatott aránya, fekete kör: 2 napos kezelés, üres kör: 20 napos kezelés. (b): a metafázis-anafázis (fekete kör) valamint a késő mitózis (üres kör) rendellenességek aránya 20 napos MCY-LR kezelést követően. (c): kontroll sejtek a mitózis egyes fázisaiban, an: anafázis, m: metafázis, t: telofázis. (d): hézagos szerkezetű metafázisos orsó 5 napos $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelés után. (e): tripoláris orsó 2 napos $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelést követően. (f): rendezetlen anafázisos orsó, a kromatin elválása nem tökéletes ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR, 5 nap). (g): késő mitotikus rendellenesség. Lépték: $10 \mu\text{m}$.

4.6. A MCY-LR sejtosztódásra gyakorolt hatásai

A MCY-LR befolyásolta a sejtek osztódóképességét. Rövidebb távú (2 napos) kezelést követően a MCY-LR a teljes koncentráció tartományban gátolta a mitózist, azonban 2-10 napos kezeléseknél a gátló hatás csak 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ feletti MCY-LR kezelés során vált kifejezetté. 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (20,1 μM) MCY-LR hatására a mitotikus index a kontroll kevesebb mint felére csökkent a fő- és az oldalgyökerek merisztéma szöveteiben (17. a ábra). Hosszabb távú, 20 napos kezelés hatására ez a kép jelentősen megváltozott. Kisebb (0,1-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) koncentrációban a MCY-LR serkentette a sejtek mitotikus aktivitását, a mitotikus index 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (1 μM) MCY-LR kezelés hatására közel a kontroll kétszeresére növekedett. Nagyobb koncentrációjú, 20-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (20,1-40,2 μM) MCY-LR kezelés már jelentősen gátolta a sejtek osztódó képességét (17. a ábra).

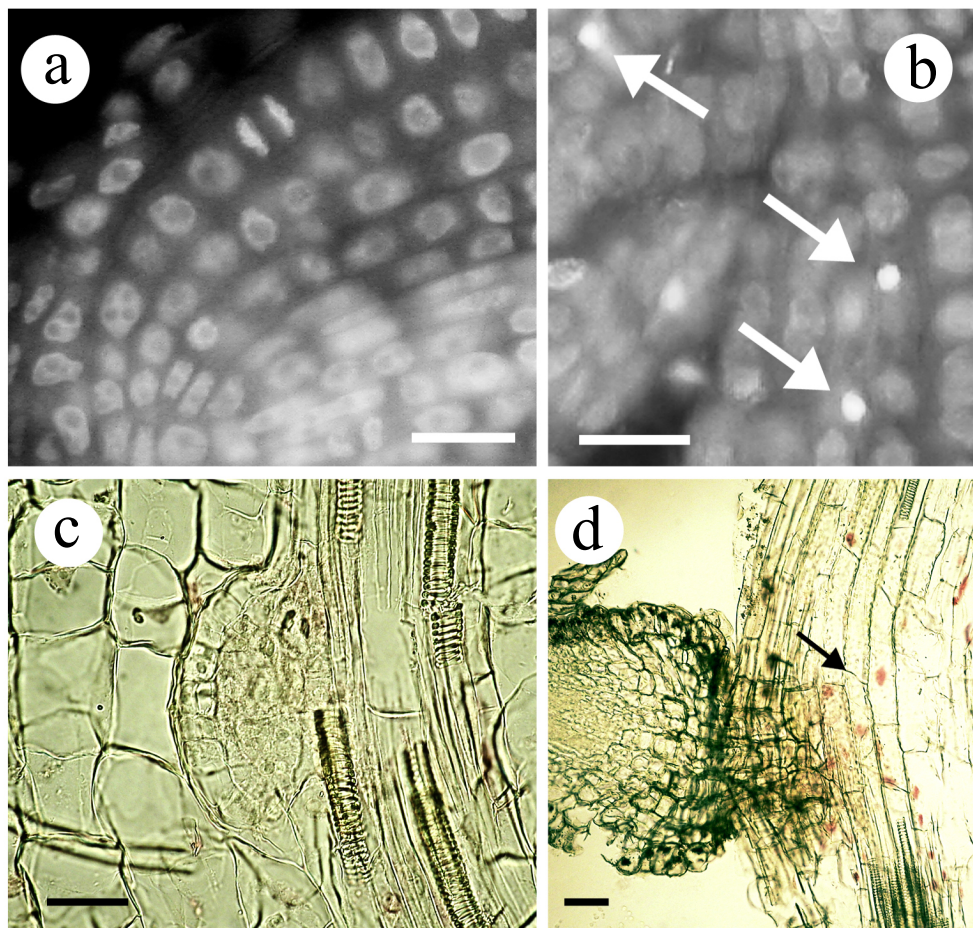
A sejtosztódást serkentő hatás jobb megértése érdekében a 20 napig kezelt nádgyökerekben a mitózis egyes fázisaiban tartózkodó sejtek arányát is megvizsgáltuk. 0,5-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentráció tartományban a MCY-LR megnövelte a mitózis késői stádiumában, azaz a telofázisban vagy a citokinezisben lévő sejtek számát, a hatás a maximumát 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR-nél érte el. 1-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelés hatására viszont, a korai mitózisok aránya növekedett meg. Korai mitózisban lévőknek tekintettük a preprofázisos köteget tartalmazó sejteket. A legnagyobb arányban az 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelésén átesett gyökerekben találtunk korai mitózisokat (17. b ábra).



17. ábra: A MCY-LR hatása a sejtek osztódóképességére és a mitózis egyes stádiumaira. (a): A mitotikus index változása a gyökércsúcsokban, 2 napos (fekete oszlop), 10 napos (szürke oszlop), és 20 napos (fehér oszlop) kezelés után. (b): a fragmoplasztok (fekete kör) és a korai mitotikus fázisok (üres kör) aránya.

4.7. A MCY-LR kromatin szerkezetre gyakorolt hatásai

A MCY-LR, 20-40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációban, számos sejtben a kromatin hiperkondenzációját idézte elő. Ez a jelenség gyakran a sejtmag zsugorodásával járt együtt, főként a differenciált szövetekre volt jellemző, de az oldalgökök esetében a merisztematikus szövetekben is megfigyeltük (18. b ábra). TUNEL pozitív sejtek, ahol a DNS hasítási folyamatok indultak be, azonban már 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR hatására megjelentek, elsősorban az oldalgökök kilépési helyén, a kéregszövetben (18. d ábra). A gyökércsúcsokban kontroll sejtmagok nem mutattak apoptotikus jelenségre utaló kromatin kondenzációt, bennük csak a normál heterokromatin struktúra látható (18. a ábra). A differenciáltabb gyökérszövetekben megjelentek a kondenzált kromatin állományú, illetve a TUNEL pozitív sejtek a kontrollban, de csak a fejlődő aerenchimákban és a sztelében. A fejlődő oldalgökök környezetében a kontrollban soha nem jelentek meg TUNEL pozitív sejtmagok (18. c ábra).



18. ábra: A MCY-LR által okozott kromatin szerkezetváltozások a nád gyökerekben. (a): DAPI festett kontroll gyökércsúcs. (b) DAPI festett 10 napos $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelt gyökércsúcs. A nyilak a kondenzált kromatinállományú összezsugorodott sejtmagokat mutatják. (c): TUNEL jelölt kontroll elágazási zóna oldalgyökér primórdiummal. (d): TUNEL pozitív sejtmagok az elongációs zónában 10 napos $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR kezelt gyökérben, a fekete nyíl a tunel pozitív (piros) sejtmagokat tartalmazó szövetrészt mutatja. Lépték: $50 \mu\text{m}$.

5. Az eredmények megbeszélése

A CYN jelentősen gátolta a gyökerek megnyúlásos növekedését az axenikus nádnövényekben, ahol a CYN IC_{50} értéke $0,5 \mu g ml^{-1}$ volt. Az új gyökerek képződésére a CYN induktív hatásának bizonyult, $2,5 \mu g ml^{-1}$ CYN kezelés hatására 50 %-al több új gyökér jelent meg, mint a kontrollban (5. a ábra). A CYN növekedésre gyakorolt hatása az irodalmi adatok alapján minden növényben más és más. Mustár csíranövényekben a CYN gátolta a tengelyszervek növekedését (Vasas és mtsai, 2002), *Hydrilla verticillata* vízinövényben azonban a CYN tartalmú kivonat mind a tengelyszervek növekedését, mind az új gyökerek képződését stimulálta (Kinneer, 2008). Az a CYN koncentráció, amely a mi rendszerünkben a gyökerek növekedését nagymértékben gátolta ($0,5 \mu g ml^{-1}$), a *Hydrilla* növényekben serkentőnek bizonyult. A CYN fehérjeszintézis gátló hatását (Froschio és mtsai, 2008), tehát metabolikus inhibítorként gátolhatja a növények növekedését. Azonban a fehérje szintézis inhibitorok a stressz válasza jellemző biokémiai és élettani változásokat is indukálnak a növényekben, amely magában foglalja a megnyúlásos növekedés gátlását (Dhindsa és Cleland, 1975). Kinneer és mtsai (2008) szerint a *Hydrilla* növény a gyökerek számának és tömegének növelésével nagyobb detoxifikáló kapacitásra tesz szert. A kutatók kimutatták, hogy a gyökerek képesek a CYN részleges lebontására, a megnövekedett gyökértömeg hatékonyabban hidrolizálja a cianotoxint. A fentiekből arra következtettünk, hogy a nád gyökerek esetén a CYN által indukált megnyúlásos növekedés gátlás a stresszválasz része, míg a gyökérszám növekedése védekezési reakció, amely a detoxifikáló kapacitást növeli.

A CYN a nádgyökerekben a kéregszövet és a rhizodermisz nekrozisát, valamint az aerenchimák kalluszos eltömődését idézte elő (6. ábra). Úgy gondoljuk, a nádgyökerek nekrozisa és az aerenchimák eltömődése a toxikus hatások kiküszöbölésére szolgáló mechanizmus. Hasonló, a növény által indukált morfológiai változásokat figyelték meg az eutróf vizek üledékében felhalmozódó szerves savak hatására a nádnövényekben (Armstrong és Armstrong, 1999). A kutatócsoportunk korábban a nádnövényekben a gyökerek megnyúlásos növekedésének gátlását, nekrozisokat és az aerenchimák eltömődését tapasztalta MCY-LR hatására (Máthé és mtsai, 2007). Az eltömődött és nekrotikus gyökerek kisebb

szállító kapacitással rendelkeznek, így kevesebb toxikus vegyület jut el a hajtásokba (Armstrong és Armstrong, 1999). A rendszerünkben a nád hajtások megnyúlásos növekedését a CYN csak igen kis mértékben csökkentette, ez a megfigyelés tovább erősíti azt a nézetet, amely szerint a CYN hatására a gyökerekben kialakult szövettani elváltozások a védekezési reakció részét képezik: gátolják a cianotoxin a hajtás irányába történő szállítását.

A fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok adatai szerint a CYN a mikrotubulusok reorientációját okozta a gyökér elongációs zónájában, és csökkentette a kortikális mikrotubulus kötegek számát a gyökérsejtekben. A mikrotubulus dezorganizációjához a sejtek morfológiai elváltozása társult, a sejtek a normális tengely irányú megnyúlás helyett oldalirányban növekedtek (7. ábra). Általánosan elfogadott paradigma, hogy a kortikális mikrotubuláris citoszkeleton fontos szerepet játszik a sejthalak és a sejtmegnyúlás irányának meghatározásában a cellulóz mikrofibrillumok szintézisének irányítása révén (Fisher és Cyr, 1998). A kortikális mikrotubulus hálózat transzverzből longitudinálissá válhat, ha stressz, sérülések, vagy etilén hatására megáll a sejtek megnyúlásos növekedése (Yuan és mtsai 1994). Ez alapján arra következtettünk, hogy a mikrotubuláris citoszkeleton reorganizációja és a sejtek laterális expanziója a nád gyökérsejtekben a cianotoxin által indukált stressz válasz következménye. A fehérje szintézis gátlása, közvetve actinomicin D-vel, amely az RNS szintézis specifikus gátlószere, illetve közvetlenül cikloheximiddel, a mikrotubuláris rendszer reorganizációját okozza (Baluska és mtsai, 1995). A kétféle metabolikus inhibítor hatása kissé eltérő, cikloheximid esetén a mikrotubulusok pókhálós szerkeztűvé váltak, az aktinomicin D megváltoztatta a kortikális mikrotubulusok orientációját, emellett hatására kifejezett rések keletkeztek a mikrotubulus kötegeken (Baluska és mtsai, 1995). A transzkripciót gátló aktinomicin D hatásai jobban emlékeztetnek a CYN hatásaira, mint a cikloheximid esetében tapasztaltak. Ismert tény, hogy a CYN a fehérjeszintézis mellett a pirimidin nukleotidok szintézisét is gátolja, így közvetve az aktinomicin D-hez hasonlóan csökkenti a transzkripciót, és ezáltal az új fehérjék szintézisét (Reisner és mtsai, 2004).

A CYN hatására a differenciált nád gyökér kéregsejtekben bekövetkező CMT denzitás csökkenés nagyban hasonlít a hagyma gyökerekben cikloheximid kezelés hatására jelentkező mikrotubulus rendellenességekhez (Mineyuki és mtsai, 1994). Mineyuki és mtsai, (1994) kísérleteiben a cikloheximid hatására a CMT denzitása csökkent, miközben a mikrotubulusok a perinukleáris térbe helyeződtek át. A mikrotubuláris citoszkeleton átrendeződését a mikrotubulusokat a

membránnal összekötő, illetve a mikrotubulusok stabilitásáért vagy kötegeléséért felelős fehérjék szintézisének a gátlásával magyarázták. A hősokk hatására a dohány növényben a mikrotubuláris citoszkeleton denzitásának csökkenését figyelték meg Smertenko és mtsai, (1997a, b). Ezt azért fontos megemlíteni, mert ismeretes, hogy a hősokk a fehérjeszintézis mintázat jelentős változásaival jár együtt, a prokarióta és az eukarióta sejtekben (Smertenko és mtsai, 1997b).

A mikrotubuláris szerkezet számos elváltozását figyeltük meg a CYN kezelt mitotikus sejtekben. Sok sejtben hasadt vagy dupla preprofázisos köteget találtunk (8.-9. ábra). Irodalmi adatok állnak arról rendelkezésre, hogy a preprofázisos köteg kontroll sejtekben is megduplázódhat (Hasezawa és mtsai, 1994), azonban a kontroll nád növényekben egyáltalán nem találtunk hasonló eltéréseket. Nogami és mtsai, (1996) cikloheximid kezelt hagyma gyökerekben a kontrollnál jóval szélesebb preprofázisos kötegeket találtak, amelyekben feltehetően a mikrotubulusok kötegelésében résztvevő fehérjék mennyiségének csökkenése miatt, a preprofázisos köteg keskenyítése zavart szenvedett. A CYN kezeléshez hasonlóan, a cikloheximid kezelés is a dupla preprofázisos kialakulását indukálta dohány sejtekben (Mineyuki, 1999). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a CYN a PPB-re gyakorolt hatása összefüggésben áll a toxin által kiváltott fehérjeszintézis gátlással.

A CYN a mitotikus index enyhe növekedését okozta a nád gyökércsúcs sejtjeiben, amelyet főként a profázisos sejtek számának a növekedése eredményezett, az osztódás későbbi szakaszaiban lévő sejtek száma pedig átmenetileg csökkent (10. ábra). Mivel a CYN kezelt növényekben a mitózis összes stádiumát megfigyeltük, csak az egyes stádiumban lévő sejtek aránya változott, úgy gondoljuk, a CYN nem blokkolja a profázist, hanem csak megnöveli a sejtek tartózkodási idejét az adott fázisban. A profázis lassítása kapcsolatban állhat a preprofázisos köteg rendellenességeivel. A CYN állati sejtekben gátolta a mitózist (Lankoff és mtsai, 2007). A növényekben az élővilág többi tagjához hasonlóan a mitózis számos pontján új fehérjék szintézisére van szükség (Doerner, 2007), mely pontokat a szakirodalom restrikciós pontnak nevez (De la Torre és mtsai 1989). Az anizomicin hatására, amely a riboszómális szinten gátolja a fehérjeszintézist, az *Allium cepa* (hagyma) gyökerek sejtjeiben drasztikusan csökkent a mitotikus index (Ciudrado és mtsai, 1985). Az anizomicin emellett teljesen leállította a sejteket a profázis folyamatában (De la Torre és mtsai, 1989), fontos hozzátenni, hogy ezekben kísérletekben a sejtek fehérjeszintézisét 100 %-ban gátló mennyiségben adagolták az anizomicint, így könnyen belátható a sejtosztódás jelentős feltartóztatása. A cikloheximid a növényi sejtekben

gátolta a preprofázisos köteg és a mitotikus orsó kialakulását, valamint a profázis-metafázis és az anafázis-telofázis átmeneteket lassította, ezen felül telofázis rendellenességeket okozott (Olszewska, és mtsai, 1990; Nogami és mtsai, 1996). A CYN nem befolyásolta az anafázis-telofázis átmenetet, azonban számos sejtben a fragmoplaszt szétesését okozta (8. ábra).

A CYN a mitotikus orsó dezorganizációját idézte elő, amelyet gyakran követett a testvérkromatidák hibás szegregációja és a fragmoplaszt szétesése. Humpage és mtsai, (2000) kromoszóma vesztéses aneuploidiák megjelenését tapasztalta a CYN kezelt humán sejtekben, amelynek magyarázata szerintük a mitotikus orsó hibájában keresendő. A mitotikus orsó nem egyszerűen egymással párhuzanos mikrotubulus kötegek összessége, hanem mikrotubulus keresztkötéseket tartalmazó mikrotubulus asszociált és motor proteinekkel stabilizált rendszer (Ambrose és Cyr, 2007). A kontroll nád sejtekben egyáltalán nem találtunk hézagos szabálytalan szerkezetű mitotikus orsókat, csak szabályos orsók fordultak elő (15. a ábra), míg CYN kezelés hatására a mitotikus orsók hézagossá vagy tripolárisá váltak (8.g ábra). A cikloheximid a *Vicia faba* gyökerekben képes előidézni a mitotikus orsó dezorganizációját, amelynek hátterében a szerzők szerint a mikrotubulus rendszer szervezésében résztvevő proteinek mennyiségének csökkenése áll (Olszewska és mtsai, 1990). Az *Arabidopsis*-ban a mikrotubulus stabilitásában fontos szerepet játszó mor1 (microtubule organization 1) fehérje génjének mutációja, a CYN kezeléshez hasonlóan, a mitotikus orsó szétesését, majd később deformálódott fragmoplasztokat eredményez (Kawamura és mtsai, 2006, Sedbrook, 2004). A MAP65 család tagjai részt vesznek a preprofázisos köteg, az orsó és a fragmoplaszt felépítésében (Hussey és mtsai, 2001). Az AtMAP65-3 fehérje mutációja a fragmoplaszt működésképtelenségét okozza, így sokmagvú sejtek keletkeznek (Müller és mtsai, 2004). A fentiek alapján arra következtettünk, hogy a CYN hatására bekövetkező, a mikrotubulusokat és a sejtciklust érintő elváltozások közül a CMT denzitás csökkenése és a mitotikus rendellenességek a CYN fehérjeszintézis gátló hatásának köszönhetőek, míg a CMT reorientációja transzverzből longitudinálissá a növekedésgátlással kapcsolatos stresszválasz.

A mikrotubuláris citoszkeleton denzitásának csökkenése, illetve a mitotikus rendellenességek hátterében nem lehetett kizárni a tubulin fehérje mennyiségének potenciális csökkenését. Azonban, a β -tubulin C terminális konzervált peptidszakasza ellen készített poliklonális ellenanyaggal végzett immunoblot kísérletek éppen az ellenkezőjére utaltak. Az adott ellenanyaggal jelölődő β -tubulin mennyisége a CYN

kezelés hatására növekedett, tehát úgy látszik a β -tubulin mennyisége a sejtekben nem csökken, hanem nő (11. ábra). A bór megvonása a kukorica növényekben megnöveli a citoszkeletális fehérjék mennyiségét (Yu és mtsai, 2003). Hidegstressz hatására az *Arabidopsis* TUB9 tubulin izotípus transzkripciója megnövekszik (Chu és mtsai, 1993). A CYN stresszválaszt indukáló hatásával kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy a hőmérsékleti stresszek szenzora prokarióta szervezetekben a riboszóma, *E. coli*-ban a fehérje szintézis inhibitorok a hidegstresszre illetve a melegstresszre jellemző fehérjék szintézisét indukálják (VanBogelen és Neidhardt 1990). Figyelembe kell venni azt a lehetőséget is, hogy a β -tubulin a C-terminális szekvenciáján poliglutamilálódhat, a poli-glutamil- β -tubulin stabilitása megváltozhat, és ragadóssá válik (Smertenko és mtsai, 1997), tehát megváltozhat az antigén tulajdonsága. Ennek következtében, a jelentősen eltérő jelölődés a kontrollban és a CYN kezelt növényekben nem kizárólag a tubulin mennyiségének megváltozásával magyarázható.

A MCY-LR a mikrotubuláris citoszkeleton depolimerizációját okozta. A cianotoxin hatására a nádgyökerekben a gyökércsúctól a differenciáltabb régiókig, sok sejtben a kortikális mikrotubulus hálózat eltűnt, helyette a fluoreszcens anti β -tubulin diffúz jelölést mutatott. A mikrotubulusok dezorganizációja már $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ MCY-LR hatására megjelent és a koncentráció növelésével egyre több sejtben jelentkezett (13.-14. ábra). Máthé és mtsai, (2009) szövettani vizsgálatai hasonló koncentráció tartományban, a MCY-LR hatására a nád gyökércsúcsok megduzzadását tapasztalták, melynek hátterében a sejtek izodiametrikus expanziója állt. Figyelembe véve a mikrotubulus-mikrofibrillum paradigmát (Fisher és Cyr, 1998), a Máthé és mtsai, (2009) által tapasztalt szövettani elváltozások hátterében nagy valószínűséggel a kortikális mikrotubuláris rendszer dezorganizációja áll. Máthé és munkatársai (2009) továbbá azt is kimutatták, hogy a MCY-LR gátolja a nád 1 és 2A típusú protein foszfatázait. Baskin és Wilson (1997) calyculin-A, cantharidin és okadainsav hatására, amelyek a MCY-hez hasonlóan az 1 és 2A típusú protein foszfatázok specifikus inhibitorai, a sejtek izometrikus duzzadását, valamint a kortikális mikrotubuláris citoszkeleton dezorganizációját tapasztalták. A mikrotubulusok stabilitását csökkenti a tubulin vagy a mikrotubulus asszociált proteinek foszforilációja (Wright és Smith, 2007). Úgy gondoljuk, a nád gyökércsúcsokban a sejtek kortikális mikrotubuláris citoszkeletonjában MCY-LR hatására tapasztalt elváltozások a mikrotubulusok stabilitásának csökkenésére és az ebből következő depolimerizációra vezethetők vissza, amelynek hátterében a tubulin fehérjék vagy a MAP-ok hiperfoszforilációja áll.

A MCY-LR a mitotikus sejtekben is számos elváltozást okozott a mikrotubuláris citoskeletonban. A mitózis összes stádiumában megjelentek a mitotikus apparátust érintő deformációk. A cianotoxin kezelést követően a mitotikus orsó rendezettsége megváltozott (15. b ábra), hézagos szerkezetűvé vált, szélsőséges esetben pedig tripoláris orsók jelentek meg. A mitotikus orsó a működésében is kárt szenvedett, a sejt központi síkjában lemaradt kromatin állomány jelent meg, ezen felül a fragmoplaszt szétesését is megfigyeltük (16. ábra). Fisher és Cyr (2007) modellje alapján, a mitotikus orsó szerkezetének rendezettségét befolyásolhatják a mikrotubulus kötegelő fehérjék. A mikrotubulus kötegelő MAP 65 fehérjék a MAP kináz kaszkád rendszeren keresztül foszforilációval szabályozhatók (Sasabe és Machida, 2007). A ciklin dependens kinázok korai aktiválódása, a protein foszfatáz gátló endothall hatására, a normális bipoláris struktúra helyett multipoláris orsó megjelenését indukálta a profázisban (Ayaydin és mtsai, 2000). Bizonyos mikrotubulus asszociált fehérjék hiperfoszforilációja hibás anafázis-telofázis átmenetet eredményezhet (Vasquez és mtsai, 1999). A protein foszfatáz 1 és 2A gátlószerei a *Tradescantia*-ban megnövelték a metafázis időtartamát és a kromatin bizonyos részei időben később váltak el (Wolniak és Larsen, 1992).

Hosszú távú (20 napos) kezelések esetén a MCY-LR kis koncentrációban a nád gyökérsejtek osztódóképességét stimulálta, azonban nagyobb koncentrációban adagolva gátló hatásának bizonyult (17. ábra). Állati sejtekben több kutató hasonló eredményre jutott. Lankoff és mtsai (2003) CHO-K1 sejtenyészetekben a mitotikus index növekedését észlelték alacsony koncentrációjú MCY-LR hatására, míg magas koncentrációban a MCY-LR gátolta az osztódást. Gehringer (2004) az okadainsav hatásait vizsgálva arra a következtetésre jutott, hogy a sejtekben a foszfatáz inhibitorok kis koncentrációban a MAP kináz rendszer aktiválásán keresztül stimulálják a sejtosztódást, míg nagy koncentrációban gátolják a sejtciklust, a jelenséget dualisztikus válasznak nevezte el. Kutatócsoportunknak sikerült először növényi rendszerben kimutatni a dualisztikus választ protein foszfatáz inhibitor hatására.

A MCY-LR nádnövényekben a profázisok és a telofázisok arányát megnövelte (17. ábra).. A protein foszfatázok részleges gátlása okadainsavval a dohány sejteket a profázisban rekesztette meg (Zhang és mtsai, 1992). Hasonló jelenséget figyeltek meg endothall hatására lucernában (Ayaydin és mtsai, 2000). A MCY-LR a CYN-nel ellentétben nem okozta a dupla vagy a hasadt preprofázisos kötegek megjelenését, azonban a profázisok száma megnövekedett. Valószínűleg a ciklin dependens kinázok vagy a MAP kináz rendszer aktivációja a profázis

korai megindulását okozza, azonban ezzel együtt a MCY-LR részlegesen gátolja a mitotikus orsók kialakulását, így a sejtek több ideig tartózkodnak a profázisban. A ciklin dependens kinázok mellett számos ponton, a MAP kináz kaszkádok a növényekben is megtalálhatók és a profázis elindításában fontos szerepet játszanak (Sasabe és Machida, 2007). A ciklin dependens kinázok a sejtciklus minden szabályozási pontján fontos szerepet játszanak a mikrotubuláris rendszer szervezésében, amit az is bizonyít, hogy a mitózis során a mikrotubuláris citoskeletonnal kolokalizálnak (Weingartner és mtsai, 2001). Az *Arabidopsis* ton2 gén egy protein foszfatáz 2A regulációs alegységet kódol, mutációja esetén a preprofázisos köteg nem tud megfelelően kialakulni (Camilleri, 2002)

Máthé és mtsai (2009) megerősítették, hogy a MCY-LR a protein foszfatázok aktivitását gátolja a nád gyökerekben. A szakirodalmi adatok azt mutatják, hogy több-kevesebb eltéréssel más PP1 és PP2A gátlószerek is a rendszerünkben tapasztalható elváltozásokhoz hasonlítottak. Az eredményekből és az irodalmi adatokból arra következtettünk, hogy a MCY-LR hatására tapasztalt mikrotubuláris elváltozások és a mitotikus rendellenességek a protein foszfatáz gátló hatásnak köszönhetők.

A CYN hatására a gyökerek kéregszövetében, az epidermiszben és az oldalgyökerek merisztéma szöveiben kondenzált kromatinállományú és szétesett sejtmagokat találtunk, emellett a TUNEL módszer segítségével, számos sejtmagban a DNS hasítását mutattuk ki (12. ábra). A kromatin szerkezetre és DNS-re gyakorolt hatások arra utalnak, hogy a CYN a nád gyökerekben apoptotikus folyamatokat indukál. Az apoptotikus folyamatok fontos szerepet játszanak a növények fejlődésében és egyéb életfolyamataiban, pl. az aerenchimák képződésében és a magvak érésében (Ewans, 2003; Wang és mtsai, 1996). A nád vízi makrofita növény, lizigén aerenchimákkal rendelkezik, amelyek a kéregsejtek programozott pusztulásával alakulnak ki, így megmagyarázható, hogy a kontroll nád sejtekben is előfordul apoptotikus folyamat a kéregszövetben. A stressz hatására a növényekben nő az etilén mennyisége, az etilén részt vesz a lizigén aerenchimák képződésének indukciójában (He és mtsai, 1996). A CYN apoptogén hatása a fenti adatok alapján a stresszválasszal magyarázható. A CYN hatására a rhizodermiszben és az oldalgyökerek merisztematikus szöveiben is tapasztaltunk apoptotikus folyamatokat, ráadásul a kontroll növényekben nem vagy csak igen kis mennyiségben találtunk apoptotikus sejteket. A fehérjeszintézis gátló vegyületek általában gátolják a növények természetes apoptotikus folyamatait (Vacca és mtsai, 2004). A CYN esetében már kimutatták a DNS károsító hatást (Shaw és mtsai, 2000). Ismert, hogy a DNS károsító hatások növényekben is apoptotikus folyamatokat indukálnak (Danon és Galois, 1998). Így

belátható, hogy a rendszerünkben tapasztalt elváltozások hátterében nagyrészt a CYN DNS károsító hatása áll.

MCY-LR hatására is megjelentek apoptotikus sejtek a nád gyökércsúcsokban, azonban csak magasabb toxinkoncentrációk esetén és igen szórványosan (18. ábra). Elképzelhető, hogy a MCY-LR apoptogén hatása a protein foszfatáz gátlással függ össze, ugyanis He és mtsai (1996) kimutatták, hogy az aerenchimák kialakulásához szükséges apoptotikus folyamatokat az okadainsav indukálta a kukorica növényekben. Ezzel szemben az aleuron réteg sejteinek pusztulását gátolta az okadainsav (Kuo és mtsai, 1996). Az apoptotikus folyamatok, annál a koncentrációnál, ahol a MCY-LR Máthé és mtsai (2009) kísérleteiben már több mint 50 %-ban gátolta a protein foszfatáz aktivitást, még nem jelentkeztek. A MCY-LR apoptogén hatásáért feltehetően leginkább a Bouaicha és Maatouk (2004) által leírt oxidatív stresszt kiváltó hatása áll. Ismert tény, hogy az oxidatív stressz során felszabaduló szabadgyökök DNS károsító hatásúak, pl. a DNS egyik láncának hasítását, ill. repair (DNS javító) mechanizmusokat indítanak el (lásd pl. Lloyd és Linn, 1993). Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy a MCY-LR hatására a nádnövényekben növekszik az egyszálú DNS-t hasító enzimek aktivitása, mely enzimek fontos szerepet játszanak az apoptotikus folyamatokban (Jámbrik és mtsai, 2010 közlésre elfogadott kézirat).

6. Összefoglalás

Kísérleteinkben két ökológiai és egészségügyi szempontból magas kockázatot jelentő cianobakteriális toxin, a fehérjeszintézist gátló cilindropermopszin (CYN) és az 1 és 2A típusú protein foszfatázokat gátló mikrocisztin-LR (MCY-LR) növényi sejtekre gyakorolt citotoxikus hatásait vizsgáltuk. A CYN és a MCY állati sejtekben potens citotoxinok, interferálnak a kromatin szerkezettel, a mikrotubuláris és mikrofilamentális citoszkeletonnal, valamint a sejtosztódás folyamataival, emellett DNS károsító hatásuk van. A kísérleteinkhez a természetes vizekben is előforduló nádból (*Phragmites australis*) szövettenyésztéssel úton előállított axenikus növényeket használtunk (Máthé és mtsai, 2000). A nád a partmenti vizekben előforduló állományalkotó növény, amely kapcsolatba kerülhet a cianobakteriális toxinokkal. Vizsgálataink során a következő eredményekre jutottunk:

Kimutattuk, hogy a CYN nagymértékben gátolja a gyökerek növekedését, az IC_{50} érték $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ -nek adódott. Azonban a hajtások növekedését a CYN kevésbé befolyásolta, igen magas ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) koncentrációban is csak mintegy 20 %-al csökkentette a hajtások hosszánti növekedését.

A CYN a nádnövényekben védekezési reakciót, azaz stresszválaszt váltott ki, melynek egyik következménye, hogy az újonnan képződő gyökerek száma növekedett, amely feltehetően a detoxifikáció hatásfokát növeli. Emellett a CYN kezelt növények gyökereiben nekrotikus foltok képződtek és az aerenchimák sok helyen eltömődtek, így csökkentve a toxin felvételét. A nekrotikus sejthalál mellett apoptózisra utaló folyamatokat is detektáltunk a rizodermiszben, a kéregparenchymában és az elágazási zónában. Nem zárhatjuk ki, hogy a CYN hatás következtében az apoptotikus folyamatokat nekrosis követte ugyanazokban a sejtekben: hasonló jelenséget leírtak már növényi sejtekben. Stresszválaszként értelmezhető továbbá, hogy a CYN a kortikális mikrotubuláris citoszkeleton reorientációját okozta a gyökerek elongációs zónájában.

A differenciált sejtekben a CYN a mikrotubuláris rendszer denzitásának csökkenését okozta, amely némely esetben együtt járt a mikrotubulusok reorientációjával, azonban a leggyakrabban külön jelentkezett, így a két jelenség között nem lehet direkt összefüggést megállapítani. A kortikális mikrotubuláris citoszkeleton dezorganizációja a sejtek laterális expanszióját, és ezáltal a gyökércsúcsok megduzzadását okozta.

A CYN a mitotikus apparátusok rendellenességeinek megjelenését indukálta az osztódó sejtekben. Jellegzetes CYN hatás volt a dupla, ill.

hasadt preprofázisos kötegek megjelenése. Ezek a struktúrák nagy valószínűséggel összefüggésbe hozhatóak a cianotoxin fehérjeszintézis gátló hatásaival. Megfigyeltük továbbá a metafázis-anafázis orsók és a fragmoplaszt dezorganizációját a CYN kezelés hatására. Mitotikus rendellenességeket már $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN hatására megfigyeltünk, a CMT dezorganizációja $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN kezelés következtében jelentkezett. A CMT denzitás csökkenése és a hibás mitózisok hátterében a CYN protein szintézist gátló hatását gyanítjuk, ugyanis a szakirodalom tanúsága szerint számos a fehérjeszintézist gátló vegyület az általunk leírtakhoz hasonló elváltozást okozott (Mineyuki és mtsai, 1994, Baluska és mtsai, 1995).

A CMT denzitásának csökkenése nem magyarázható a tubulin mennyiségének csökkenésével, ugyanis immunoblot vizsgálataink szerint a β -tubulin mennyisége a CYN hatására nőtt.

A CYN a sejtciklus folyamatával is interferált, az összes mitózisok száma CYN kezelés hatására enyhén megnövekedett. A sejtciklus egyes stádiumait külön vizsgálva előtűnt, hogy a CYN hatására a profázisban lévő sejtek száma növekedett, míg a metafázisos sejtek aránya csökkent. A CYN sejtciklusra gyakorolt hatását a fehérjeszintézist gátló hatása magyarázhatja.

A MCY-LR kezelt növényekben kimutattuk a kortikális mikrotubuláris citoszkeleton dezorganizációját, sok esetben pedig a CMT teljes eltűnését. Számos sejtben a CMT eltűnése mellett a citoplazma megnövekedett diffúz festődését láttuk, ezek alapján feltételezzük, hogy a MCY-LR a CMT depolimerizációját okozta. Megfigyeléseink szerint a MCY-LR hatására az osztódó sejtekben számos, a citoszkeletonot érintő elváltozás jelent meg. A mitotikus orsó szerkezete megváltozott, sok sejtben hézagossá vált, gyakran jelentek meg tripoláris orsók. Sok sejtben megfigyeltük a fragmoplaszt szétesését. A MCY-LR a CYN-nel ellentétben nem okozott rendellenességeket a preprofázisos kötegben. A MCY-LR az állati rendszerekben MCY-LR és más protein foszfatáz inhibitorok esetén már megfigyelt dualisztikus választ váltott ki a nád gyökerekben. Hosszú távú toxinkezelések esetén, kis koncentrációban ($0,1-5 \mu\text{g ml}^{-1}$) a sejtek osztódó képességének növekedését okozta, míg nagy koncentrációban ($5-40 \mu\text{g ml}^{-1}$) alkalmazva gátolta azt. A MCY-LR megnövelte a mitotikus sejtek tartózkodási idejét a profázisban és a telofázisban. A MCY-LR mikrotubuláris citoszkeletonra és a sejtciklusra gyakorolt hatásainak hátterében az 1 és 2A típusú protein foszfatázok gátlása áll, a toxin nagy valószínűséggel a MAP kináz kaszkádokkal illetve a ciklin dependens kinázok hatásaival interferál, megnövelve a mikrotubulus asszociált proteinek foszforiláltsági állapotát.

A CYN és a MCY-LR egyaránt apoptotikus folyamatokat indukált. A CYN számottevően nagyobb mértékben növelte az apoptotikus sejtek számát mint a MCY-LR. A CYN már $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációban növelte az apoptotikus TUNEL pozitív sejtek számát, míg MCY-LR esetén csak $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ feletti koncentrációnál jelentkeztek szórványosan apoptotikus tünetek. A CYN-ból a sejt méregtelenítésében résztvevő enzimek hatására képződő toxikus metabolitok képesek a DNS-t károsítani, ezáltal apoptózist kiváltani. A MCY-LR apoptogén hatásai, feltehetőleg nem a protein foszfatáz gátlása miatt, hanem a MCY-LR szabadgyököt generáló képessége miatt jelentkeztek. Ez utóbbi csak közvetve hozható kapcsolatba a toxin indukált specifikus biokémiai hatásokkal.

A jelen kísérleteinkben tapasztaltak egyértelműen alátámasztják azt, hogy a két cianotoxin, a CYN és a MCY-LR citotoxikus hatású a szövettenyészetekben előállított axenikus nádnövények sejtjeire.

7. English summary

7.1. Introduction

The aim of this study was to investigate the cytotoxic effects of two cyanotoxins, the protein synthesis inhibitory cylindrospermopsin (CYN) and the protein phosphatase inhibitory microcystin-LR (MCY-LR) in cells of axenic tissue cultured *Phragmites australis* plantlets.

The name cyanotoxin refers to a wide variety of toxic compounds, produced by the toxic strains of cyanobacterial species. These toxins represent high health and ecological risk, due to their potential to cause severe toxicity in humans, in livestock and other animals (Carmichael, 1994). There is growing evidence that cyanobacterial toxins can also affect plants. At this time only MCY and CYN have been reported to have toxic effects in plant systems (e.g. Kós et al. 1995; M-Hamvas et al. 2003, Pflugmacher 2004, Máthé et al. 2007, Vasas et al. 2002).

MCY is a heptapeptide type cyanotoxin produced by several cyanobacteria (e.g. *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. etc.), it is a potent inhibitor of type 1 and 2A protein phosphatases (Sivonnen and Jones 1999). The cytotoxic effects of MCY include disruption of actin microfilaments, intermediate filaments and microtubules, alteration of cell cycle and genotoxicity (Toivola and Eriksson 1999, Lankoff et al. 2003). CYN is an alkaloid type cyanotoxin produced by toxic strains of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*. It has also severe cytotoxic effects on animal cells. It has been reported to be genotoxic by its ability to create adducts on DNA molecules (Shaw et al 2000), disruption of actin microfilaments and microtubules has also been demonstrated (Gácsi et al 2009). In plant cells it has been demonstrated that MCY can cause changes in chromatin structure similar to apoptosis, but there is no other available data on its cytological effects (Yin et al. 2006). In the case of CYN, there are no literature data on its cytological effects in plants.

7.2. Goals of the study

Considering the above mentioned statements, our goals were as follows:

- a.** To investigate the effects of CYN on growth of axial organs in tissue culture derived axenic reed (*Phragmites australis*) plantlets.
- b.** To show the histological alterations induced by CYN in roots of reed plantlets.
- c.** Using fluorescence microscopy techniques, our aim was to study the changes induced by the protein synthesis inhibitor CYN and the protein phosphatase (1 and 2A) inhibitor MCY-LR in microtubular structures in interphase, differentiated and dividing cells and to detect changes in chromatin structure during cell division in reed roots.
- d.** To show the effect of both cyanotoxins on the mitotic potential and cell cycle in reed root cells.
- e.** To show the potential apoptogenic effect of CYN and MCY-LR in root cells via chromatin staining with DAPI and via TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling).

7.3. Results and discussion

a. We showed that CYN can severely inhibit the growth of reed roots with an IC_{50} value of $0,5 \mu g ml^{-1}$. In the case of shoots, the growth inhibition was much less pronounced. Even high doses ($20 \mu g ml^{-1}$) of CYN only caused 20 % decline in the growth rate of reed shoots. CYN caused the increase of root number, which we considered as a stress reaction of plants to increase detoxification capacity (Kinnear, 2008).

b. CYN had many histological effects in reed roots that can be considered as stress adaptation. Starting from $10 \mu g ml^{-1}$ concentration, CYN caused obturation of aerenchyma by callus-like tissue and necrotic cell death in the rhizodermis and in deeper tissues (in the case of differentiated root regions). These changes can decrease the translocation capacity of roots and thus protecting the other organs from toxic compounds (Armstrong and Armstrong 1999). It is worth mentioning that

besides necrotic cell death we detected apoptosis-like processes in rhizodermis and cortex of CYN treated reed roots. It is likely that apoptotic-like chromatin changes were followed by necrotic cell death.

c. CYN caused reorientation of cortical microtubular (CMT) structure in elongation zones of reed roots, the cells with reoriented microtubules switched from normal axis directed elongation, to radial expansion leading to thicker root tips. CMT reorientation and altered cell shape can be the effect of many stress factors that lead to decreased growth (Yuan et al. 1994), thus we can state that these reactions are part of the stress response. In interphase cells CYN also caused the decrease in the number of CMT bundles. The reduced number of microtubules in some cases was accompanied by CMT reorientation but in most cases it was not, so it is not likely to be any direct connection between these two effects. The changes in CMT structures were detectable starting from $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ CYN.

CYN induced anomalies in the cell division machinery of reed root cells. The most pronounced effect was the formation of double or split PPB-s during preprophase instead of normal PPB-s detected in control cells. CYN also caused formation of disrupted mitotic spindles and phragmoplasts and in some cases of tripolar spindles. The effects of CYN on mitosis related microtubular structures was visible starting from $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Control cells always contained normal prophases, metaphases and telophases. Other protein synthesis inhibitors caused similar changes in microtubular cytoskeleton both in interphase and mitotic cells (Mineyuki et al. 1994, Baluska et al. 1995), thus we consider that these changes are attributable to the protein synthesis inhibitory effect of CYN. Western blot analysis of β -tubulin content showed that instead of decreasing it, CYN caused elevated levels of β -tubulin that reacts with the polyclonal antibody raised against the C-terminal sequence of protein. Regarding, that the C-terminal region of both α - and β -tubulin proteins can be post-translationally modified (Smertenko et al. 1997a), we cannot state that CYN somehow induced the expression of β -tubulin. It is highly unlikely that CYN causes disruption of microtubular cytoskeleton by decrease in tubulin levels via protein synthesis inhibition. According to Mineyuki et al. (1994) it is more likely that these effects were due to decreased level of microtubule associated proteins.

MCY-LR also caused alteration of microtubular cytoskeleton, in concentrations above $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$. In many interphase cells CMTs were disorganised or absent, these cells showed increased background fluorescence in the cytoplasm. The best explanation of these effects is that MCY caused the depolymerisation of microtubules. It is known that

increased phosphorylation state of tubulins or MAPs leads to reduced stability of microtubules, which is highly important for the mitosis related microtubule reorganisations (Wright és Smith, 2007). The cells with disrupted microtubules could not grow unidirectionally, they were swollen. This is in accordance with the histological effects previously detected by our laboratory (Máthé et al. 2009).

MCY-LR caused the appearance of mitotic anomalies, the mitotic spindle became less organised or disrupted, in some cases the formation of tripolar spindles was detected. The phragmoplast was also disrupted in some dividing cells. In contrast to CYN, MCY-LR did not cause the appearance of double or split PPB-s suggesting a different mode of action. In cells treated with other protein phosphatase 1 and 2A inhibitors similar alterations to our results were observed (Vasquez et al. 1999, Ayaydin et al. 2000). The cytoskeletal effects of MCY-LR were most likely due to its protein phosphatase inhibitory effect.

d. CYN interfered with the cell cycle of reed root meristem cells. The effect of CYN was not pronounced when taking in account the mitotic indices, but when we examined the stages of mitosis separately we could show that CYN caused the increase in the percentage of cells in prophase, while the number of cells in metaphase decreased. Other protein synthesis inhibitors can cause blockage at both early prophase and telophase (De la Torre et al. 1989, Olszewska et al 1990, Nogami et al. 1996). We could not detect the complete arresting of mitosis in certain mitotic phases but it is highly probable that the cell cycle related effects of CYN were also caused by its protein synthesis inhibitory effect.

The effect of MCY-LR on cell cycle was dualistic: at long-term exposure of reed plants, low levels of MCY-LR (0,1-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) caused increase in number of dividing cells, while higher levels of the cyanotoxin caused the decrease of mitotic index. This type of dualistic response was also detected in MCY-LR treated CHO-K1 (mammalian) cells (Lankoff et al. 2003). Our laboratory showed for the first time this type of dualistic response in plant cells as a result of protein phosphatase 1 and 2A inhibitor treatment. MCY-LR increased the duration time of prophase and telophase. The effect of other phosphatase inhibitory compounds like endothall and okadaic acid in plant cells is similar to our results (Zhang et al. 1992, Ayaydin et al. 2000).

e. Both CYN and MCY-LR could cause apoptosis-related processes in reed roots. The potential of CYN to induce apoptosis was higher than of MCY-LR. CYN caused the increase of the number of TUNEL positive

nuclei as well as the number of cells with condensed chromatin starting from $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ cyanotoxin concentration. In contrast, in the case of MCY-LR only a few cells were characterized by apoptosis related symptoms starting from $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ cyanotoxin concentration. The apoptotic effect of CYN can be related to its ability to bind DNA. In plants, similarly to animals, DNA damaging agents cause apoptotic cell death (Danon and Galois 1998). In the case of MCY-LR its free radical generating potential might lay in the background of apoptogenic effect.

As a conclusion we can now state that both CYN and MCY-LR are potent cytotoxins in cells of reed roots.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a témavezetőimnek, Dr. Máthé Csabának és Dr. Borbély Györgynek hogy lehetővé tették, nyomon követték és szakmai tapasztalatuk segítségével koordinálták a munkámat.

Köszönet illeti meg Dr. Vasas Gábort, Dr. Mikóné Hamvas Mártát, Dr. Surányi Gyulát, Dr. Bácsi Istvánt, Dr. Mészáros Ilonát, Demeter Zitát, Jámbrik Katalint, Barabás Évát, a DE TEK TTK Növényteni Tanszék dolgozóit, a munkában nyújtott segítségükért, és hasznos tanácsaikért.

Köszönöm az Universitas Alapítvány támogatását, amely lehetővé tette a kísérletek végrehajtásához szükséges eszközök beszerzését.

Szeretnék köszönetet mondani Dr Erdődi Ferencnek és Bátori Róbertnek a Western blot kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségükért.

Végül de nem utolsó sorban köszönettel tartozom Dr. Szöllősi Jánosnak, Dr. Vereb Györgynek, Dr. Roszik Jánosnak és Dr. Székvölgyi Lorántnak a DE OEC Biofizika és Sejtbiológia Intézet munkatársainak a mikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott felbecsülhetetlen segítségért és a hasznos tanácsaikért.

9. Irodalomjegyzék

1. Abe, T., Lawson, T., Weyers, J.D.B., Codd, G.A., 1996. Microcystin-LR inhibits photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* primary leaves: implications for current spray irrigation practice. *New Phytologist*: 133, 651-658.
2. Allen, M.M., 1968. Simple conditions for the growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of Phycology*: 4, 1-4.
3. Ambrose, J.C., Cyr, R., 2007. Mitotic spindle assembly and function. In Verma, D.P.S., Hong, Z.,: Cell division control in plants. *Plant Cell Monographs*: 9, 141-168.
4. Alverca, E., Andrade, M., Dias, E., Sam Bento, F., Batoréu, M.C.C., Jordan, P., Silva, M. J., Pereira, P., 2009. Morphological and ultrastructural effects of microcystin-LR from *Microcystis aeruginosa* extract on a kidney cell line. *Toxicon*: 54, 283-294.
5. Armstrong J., Armstrong W., 1999. *Phragmites* die-back: toxic effects of propionic, butyric and caproic acids in relation of pH. *New Phytologist*: 142, 201-217.
6. Ayaydin, F., Vissi, E., Mészáros, T., Miskolczi, P., Kovács, I., Fehér, A., Dombrádi, V., Erdődi, F., Gergely, P., Dudits, D., 2000. Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *Plant Journal*. 23, 85-96.
7. Bain, P., Shaw, G., Patel, B., 2007. Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues*: 70, 1687-1693.
8. Baluska, F., Barlow, P.W., Hauskrecht, M., Kubica, S., Parker, J.S., Volkmann, D., 1995. Microtubule arrays in maize root cells. Interplay between the cytoskeleton, nuclear organization and post-mitotic cellular growth patterns. *New Phytologist*: 130, 177-192.
9. Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology*: 33, 613-616.
10. Banker, R., Carmeli, S., Werman, M., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 2001. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*: 62, 281-288.
11. Baskin, T.I., Wilson, I.E., 1997. Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiology*: 113, 413-502.
12. Bazin, E., Mourot, A., Humpage, A.R., Fessard, V., 2010. Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*: 51, 251-259.
13. Bernard, C., Harvey, M., Briand, J.F., Bire, R., Krys S., Fontaine, J.J., 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environmental Toxicology*: 18, 176-186.

14. Bethke, P.C., Lonsdale, J.E., Fath, A., Jones, R.L., 1999. Hormonally regulated programmed cell death in barley aleurone cells. *The Plant Cell*: 11, 1033-1045.
15. Billam, M., Mukhi, S., Tang, L., Gao, W., Wang, J.S., 2008. Toxic response indicators of microcystin-LR in F344 rats following a single dose treatment. *Toxicon*: 51, 1068-1080.
16. Boaru, D.A., Dragos, N., Schirmer, K., 2006. Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: A comparative study. *Toxicology*: 218, 134-148.
17. Bonanno, G., Lo Giudice, R., 2010. Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. *Ecological Indicators*: 10, 639-645.
18. 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 Chemical Society, Perkin Transley*: I, 2311.
19. Bouaicha, N., Maatouk, I., 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicology Letters*: 148, 53-63
20. Bouget, F.Y., Moulager, M., Corellou, F., 2007. Circadian regulation of cell division. In Verma, D.P.S., Hong, Z.: *Cell division control in plants*. *Plant Cell Monographs*: 9, 3-12
21. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*: 72, 248-254.
22. Brill, A., Torchinsky, A., Carp, H., Toder, V., 1999. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*: 16, 512-519.
23. Camillieri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., Bouchez, D., 2002. The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton. *Plant Cell*: 14, 833-845.
24. Campos, A., Vasconcelos, V., 2010. Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International Journal of Molecular Sciences*: 11, 268-287
25. Carmichael, W.W., 1992. Cyanobacterial secondary metabolites the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*: 72, 445-459.
26. Carmichael, W.W., 1994. Toxins of cyanobacteria. *Scientific American*: 270, 78-86
27. Che, F. S., Iwano, M., Tanaka, N., Takayama, S., Minami, E., Shibuya, N., Kadota, I., Isogai, A., 1999. Biochemical and morphological features of rice cell death induced by *Pseudomonas avenae*. *Plant Cell Physiology*: 40, 1036-1045.
28. Chiswell, R.K., Shaw, G.R.; Eaglesham, G., Smith, M.J., Norris, R.L., Seawright, A.A., Moore, M.R., 1999. Stability of cylindrospermopsin, the toxin from the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, temperature, and sunlight on decomposition. *Environmental Toxicology*: 14, 155-161.
29. Chu, B.D., Snustad, P., Carter, J.V., 1993. Alteration of P-tubulin gene expression during low-temperature exposure in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*: 103, 371-377.

30. Cui, S., Wang, W., Zhang, C.L., 2002. Changes of element ratios of cultured cells from dune reed under adverse environmental conditions. *Biological Trace Element Research*: 87, 201-210.
31. Daily, A., Monks, N.R., Leggas, M., Moscow, J.A., 2010. Abrogation of microcystin cytotoxicity by MAP kinase inhibitors and N-acetyl cysteine is confounded by OATPIB1 uptake activity inhibition. *Toxicon*: 55, 827-837.
32. Dangl, J.L., 1995. Genes controlling cell death in plants. *ESH 3rd Euroconference on Apoptosis*.
33. Danon, A., Gallois, P., 1998. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*: 437: 131-136.
34. Darvas, Z., László, V., 1999. *Sejtbiológia. Egyetemi jegyzet Semmelweis Orvostudományi Egyetem*.
35. Dhindsa, R.S., Cleland, R.E., 1975. Water stress and protein synthesis II. Interaction between water stress, hydrostatic pressure, and abscisic acid on the pattern of protein synthesis in *Avena* coleoptiles. *Plant Physiology*: 55, 782-785.
36. Dhonukshe, P., Mathur, J., Hulskamp, M., Gadella, T.W.J., 2005. Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biology*: 3, 11.
37. Doerner, P., 2007. Transcriptional control of the plant cell cycle. In Verma, D.P.S., Hong, Z., Cell division control in plants. *Plant Cell Monographs*: 9, 13-32.
38. Downing, K.H., Nogales, E., 1998. Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Current Opinion in Structural Biology*: 8, 785-791.
39. Ehrhardt, D.W., Shaw, L.S., 2006. Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annual Review of Plant Biology*: 57, 859-875.
40. Erdei, L., 2004. *Növényélettan – Növekedés- és fejlődésélettan*. JATE Press, Szeged.
41. Everitt, E., Maksimova, A., 1984. Quantitation of protein by alkaline extraction of naphthol blue black-stained polypeptides in sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide slab-gels. *Analytical Biochemistry*: 141, 17–24.
42. Ewans, D.E., 2003. Aerenchyma formation. *New Phytologist*: 161, 35-49.
43. Falconer, I.R., Bartram, J., Chorus, I., Kuiper-Goodman, T., Utkilen, H., Burch, M., Codd, G.A., 1999b. Safe levels and safe practices. In: Chorus I, Bartram J, eds. *Toxic cyanobacteria in water*. London-NY: E & FN Spon: 147-168.
44. Falconer, I.R., Hardy, S.J., Humpage, A.R., Froscio, S.M., Tozer G.J., Hawkins, P.R., 1999a. Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss Albino mice. *Environmental Toxicology*: 43, 143-150.
45. Fisher, D.D., Cyr, R.J., 1998. Extending the microtubule/ microfibril paradigm. cellulose synthesis is required for normal cortical microtubule alignment in elongating cells. *Plant Physiology*: 116, 1043-1051.
46. Froscio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2001. Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*: 16, 408-412.
47. Froscio, S.M., Humpage, A.R., Burcham, P.C., Falconer, I.R., 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology*: 18, 243-251.

48. 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, 191-198.
49. Gácsi, M., Antal, O., Vasas, G., Máthé, C., Borbély, G., Saker, M.L., Györi, 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, 710-718.
50. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*: 50, 151-158.
51. Gehring, M.M., 2004. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Letters*: 557, 1-8.
52. Giovannetti, A., Pierdominici, M., Di Iorio, A., Cianci, R., Murdaca, G., Puppo, F., Pandolfi F., Paganelli, R., 2008. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Current Pharmaceutical Design*: 14, 253-268.
53. Goddard, R.H., Wick, S.M., Silflow, C.D., Snustad, D.P., 1994. Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiology*: 104, 1-6.
54. Goldberg, J., Huang, H., Kwon, Y., Greengard, P., Nairn, A.C., Kuriyan, J., 1995. Three dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature*: 376, 745-753.
55. Greenberg, J.T., 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interaction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*: 48, 535-545.
56. Griffiths, D.J., Saker, M.L., 2003. The palm island mystery disease 20 years on: A review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*: 18, 78-93.
57. Harada, K., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M.F., Watanabe, M., Terao, K.I., 1994. Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon*: 32, 73-84.
58. Haraszty, Á., 1931. Anatómiai és élettani vizsgálatok a Phragmitesen. Bölcsészettudományi értekezés.
59. Hasezawa, S., Sano, T., Nagata, T., 1994. Oblique cell plate formation in tobacco BY-2 cells originates in double preprophase bands. *Journal of Plant Research*: 107, 355-359.
60. Hawkins, P.R., Runnegar, M.T.C., Jackson, A.R.B., Falconer, I.R., 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*: 50, 1292-1295.
61. He, C.J., Morgan, P.W., Drew, M.C., 1996. Transduction of ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. *Plant Physiology* 112, 463-742.
62. Heinzl, H., Fitter, R., Parslow, J., Bankovics, A., 2000 Collins Pocket Guide to Birds of Brittain and Europe – Hungarian edition (Európa madarai)
63. Humpage, A.R., Falconer, I.R., 2003. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino Mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology* 18, 94-103.
64. Humpage, A.R., Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I.R., 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic

and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*: 472, 155-161.

65. Humpage, A.R., Fontaine, F., Frosco, S., Burcham, P., Falconer, I.R., 2005. Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues*: 68, 739-753.

66. Hurkman, W.J., Tanaka, C.K., 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*: 81, 802-806.

67. Hussey, P.J., Hawkins, T.J., 2001. Plant microtubule-associated proteins: the HEAT is off in temperature-sensitive mor1. *Trends in Plant Science*: 6, 389-392.

68. Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., Smertenko, A., 2001. The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Molecular Biology*: 50, 915-924.

69. de Jager, S.M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S., Murray, J.A.H., 2005. The developmental context of cell-cycle control in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*: 16, 385-396.

70. Jámbrik, K., Máthé, C., Vasas, G., Beyer, D., Molnár, E., Borbély, G., M-Hamvas, M., 2010. Microcystin-LR induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-preferring nuclease activity in *Phragmites australis*. *Plant Physiology: közlésre elfogadott kézirat*.

71. Jiang, Y., 2006. Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 70, 440-449.

72. Jochimsen, E. M., Carmichael, W.W., An, J., Cardo, D.M., Cookson, S.T., Holmes, C., De, C., Antunes, B., De Melo Filho, D., Lyra, T.M., Barreto V.S.T., Azevedo, S.M.F.O., Jarvis, W.R. 1998. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*: 338, 873-878.

73. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*: 26, 239-257.

74. Kinnear, S.H.W., Fabbro, L., 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, 187-194.

75. Kossalak, R.M., Chamberlin, M.A., Palmer, R.G., Bowen, B.A., 1997. Programmed cell death in the root cortex of soybean root necrosis mutants. *The Plant Journal*: 11, 729-745.

76. Kós, P., 1995. A *Microcystis aeruginosa* toxintermelése. Doktori értekezés, MTA SZBK Növénybiológiai Intézet.

77. Kós, P., Gorzó, G., Surányi, G., Borbély, G., 1995. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry*: 225, 49-53.

78. Kovács, A., Présing, M., Vörös, L., 1999. A Balaton két legjelentősebb planktonikus cianobaktériumának összehasonlító ökológiai jellemzése. *Hidrológiai Közlöny*: 79, 324-326.

79. Kuo, A., Cappelluti, S., Cervantes-Cervantes, M., Rodriguez, M., Bush, D.S., 1996. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, blocks calcium changes, gene

expression, and cell death induced by gibberellin in wheat aleuron cells. *The Plant Cell*: 8, 259-269.

80. Kusaka, K., Tada, Y., Shigemi, T., Sakamoto, M., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Shigeyuki, M., 2004. Coordinate involvement of cysteine protease and nuclease in the executive phase of plant apoptosis. *FEBS Letters*: 578, 363-367.

81. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*: 227, 680-685.

82. Lankoff, A., Banasik, A., Obe, G., Deperas, M., Kuzminski, K., Tarczyska, M., Jurczak, T., Wojcik, A., 2003. Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from Polish reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*: 189, 204-213.

83. Laureys, F., Dewitte, W., Witters, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Onckelen, H., 1998. Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters* 426, 29-32.

84. Li, R.H., Carmichael, W.W., Brittain, S., Eaglesham, G.K., Shaw, G.R., Liu, Y.D., Watanabe, M.M., 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*: 37, 1121-1126.

85. Lloyd, R.S., Linn, S.M., 1993. Nucleases involved in DNA repair. In: Linn SM, Lloyd RS, Roberts RJ, Eds. *Nucleases* (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 263-316.

86. Máthé C., M-Hamvas, M., Grigorszky, I., Vasas, G., Molnár, E., Power, J.B., Davey, M.R., Borbély, G., 2000. Plant regeneration from embryogenic cultures of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. (common reed). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*: 63, 81-84.

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

88. Máthé, C., M-Hamvas, M., Vasas, G., Surányi, G., Bácsi, I., Beyer, D., Tóth, S., Tímár, M., Borbély, G., 2007. Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis*) plants regenerated from embryogenic calli. *New Phytologist*: 176, 824-835.

89. Mandl, J., 2002. Biotranszformáció méregtelenítés. In: Ádám, V., Dux, L., Faragó, A., Fésüs, L., Machovich, R., Mandl, J., Sümegi, B., *Orvosi Biokémia*: 297-327.

90. Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., Murray, J.A., 2003. Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Molecular Biology*: 53, 423-442.

91. Metcalf, J.S., Barakate, A., Codd, G.A., 2004. Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS Microbiology Letters*: 235, 125-129.

92. Meulmeester, E., Jochemsen, A.G., 2008. p53: A guide to apoptosis. *Current Cancer Drug Targets*: 8, 87-97.

93. M-Hamvas, M., Máthé, C., Molnár, E., Vasas, G., Grigorszky, I., Borbély, G., 2003. Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. *Aquatic Toxicology*: 62, 1-9.

94. Mineyuki, T., 1999. The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *International Review of Cytology*: 187, 1-49.

95. Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M., Inzé, D., 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants-the nexus. *The Plant Cell*: 11, 509-521.
96. Mitrovic, S.M., Allis, O., Furey, A., James, K.J., 2005. Bioaccumulation and harmful effects of microcystin-LR in the aquatic plants *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza* and the filamentous alga *Chladophora fracta*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 61, 345-352.
97. Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*: 15, 473-497.
98. Muller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P.J., Hauser, M.T., 2004. The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Current Biology*: 14, 412-417.
99. Mur, L.R., Skulberg, O.M., Utkilen, H., 1999. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I, Bartram J, eds. *Toxic cyanobacteria in water*. London-NY: E & FN Spon: 11-40.
100. Noodén, L.D., Guamét, J.J., John, I., 1997. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum*: 101, 746-753.
101. Nogales, E., 1999. A structural view of microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 56, 133-142.
102. Nogami, A., Suzuki, T., Shigenaka, Y., Nagahama, Y., Mineyuki, Y., 1996. Effects of cycloheximide on preprophase bands and prophase spindles in onion (*Allium cepa* L) root tip cells. *Protoplasma*: 192, 109-121.
103. Norris, R.L.G., Seawright, A.A., Shaw, G.R., Senogles, P., Eaglesham, G.K., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Moore, M.R., 2002. Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin *in vivo* in the mouse. *Toxicon*: 40, 471-476.
104. Ohtani, I., Moore, R.E., Runnegar, M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*: 114, 7941-7942.
105. Olszewska, M.J., Marciniak, K., Kuran, H., 1990. The timing of synthesis of proteins required for mitotic spindle and phragmoplast in partially synchronized rootmeristems of *Vicia faba* L. *European Journal of Cell Biology*: 53, 89-92.
106. Ostendorp, W., 1989. „Die-back” of reeds in Europe - a critical review of literature. *Aquatic Botany*: 35, 5-26.
107. Paradez, A., Wright, A., Ehrhardt, D.W., 2006. Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*: 9, 571-578.
108. Pflugmacher, S., 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology*: 70, 169-178.
109. Preussel, K., Stuken, A., Wiedner, C., Chorus, I., Fastner, J., 2006. First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*: 47, 256-162.
110. Reisner, M., Carmeli, S., Werman, M., Sukenik, A., 2004. The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. *Toxicological Sciences*: 82, 620-627.
111. Romanowska-Duda, Z., Tarczyska, M., 2002. The influence of microcystin-LR and hepatotoxic cyanobacterial extract on the water plant *Spirodela oligorrhiza*. *Environmental Toxicology*: 17, 434-440.
112. Rucker, J., Stuken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I., Wiedner, C., 2007. Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicon*: 50, 800-809.

113. 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, 219-225.
114. Saqrane, S., El Ghazali, I., Ouahid, Y., El Hassnib, M., El Hadrami, I., Bouarab, L., del Campo, F.F., Oudra, B., Vasconcelos, V., 2007. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquatic Toxicology*: 83, 284-294.
115. Sasabe, M., Machida, Y., 2007 MAP kinase signalling during M-phase progression. In Verma, D.P.S., Hong, Z.,: Cell division control in plants. *Plant Cell Monographs*: 9, 233-250.
116. Seawright, A.A., Nolan, C.C., Shaw, G.R., Chiswell, R.K., Norris, R.L., Moore, M.R., Smith, M.J., 1999. The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska). *Environmental Toxicology*: 14, 135-142.
117. Shaw, G.R., Seawright, A.A., Moore, M.R., Lam, P.K.S., 2000. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. *Therapeutic Drug Monitoring*: 22, 89-92.
118. Shen, W.H., G1/S transition and the Rb-E2F pathway. In Verma, D.P.S., Hong, Z.,: Cell division control in plants. *Plant Cell Monographs*: 9, 59-74.
119. Shi, L., Carmichael, W.W., Miller, I., 1995. Immuno-gold localization of hepatotoxins in cyanobacterial cells. *Archives of Microbiology*: 163, 6-15.
120. Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, eds. *Toxic cyanobacteria in water*. London-NY: E & FN Spon: 41-111.
121. Skulberg, O.M., Carmichael, W.W., Codd, G.A., Skulberg, R., 1993. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (Cyanobacteria). In: I. R. Falconer [Ed.] *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press Ltd., London: 145-164.
122. Smayda, T.J., 2008. Complexity in the eutrophication-harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae*: 8, 140-151.
123. Smertenko, A., Blume, Y., Viklický, V., Opatrný, Z., Dráber, P., 1997a. Post-translational modifications and multiple tubulin isoforms in *Nicotiana tabacum* L. cells. *Planta*: 201, 349-358.
124. Smertenko, A., Dráber, P., Viklický, V., Opatrný, Z., 1997b. Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant Cell and Environment*: 20, 1534-1542.
125. Spoof, L., Berg, K.A., Rapala, J., Lahti, K., Lepistö, L., Metcalf, J.S., Codd, G.A., Meriluoto, J., 2006. First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated from the boreal environment (Finland). *Environmental Toxicology*: 21, 552-560.
126. Stoppin-Mellet, V., Peter, C., Buendia, B., Karsenti, E., Lambert, A.M., 1999. Tobacco BY-2 cell-free extracts induce the recovery of microtubule nucleating activity of inactivated mammalian centrosomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*: 1449, 101-106.
127. Sukenik, A., Reisner, M., Carmeli, S., Werman, M., 2006. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: Long-term exposure to low doses. *Environmental Toxicology*: 21, 575-582.
128. Toivola, D.M., Eriksson, J.E., 1999. Toxins affecting cell signalling and alteration of cytoskeletal structure. *Toxicology in Vitro*: 13, 521-530.

129. De la Torre, C., Gonzalez-Fernandez, A., Gimenez-Martin, G., 1989. Stringency at four regions of the plant cell cycle where proteins regulating its progression are synthesized. *Journal of Cell Science*: 94, 259-265.
130. Törökné Kozma, A., Schiefer, G., Mayer, G., Dura, G., Deák, Z., 1986. Természetes vizeinkben előforduló algaprodukciók állatkísérletes vizsgálata. *Egészségtudomány*: 30, 301-308.
131. Törökné Kozma, A., Mayer, G., 1988. Toxikus cianobaktériumok hazai felszíni vizeinkben. *Hidrológiai Közlöny*: 68, 49-54.
132. Törökné Kozma, A., László, E., Chorus, I., Fastner, J., Heinze, R., Padisák, J., Barbosa, F.A.R., 2000. Különböző országokból származó cianobaktérium populációk toxicitása. *Hidrológiai Közlöny*: 80, 350-351.
133. Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberger, J., Bouchez, D., Caboche, M., 1995. Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature*: 375, 676-677.
134. Vacca, R.A., de Pintom, M.C., Valenti, D., Passarella, S., Marra, E., De Gara, L., 2004. Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiology*: 134, 1100-1112.
135. VanBogelen, R.A., Neidhardt, F.C., 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *PNAS*: 87, 5589-5593.
136. 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, 95-103.
137. Vasas, G., Padisák, J., M-Hamvas, M., Máthé, C., Molnár, E., Surányi, Gy., Grigorszky, I., Borbély, G., 2002b. A cylindrospermopszin termelés analitikai vizsgálata *Cylindrospermopsis raciborskii* izolátumokban. *Hidrológiai Közlöny*: 82, 143-146.
138. Vasas, G., Gáspár, A., Páger, C., Surányi, G., Máthé, C., M-Hamvas, M., Borbély, G., 2004. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*: 25, 108-115.
139. Vásquez, R.J., Gard, D.L., Cassimeris, L., 1999. Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. *Cell Motility and Cytoskeleton*: 43, 310-321.
140. Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., Gilchrist, D.G. 1996. Apoptosis: a functional paradigm for programmed cell death induced by host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell*: 8, 375-391.
141. Wang, W., Cui, S.X., Zhang, C.L., 2001. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of dune reed. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*: 67, 11-17.
142. Weingartner, M., Binarova, P., Drykova, D., Schweighofer, A., David, J.P., Heberle-Bors, E., Doonan, J., Bögre, L., 2001. Dynamic recruitment of Cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. *Plant Cell*: 13, 1929-1943.
143. White, E., 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & Development*: 10, 1-15.
144. Wickstrom, M.L., Khan, S.A., Haschek, W.M., Eriksson, J.E., Schaeffer, D.J., Beasley, V.R., 1995. Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicology and Pathology*: 23, 326.

145. Wiegand, C., Pflugmacher, S., 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*: 203, 201–218.
146. Wolniak, S.M., Larsen, P.M., 1992. Changes in the metaphase transit times and the pattern of sister chromatid separation in stamen hair cells of *Tradescantia* after treatment with protein phosphatase inhibitors. *Journal of Cell Science*: 102, 691–705.
147. Wormer, L., Cires, S., Carrasco, D., Quesada, A., 2008. Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study. *Harmful Algae*: 7, 206–213.
148. Wright, A.J., Smith, L.G., 2007. Division plane reorientation in plant cells. In Verma, D.P.S., Hong, Z.,: *Cell division control in plants*. *Plant Cell Monographs*: 9, 33–57.
149. Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*: 68, 251–305.
150. Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D., 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *Journal of Pathology*: 142, 67–77.
151. Yamamoto, T., Mori, Y., Ishibashi, T., Uchiyama, Y., Sakaguchi, N., Furukawa, T., Hashimoto, J., Kimura, S., Sakaguchi, K., 2004. Characterization of Rad6 from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.) and its interaction with Sgt1, a subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 314, 434–439.
152. Yamasaki, S., 1993. Probable effects of algal bloom on the growth of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steud. *Journal of Plant Research*: 106, 113–120.
153. Yin, L., Huang, J., Li, W., Liu, Y., 2006. Microcystin-RR-induced apoptosis in tobacco BY-2 cells. *Toxicon*: 48, 204–210.
154. Yin, L., Huang, J., Huang, W., Li, D., Liu, Y., 2005. Responses of antioxidant system in *Arabidopsis thaliana* suspension cells to the toxicity of microcystin-RR. *Toxicon*: 46, 859–864.
155. Yu, Q., Baluska, F., Jasper, F., Menzel, D., Goldbach, H.E., 2003. Short-term boron deprivation enhances levels of cytoskeletal proteins in maize, but not zucchini root apices. *Physiologia Plantarum*: 117, 270–278.
156. Yuan, M., Shaw, J.P., Warn, R.M., Lloyd, C.V., 1994. Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells. *PNAS*: 9, 6050–6053.
157. Zhang, K., Tsukitani, Y., John, P.C.L., 1992. Mitotic arrest in tobacco caused by the phosphoprotein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Plant and Cell Physiology*: 33, 677–668.

10.Függelék

A szerző fontosabb közleményei

a. Fontosabb, a témához kapcsolódó nemzetközi publikációk

1. Beyer D, Suranyi G, Vasas G., Roszik J., Erdodi, F., M-Hamvas, M., Bacsí, I., Batori, R., Serfozo, Z., Szigeti Z.M., Vereb, G., Demeter, Z., Gonda, S., Mathe, C., (2009). Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. *Toxicon* 54: 440-449.

Impact factor: 2,128

2. Máthé, Cs., M-Hamvas, M., Vasas, G., Surányi, Gy., Bácsi, I., Beyer, D., Tóth, Sz., Tímár, M., Borbély, G. (2007): Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis* /Cav./ Trin. Ex Steud.) plants regenerated from embryogenic calli. *New Phytologist* 176: 824-835 .

Impact factor: 5,249

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

Impact factor: 3,124

4. Jámbrik, K., Máthé, C., Vasas, G., Beyer, D., Molnár, E., Borbély, G., M-Hamvas, M., 2010. Microcystin-LR induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-prefering nuclease activity in *Phragmites australis*. *Plant Physiology: közlésre elfogadott kézirat*.

Impact factor: 2,500.

5. Szigeti, Z.M., Jámbrik, K., Roszik, J., M-Hamvas, M., Tándor, I., Beyer, D., Vasas, G., Vereb, G., Surányi, G., Máthé, C., 2010. Cytoskeletal and developmental alterations in *Ceratophyllum demersum* induced by microcystin-LR, a cyanobacterial toxin. *Aquatic Botany* 92: 179-184.

Impact factor: 1,697

b. Egyéb közlemények

1. Máthé, Cs., M. Hamvas, M., Vasas, G., Beyer, D., Surányi, Gy., Borbély, Gy. (2006): A mikrocisztin-LR (cianotoxin) hatása a kalluszból regenerált nádnövények szöveti felépítésére, in *XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére*, JATE Press, Szeged, pp. 45-48.

2. Mikóné Hamvas M., Jámbrik K., Beyer D., Máthé Cs., Vasas G., Bácsi I., Borbély Gy. (2008): A mikrocisztin-LR (cianotoxin) hatásai különböző vízinövényfajokra. In: Orosz Z., Szabó V., Molnár G., Fazekas I. (szerk.) IV. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia kiadványa. Debrecen, 2008. ISBN 978-963-06-4626-0. pp. 247-253.

3. Demeter, Z., Surányi, G., Molnár, V.A., Sramkó, G., Beyer, D., Kónya, Z., Vasas, G., M-Hamvas, M., Máthé, C., 2010. Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100: 349-353.

Impact factor: 1,271

c. Konferencia előadások és posztterek:

1. Máthé, Cs., M. Hamvas, M., Vasas, G., Beyer, D., Surányi, Gy., Borbély, Gy.: A mikrocisztin-LR (cianotoxin) hatása a kalluszból regenerált nádnövények szöveti felépítésére, *XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére, Budapest, 2006. Előadás.*

2. Beyer, D., Máthé, Cs., M.Hamvas, M., Surányi, Gy., Vasas, G., Borbély, Gy.: A mikrocisztin-LR által okozott kromatinszerkezet változások növényi sejtekben. *XII. Magyar Növényanatómiai Szimpózium Sárkány Sándor emlékére, Budapest, 2006. Poszter.*

3. Vasas G., M-Hamvas M., Máthé Cs., Surányi Gy., Tóth Sz., Jámbrik K., Beyer D., Bácsi I., Borbely G. (2007): Microcystin-LR inhibits the growth and xylem tissue development of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *7th International Conference on Toxic Cyanobacteria 5-10 August, 2007, Rio de Janeiro State – Brazil*. Poster. Official Program and Abstract Book: p. 120.

4. Jámbrik K., M-Hamvas M., Beyer D., Máthé Cs., Vasas G., Bácsi I., Borbély Gy. (2008): A mikrocisztin-LR (cianotoxin) hatásai különböző vizinövényfajokra. *IV. Kárpát-medencei Környezettudományi Konferencia. Debrecen, 2008. március 28-29. Poszterelőadás.*

5. Mikóné Hamvas M., Tomku E., Jámbrik K., Máthé Cs., Beyer D., Béres V., Borbély Gy. Proteáz aktivitás kimutatása vízvirágzásokat okozó cianobaktérium fajokból. *L. Hidrobiológus Napok. Tihany, 2008. október 1-3. Poszterelőadás.*

6. Jámbrik K., Mikóné Hamvas M., Máthé Cs., Beyer D., Tóth Sz., Surányi Gy., Borbély Gy. Vizinövények cilindropermopszinnal szembeni érzékenységének vizsgálata. *L. Hidrobiológus Napok. Tihany, 2008. október 1-3. Poszterelőadás*