



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

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Garda Tamás

Témavezető:  
Dr. Máthé Csaba  
Egyetemi docens

Debreceni Egyetem  
Természettudományi Doktori Tanács  
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola  
Debrecen, 2017

## A doktori értekezés betétlapja

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

Debrecen, évszám.

.....

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy **Garda Tamás** doktorjelölt **2014-2017** között a fent megnevezett Doktori Iskola **Biológia doktori** programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, évszám.

.....

a témavezető aláírása

## A doktori értekezés betétlapja

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

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

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

Írta: **Garda Tamás** okleveles Biológus

Készült a Debreceni Egyetem **Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája**  
(**Biológia Doktori program** programja) keretében

Témavezető:

Témavezető neve

Dr. Máthé Csaba

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Karaffa Levente

.....

tagok: Horváth V. Gábor

.....

Bácsi István

.....

A doktori szigorlat időpontja: 2017. május 29.

Az értekezés bírálói:

.....

.....

.....

.....

A bírálóbizottság:

elnök: .....

.....

tagok: .....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Az értekezés védésének időpontja: .....

# Tartalom

1. Bevezetés és célkitűzés .....	1
2. Irodalmi áttekintés .....	4
2.1. Cianobaktériumok és a vízvirágzás .....	4
2.2. A cilindropermopszin (CYN).....	6
2.3. A mikrocisztinek (MCY-LR) .....	10
2.4. A PP1 és PP2A funkciója a növényekben .....	14
2.5. A növényi citoszkeleton .....	18
2.6. A DNS replikáció és a kromoszóma szegregáció.....	27
3. Anyag és módszer .....	36
3.1. A cilindropermopszin tisztítása.....	36
3.2. A mikrocisztin-LR tisztítása.....	36
3.3 Terepi mintavétel.....	37
3.4. A <i>Vicia faba</i> csíranövények nevelése, és toxinkezelés.....	37
3.5. Növekedés vizsgálatok .....	38
3.6. Hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerek .....	39
3.7. Az oldalgyökér csúcsmerisztéma sejtek mitotikus aktivitásának vizsgálata .....	41
3.8. <i>In vivo</i> és <i>in vitro</i> DNS szintézis vizsgálatok .....	41
3.9. Peroxidáz (POD) és kataláz (CAT) enzimaktivitás meghatározás gélelektroforézissel.....	44
3.10. Kromoszóma („squash”) preparátumok készítése .....	44
3.11. Protein foszfatázok (PP1 és PP2A) aktivitásának vizsgálata .....	45
4. Eredmények.....	46
4.1. Bárdos-tóból származó terepi minták citológiai vizsgálata .....	46
4.2. MCY-LR hatása a metafázis és anafázis orsó organizációjára.....	51
4.3. MCY-LR hatása a teljes protein foszfatáz aktivitásra <i>V. faba</i> gyökérben .....	60

4.4. MCY-LR hatása a ROS szintre és az antioxidáns enzim aktivitásra...	62
4.5. CYN hatása a <i>Vicia faba</i> csíranövények növekedésére és fejlődésére	64
4.6. A CYN hisztológiai és citológiai hatása különböző állandósult szövetekben és interfázisos merisztéma sejtekben .....	66
4.7. CYN hatása a kromoszóma morfológiára .....	68
4.8. CYN hatása a mitotikus aktivitásra és a preprofázis kötegre (PPB) nem szinkronizált merisztéma sejtekben .....	68
4.9. <i>In vivo</i> és <i>in vitro</i> DNS szintézis vizsgálatok .....	73
4.10. A CYN rövidtávú hatása a mitózisra és a protein szintézisre.....	75
5. Az eredmények megbeszélése.....	78
5.1. MCY-LR.....	78
5.2. CYN.....	86
6. Összefoglalás.....	92
7. English summary: Investigation of subcellular events in plant cells with cyanotoxins.....	95
7.1. Introduction .....	95
7.2. Goals of the study .....	96
7.3. Summary of results .....	97
8. Köszönetnyilvánítás .....	100
9. Irodalomjegyzék.....	101
10. Függelék .....	121
10.1. A szerző fontosabb közleményei .....	121
10.2. Függelék ábra .....	122

## A rövidítések jegyzéke

ABP - aktin kötő fehérje  
ACT1, ATC2 és ATC7 - Arabidopsis aktin gének  
ADDA - 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-diénsav  
ADF - aktin-depolimerizáló-faktor  
APC/C - anafázis-elősegítő komplex/cikloszóma  
ASA - aszkorbinsav  
AtAUR - *Arabidopsis thaliana* aurora kináz  
AUG8 - augmin komplex 8-as alegysége  
AUR1, AUR2 és AUR3 - aurora kináz1, 2 és 3  
BrdU - 5-bróm-2'-dezoxiuridin  
BSA - borjúsérum albumin  
Cap1 - adenilát-cikláz-asszociált fehérje 1  
CAT - kataláz  
CDC6 - cell division cycle 6  
CDK – ciklin dependens kinázok  
CDKA- A-típusú növényi CDK, PSTAIRE jellegzetes motívummal  
CDKB- B-típusú növényi CDK-k PPTALRE vagy PPTTLRE motívummal  
CDS - kortikális osztódási sík  
CDT1 - cdc10-dependent transcript 1  
CDZ - Cortical Division Zone  
CH - cikloheximid  
CLASP - cytoplasmic linker associated protein  
CMT - kortikális mikrotubulus  
CYCB és CYCD - B-, és D-típusú ciklin  
CYN - cilindrospermopszin  
DAPI - 4',6'-diamidino-2-fenilindol  
DCFH-DA - 2',7'-diklorofluoreszcein-diacetát  
E2F - sejtsztódásban szerepet játszó transzkripció faktor  
EMT - endoplazmatikus mikrotubulus  
ETG1 - E2F target genes 1  
GEM - GL2 expressziós modulátor  
GSH - glutation  
H3S10ph - hiszton H3 10-es pozíciójú szerinnél történő foszforilációja  
HU - hidroxürea  
I1 és I2 - protein foszfatáz inhibitor-1, 2  
I3 - növényi PP1 partner inhibitor-3  
IC<sub>50</sub> - 50%-os gátló koncentráció  
KRP - Kip-Related Protein  
MAP - mikrotubulus asszociált fehérje

MAPK - mitogén aktiválta protein kináz  
MCM - Minichromosome maintenance complex  
MCY-LR - mikrocisztin-LR  
MDHA - N-metildehidroalanin  
MPF - Mitosis Promoting Factor  
MTOC - mikrotubulus organizációs centrum  
NEB - Nuclear Envelope Breakdown  
NIPP1 - PP1 alegység, amely gátolja a PP1 aktivitását (nuclear inhibitor of protein phosphatase 1)  
NPK1 - CDK foszforilált MAPK-kináz-kináz  
OATP - anion transzport fehérjék  
ORC1, ORC2 és ORC6 - replikációs origó komplexek  
PBS - NaCl tartalmú foszfát puffer  
PCD - programozott sejthalál  
PFA - paraformaldehid  
POD - peroxidáz  
PP1 - 1-es típusú szerin/treonin protein foszfatáz  
PP2A - 2A típusú szerin/treonin protein foszfatáz  
PP2B - 2B típusú szerin/treonin protein foszfatáz  
PP2C/PPM - 2C típusú szerin/treonin protein foszfatáz  
PPB - preprofázis köteg  
PPM - magnézium-függő protein foszfatáz család  
PPP - foszfoprotein foszfatáz család  
PRSL - PP1 szabályozó alegység  
PS I - I. fotokémiai rendszer  
PS II - II. fotokémiai rendszer  
PTP - foszfortirozin foszfatáz család  
Ran-GAP - Ran GTPáz-t aktiváló fehérje  
RBR - retinoblasztóma típusú fehérje család  
RCN1 - PP2A A1 alegysége (Root Curl in Naphthylthalamic Acid)  
RGB1 - RBR növényi retinoblasztóma-homológ gén  
ROS - reaktív oxigéngyökök  
RSS1 - Rice Salt Sensitive 1, PP1 szabályozó fehérje faktor  
RVxF - PP1 katalitikus alegység-kötő motívum a regulátor alegységen  
SDS22 - DIS2 szupresszor  
TAN - TANGLED a kortikális osztódási sík pozitív markere  
TAP46 - PP2A, PP4 és PP6 szabályozó alegység ( $\alpha 4$  emberben)  
TON2/FASS és TON1 - PP2A szabályozó alegységek  
TPX2 - Xklp2 (kinezin-szerű fehérje) célfehérjéje

# 1. Bevezetés és célkitűzés

Napjainkban igen komoly környezeti problémát okoznak a felszíni vizekben létrejövő cianobakteriális vízvirágzások. A vízvirágzásokat a feldúsult szerves anyag mennyiség következtében elszaporodott cianobaktériumok okozzák. A cianobaktériumok az egész élővilágban elterjedt fotoszintetizáló prokarióta szervezetek. A vízvirágzás főleg nyáron figyelhető meg, amikor is hosszabb ideig van meleg és napos időjárás (Carmichael, 1992; Walker, 2014). Hazai vízvirágzást eddig a cianobaktériumok néhány faja eredményezett, mint például *Anabaena spiroides*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis sp.* és az *Aphanizomenon flos-aquae* (Vasas és mtsai., 2004). Maguk a cianobakteriális toxinok a vízvirágzások alkalmával dúsulnak fel a felszíni vizekben. Az elmúlt néhány évtizedben széles körben elterjedt az a felismerés, hogy az eutrofizáció miatt megjelenő cianobakteriális toxinok számos egészségügyi és ökológiai kockázatot jelentenek (Carmichael, 1992; Walker, 2014). Ezen fotoszintetizáló szervezetek által termelt metabolitok igen széles skálája ismeretes és nem ritka, hogy ezek a metabolitok hatással vannak az élőlényekre. Mindazonáltal a természetes funkciójuk nem teljesen világos. Jelen tanulmányban két cianobakteriális toxin hatásait és azok biokémiai hátterét vizsgáltuk *Vicia faba* csíranövényekben. Az egyik cianobakteriális toxin az alkaloid típusú cilindrospermopszin (CYN) a másik pedig a heptapeptid típusú mikrocisztin-LR (MCY-LR). Mindkét toxinról ismeretes hogy elsősorban májkárosító hatásúak. A MCY-LR a gerincesek szervezetében a májsejtekben halmozódik fel az aktív membrán transzporton keresztül. Ezen kívül felhalmozódhat még a vesében, a halak és az emlősök izomzatában és a szívben is (Kankaanpää és mtsai, 2002; Chen és Xie, 2005). A MCY-LR gátolja az 1 és 2A típusú szerin/treonin protein foszfatázokat,

ami a sejtek protein foszforilációs/defoszforilációs egyensúlyának a felborulásához vezet, illetve oxidatív stresszt is indukál. A protein foszfatáz gátló hatását illetve a ROS indukciót kimutatták növényi és állati sejtekben egyaránt (Pflugmacher, 2002; Gácsi és mtsai, 2009, Campos and Vasconcelos, 2010; Jiang és mtsai, 2011). A MCY-LR által indukált mitotikus orsó rendellenességek tisztázatlanok mind állati mind növényi sejtekben. Ennek tisztázása közelebb juttat minket a MCY-LR toxicitásának megértéséhez. Emlősökben a CYN elsősorban a májra hat, de káros hatása érvényesül a timuszban, a lépben, a szívben és a vesében is (Runnegar és Lu, 1994; Runnegar és mtsai, 1995; Azevedo és mtsai, 2002). Gácsi és mtsai (2009) megfigyelték a mikrofilamentumoknak és a mikrotubulusoknak CYN hatására bekövetkező dezorganizációját állati sejtekben. A CYN továbbá a fehérjeszintézist is gátolja az eukarióta szervezetekben, bár a pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert (Froscio és mtsai 2008). Kutatócsoportunk kimutatta, hogy a CYN növekedés gátlást indukál a növényekben, illetve a mikrotubulusok rendellenes orientációját idézi elő (Vasas és mtsai, 2002, Beyer és mtsai, 2009).

### **Célkitűzések:**

- 1, Célunk volt, hogy felfedjük a MCY-LR által indukált osztódási orsó rendellenességek összes típusát a *V. faba* oldalgyökér csúcsok osztódó szövetében.
- 2, Továbbá célunk volt annak feltárása, hogy a MCY-LR által indukált protein foszfatáz gátlás vagy a ROS indukció az elsődleges oka a rendellenes mikrotubuláris struktúrák kialakulásának.
- 3, A CYN növekedésre és fejlődésre kifejtett hatásának vizsgálata *V. faba* csíranövényeken.

4, A CYN osztódó sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata különös tekintettel az osztódás során kialakuló mikrotubuláris struktúrákra illetve a nem osztódó sejtek kromatin állományára.

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

## 2. Irodalmi áttekintés

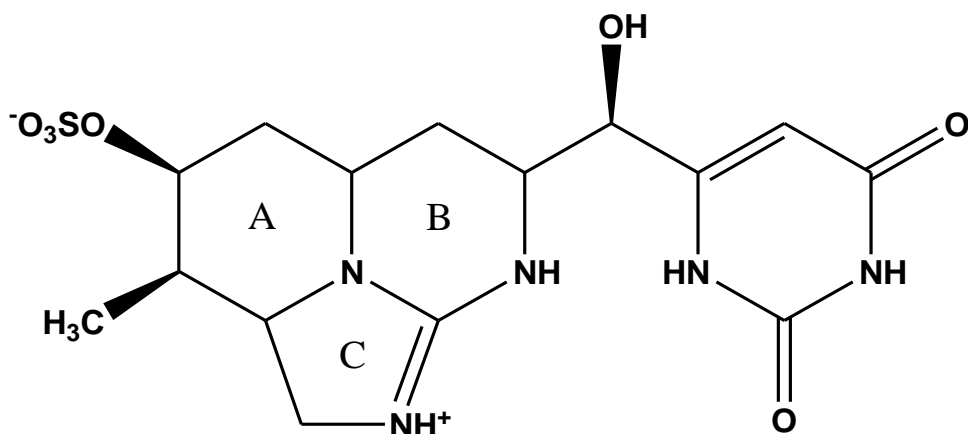
### 2.1. Cianobaktériumok és a vízvirágzás

A cianobaktériumok kozmopolita élőlényként számos élőhelyen, de hőforrásokban és sóstavakban, más szélsőséges élőhelyen is megjelenhetnek a Földön (Rai, 1990). Evolúciós jelentőségük abban rejlik, hogy oxigéntermelő fotoszintézisük révén a Föld légkörébe juttatott nagy mennyiségű oxigén lehetővé tette a magasabb rendű élőlények kialakulását. Már 3,4 milliárd évvel ezelőtt igen nagy tömegben voltak jelen a Földön (Whitton, 1992). A cianobaktériumok maguk prokarióta élőlények, ami azt jelenti, hogy nem tartalmaznak membránnal határolt sejtorganelumokat és valódi sejtmagot, mint az eukarióta algák. A sejtmembránjuk kettős foszfolipid réteg alkotta egységmembrán, amely a Gram-negatív sejtfa része. A fehérjeszintetizáló rendszer felépítésében 70S riboszómák vesznek részt. A cianobaktériumok fotoszintetizáló élőlények, amelyekben már megfigyelhető a tilakoid membránrendszer, amelyet a fotoszintetikus pigmentek építenek fel. A sejtek színezettsége igen változatos lehet, de az esetek többségében a klorofill-a elfedi a járulékos pigmentek és a karotinoidok színezettségét (Fay, 1965; Bryant, 1994). A cianobaktériumok esetében az oxigéntermelő szervezetek mindkét reakciócentruma (PS I és PSII) megtalálható a fotoszintetikus apparátusban. Jellemző rájuk a kromatikus adaptáció is, amely lehetővé teszi a különböző fényviszonyú helyekhez való alkalmazkodásukat. Ebben fontos szerepet tölt be a sok fajnál jelenlévő gázvakuólum, amely a sejtek fajsúlyának szabályozásáért felelős (Bryant, 1994). A cianobaktériumok képesek továbbá az alapvető anyagcsere-termékek és tápanyagok raktározására is. Az alapvető anyagcsere-folyamataik része a légköri nitrogén megkötése egyes cianobaktériumoknál, amelyet ammóniummá ( $\text{NH}_4^+$ ) alakítanak a nitrogenáz enzim működése révén (Fay és

Van Baalen, 1987). A cianobaktériumok toxintermelő képessége nem definitív tulajdonság, mivel minden cianobaktérium faj esetében vannak toxikus és nem-toxikus törzsek is. Toxikus törzsek találhatóak pl. a *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena flos-aquae*, *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon ovalisporum* és *Cylindrospermopsis raciborski* fajokban (Carmichael, 1992).

A vízvirágzás alatt a felszíni vizekben élő planktonszervezetek tömeges elszaporodását értjük, amely a víz zavarosságával és intenzív elszíneződésével jár (zöld, kékeszöld). Az édesvizekben bekövetkező vízvirágzásokat főleg a cianobaktériumok idézik elő tömeges elszaporodásukkal (Heisler és mtsai, 2008). Ezen cianobakteriális vízvirágzások kialakulásában igen fontos szerepe van a vizekben feldúsuló nitrogénnek és foszfornek viszont nem csak a foszfáttal és nitráttal terhelt vizekre jellemző (Reynolds és Walsby, 1975). Hazánkban elsőként 1934-ben írták le a jelenséget elsőként a tihanyi Balatoni Limnológiai Kutatóintézet előtti Kis-öbölben, ahol is *Microcystis aeruginosa* és *Microcystis flos-aquae* okozott vízvirágzást (Entz és Sebestyén, 1942). A cianotoxinok koncentrációja a toxintermelő fajok által kiváltott vízvirágzások során emelkedhet veszélyes szintre (Carmichael, 1994). A vízvirágzások során leggyakrabban előforduló cianotoxinok a mikrocisztin és nodularin családból kerülnek ki, amelyek a ciklikus peptidek közé tartoznak (Carmichael, 1992).

## 2.2. A cilindropermopszin (CYN)



1. ábra: CYN szerkezeti képlete (Runnegar és mtsai, 2002).

A cilindropermopszin (CYN) egy hidroximetiluracil csoportot tartalmazó triciklikus guanidin származék, a molekulatömege 416 Da, amelyet főként az *Aphanizomenon* és *Cylindrospermopsis* genuszba tartozó törzsek termelnek. A CYN egy vízben nagyon jól oldódó cianobakteriális poliketid eredetű alkaloid, amely nem érzékeny a fény (beleértve UV), pH és a hőmérséklet változásaira. A CYN-t a szakirodalom a guanidin rész bázikus csoportja miatt az alkaloidok csoportjába sorolja, azonban a szulfát csoportja miatt ikerionos szerkezetű (Ohtani és mtsai, 1992; Sivonen és Jones, 1999; Mehnert és mtsai, 2010). Banker és mtsai, (2001) szerint a szerkezetében fellelhető uracil rész feltétlenül szükséges a toxikus hatásához. A toxin több funkciós csoporttal rendelkezik, mint az uracil gyűrű, a szulfát és a guanidin. Az oxidáló szerek hatására a funkciós csoportok különböző reakcióképeséget mutatnak, de az uracil gyűrű a leginkább hajlamos az oxidációra (de la Cruz és mtsai, 2013). Mérgező hatására 1979-ben egy ausztráliai vízvirágzás kapcsán figyeltek fel, amely során 138 gyerek és 10 fiatal felnőtt betegedett meg, a mérgezés tünetei hányás, étvágytalanság,

rossz közérzet, illetve előrehaladott állapotban véres hasmenés, acidotikus sokk és véres vizelet voltak. A betegséget “Palm Island mystery disease-nek,” nevezték el (Francis, 1878, Byth, 1980). A CYN-t elsőként 1992-ben tisztították *Cylindrospermopsis raciborskii*-ből valamint ekkor jellemezték és nevezték el. A természetben előforduló CYN analógok a 7-epicilindrospermopszin és a deoxy-cilindrospermopszin (Ohtani és mtsai, 1992, Seifert és mtsai, 2007). A CYN bioszintézisében 15 gént írtak le.

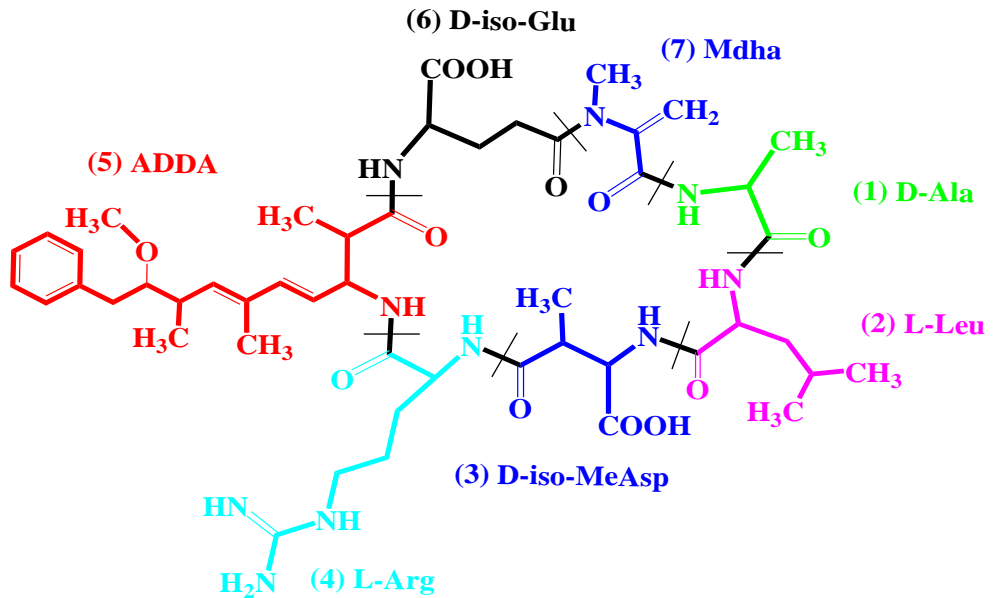
Hatását tekintve igen változatos mind állati mind növényi sejtekre nézve. A CYN toxicitásának két módját ismerjük, az úgynevezett gyors és hosszú távú toxicitási mechanizmust. A gyors toxicitás esetében a méregtelenítésben résztvevő citokróm P-450 rendszer működése közben más vegyületek keletkeznek belőle, amelyek így reakcióképessé válnak a DNS-sel. Ez a típusú toxicitás nem bizonyult általánosnak az eukariótákban. A hosszútávú toxicitási mechanizmus magába foglalja az eukarióta protein szintézis, glutation szintézis, pirimidin nukleotid szintézis gátlását illetve interferálhat az eukarióta DNS szintézissel és transzkripcióval is- (Humpage és mtsai, 2005, Falconer és mtsai, 2001, Reisner és mtsai, 2004). Runnegar és mtsai (2002) patkány hepatocita sejt kultúrában figyeltek meg toxin okozta sejthalált, amely a csökkent glutation (GSH) szint miatt alakult ki, és ez a GSH szintézis gátlásával függött össze (CYN IC<sub>50</sub> értéke 2,38 µM). A CYN IC<sub>50</sub> értékét meghatározták továbbá *in vitro* nyúl leukocita lizátum rendszerben (IC<sub>50</sub>= 0,21 µM) és *in vivo* patkány májsejtekben is (IC<sub>50</sub>= 1,28 µM) (Runnegar és mtsai, 2002). Nekrózist figyeltek meg Swiss albinó és IRC egerek májában 70 mg kg<sup>-1</sup> (*Cylindrospermopsis raciborskii* liofilizált sejt kivonat), és *Oreochromis niloticus* (Nílusi tilápia) hasnyálmirigyben 0,2 mg kg<sup>-1</sup> (tisztított CYN) CYN hatására (Gutiérrez-Praena és mtsai, 2012). A CYN centrilobuláris nekrozissal jellemezhető májkárosító hatása az emlősökben általánosan megfigyelhető, amely során a májsejtek erőteljesen

vakuolizálódnak és megnövekszik a sejtek közötti tér (Guzmán-Guillén és mtsai, 2015). CYN hatására a mikrotubulusok és mikrofilamentumok dezorganizációját illetve a kromatin szerkezet megváltozását írták le CHO-K1 sejtekben (Gácsai és mtsai, 2009).

A humán és állati sejt kísérleteknél nagyságrendekkel kevesebb szerző tárgyalja a CYN növényekre kifejtett hatását (1. táblázat). Vasas és mtsai (2002) *Sinapis alba* (fehér mustár) csíranövényeken a CYN gátló hatását tapasztalták az axiális szervekre nézve. Beyer és mtsai (2009) *Phragmites australis* (nád) gyökércsúcs sejtekben vizsgálták a CYN hatását. Szövettenyészetből származó *P. australis* növények axiális szerveinek (gyökér és hajtás) a megnyúlásos növekedésének gátlását tapasztalták 10 napos kezelések hatására, de a gyökerek száma a kezelések hatására emelkedett. Hasonló gyökérszám növekedést írtak le *Cylindrospermopsis raciborskii* sejt-kivonattal kezelt *Hydrilla verticillata* vizinövényen (Kinneer és mtsai, 2008). A gyökér megnyúlásos növekedése sokkal érzékenyebben reagál a kezelésre, mint a hajtás. A gyökér esetében a mért IC<sub>50</sub> érték 0,5 µg ml<sup>-1</sup> CYN koncentráció. 0,5 és 5 µg ml<sup>-1</sup> toxin koncentráció tartományban a mitotikus aktivitás emelkedését tapasztalták a merisztéma szövetekben. 2,5 µg ml<sup>-1</sup> CYN kezelés hatására hasadt és dupla preprofázis köteget (PPB), míg 5 µg ml<sup>-1</sup> CYN hatására anafázisban a testvérkromatidák rendellenes szétválását figyelték meg (Beyer és mtsai, 2009). A növényekben is kimutatták a CYN fehérjeszintézis gátló hatását illetve *Nicotiana tabacum* (dohány) pollenen CYN kezelés hatására pollentömlő növekedés gátlást tapasztaltak, amelynek IC<sub>50</sub> értéke 300 µg ml<sup>-1</sup> CYN volt. A protein szintézis gátlásának mérését *in vitro* tesztrendszerben radioaktívan jelzett L-leucin-nal (<sup>14</sup>C(U)-L-leucine) vizsgálták (Metcalf és mtsai, 2004).

<b>1. táblázat: CYN által indukált citoskeletális rendellenességek növényekben (Máthé és mtsai, (2017) nyomán)</b>				
<b>Növényekre gyakorolt hatás</b>	<b>CYN koncentráció</b>	<b>Célszervezet/sejttípus</b>	<b>Biokémiai háttér</b>	<b>Referencia</b>
A nem mitotikus sejtek mikrotubulus sűrűségének csökkenése/mikrotubulusok átrendeződése	0.5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 10 nap	<i>Phragmites australis</i> gyökércsúcs sejtek		Beyer és mtsai, 2009
A mitózis átmeneti stimulálása	0.1-5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ hosszú távú (6 és 10 nap)	<i>Phragmites australis</i> gyökércsúcs sejtek		Beyer és mtsai, 2009
Növekedés gátlás	18 $\mu\text{g mL}^{-1}$	<i>Sinapis alba</i>		Vasas és mtsai, 2002
A mitotikus mikrotubulusok zavara és lemaradó kromoszómák	0.1-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , hosszú távú (10 nap)	<i>Phragmites australis</i> gyökércsúcs sejtek	Az MTOC-ból eredő mikrotubulus kötegek csökkenése és a fehérje szintézis gátlása	Beyer és mtsai, 2009
Növények növekedésének serkentése	Sejt kivonat 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CYN tartalommal	<i>Hydrilla verticillata</i>		Kinnear és mtsai, 2008
Nekrózis	0.1-40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 10d	<i>Phragmites australis</i> gyökér		Beyer és mtsai, 2009
Sejthalál?	0.05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mustár (4 nap); 1-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ saláta 1-7 nap; 2,5 és 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ békalencse	<i>Oryza sativa</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lemna minor</i> csíranövények	Oxidatív stressz indukció; POD, SOD aktivitás növekedés, $\text{H}_2\text{O}_2$ szintjének emelkedés	M-Hamvas és mtsai, 2010; Prieto és mtsai, 2011; Freitas és mtsai, 2015; Flores-Rojas és mtsai, 2015

### 2.3. A mikrocisztinek (MCY-LR)



2. ábra: MCY-LR szerkezeti képlete (Chen és Xie, 2016).

A mikrocisztinek számos cianobaktérium nemzetség termeli, mint például *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* és *Nostoc* nemzetségek (Wiegand és mtsai, 2005). A mikrocisztinek mintegy 1000 Da molekulatömegű molekulák. Jelenleg több mint 100 mikrocisztin variánst írtak le, de ezek közül a MCY-LR a leggyakrabban előforduló és tanulmányozott variáns (Carmichael és mtsai, 1992, Campos és mtsai, 2010). A mikrocisztin-LR egy ciklikus heptapeptid szerkezetű cianobakteriális toxin, melynek felépítésében megtalálhatóak D-, és L-aminosavak mellett más aminosavak is, mint a hidrofób  $\beta$ -aminosav, a 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeka-4,6-diénsav (ADDA) és az N-metildehidroalanin (MDHA) (Botes és mtsai, 1985). A mikrocisztinek főleg a 2 L-aminosav oldalláncukban térnek el. A MCY-LR esetében a 2. aminosav L-leucin, a 4. L-arginin (Botes és mtsai, 1985; Boaru és mtsai, 2006; Puddick és mtsai,

2014). A MCY-LR elsődleges célpontjai az 1 és a 2A típusú, szerin-treonin protein foszfatázok (PP1 és PP2A), ennek következtében az számos metabolikus és/vagy jelátviteli útvonallal interferálhat eukariótákban, köztük a növényi sejtekben is. *In vitro* körülmények között 0,1-0,25 nM közötti koncentráció tartományban állapították meg a MCY-LR IC<sub>50</sub> értékét a protein foszfatáz gátlásra nézve (MacKintosh és mtsai, 1990, Wiegand és mtsai, 2005). A MCY-LR MDHA metilén csoportja a PP1 és a PP2A esetében is a katalitikus alegységhez kovalensen kötődik, de ez nem szükséges a protein foszfatázok gátlásához. (Zhang és mtsai, 1992, MacKintosh és mtsai, 1995). A gátló hatásért az ADDA oldallánc a felelős mivel a hidrofób szénlánc behatol a protein foszfatázok aktív centrumába (Goldberg és mtsai, 1995). A szintetikus mikrocisztinek illetve azok a természetben is előforduló mikrocisztinek, amelyeknek hiányzik az ADDA oldalláncuk, nem toxikusak, így az ADDA központi szerepet játszik a toxicitásban. (Abdel-Rahman és mtsai, 1993). A MCY-LR a protein foszfatázok gátlása mellett reaktív oxigénformák (ROS) képződést is indukálja a redukált glutation megkötésével. Ennek hatására a sejtek nem képesek a ROS eliminálására (Bouaï és Maatouk, 2004). Hatása igen változatos humán, állati illetve növényi sejtre nézve. Emberi szempontból a szájon át történő bevitel a legfőbb expozíciós útvonal. A toxin tumort elősegítő potenciálja összefügghet a toxin dóziséval olyan ivóvizekben, amelyeket cianobaktériumok által kontaminált természetes víztárolókból nyernek (Nishiwaki-Matsushima és mtsai, 1992). A MCY-LR toxikus hatásai elsősorban a májat és az emésztőrendszert érintik, mivel az enterociták és a hepatociták már kis koncentráció esetén is képesek a MCY-LR-t felvenni. A mikrocisztinek a májban halmozódnak fel az epesav transzport rendszeren keresztül. Ebben a rendszerben olyan fehérjék találhatóak, amelyek képesek peptideket szállítani a májsejtekbe (OATP, anion transzport fehérjék)

(Wolkoff és mtsai, 2003, Daily és mtsai, 2010). Más típusú sejtek is képesek a MCY-ket felvenni, de csak abban az esetben, ha a toxin a letális koncentráció fölötti tartományban van jelen (Lankoff és mtsai, 2003; Alverca és mtsai, 2009). Állati szervezetekben a mérgezés leggyakoribb jelensége a májkárosodás, amely a membrán integritás elvesztésével kezdődik, majd pedig ezt követi a citoszkeletális dezorganizáció, lipid peroxidáció, DNS károsodás, apoptózis, nekrozis és a végül hemorrhagiás sokk általi halál (Rastogi és mtsai, 2014). Frangež és munkatársai (2003) nyúl embrió sejtekben valamint Máthé és munkatársai (2009) *Phragmites australis*-ban mutatták ki a MCY-LR hatására bekövetkező mikrotubulus destabilizációt és a részleges vagy teljes depolimerizációt. Ezeknek az elváltozásoknak a hátterében valószínűleg a protein foszfatázok gátlása illetve a ROS képződés állhat. Rövidtávú kísérletek során 500 nM-os MCY kezelés hatására megfigyelték a mikrotubulus függő vezikulumok mozgásának károsodását patkány hepatocita kultúrában, amelyet a dineinek nehéz és közepes láncainak a hiperfoszforilációja okozott (Runnegar és mtsai, 1999). A MCY-LR a növényekre is toxikus hatású, *Ceratophyllum demersum* (érdes tócsagaz) gyökércsúcsban a mikrotubulusok reorientációját és a sejtciklus profázisban való megrekedését írták le. Ismert az is, hogy a cianotoxin biokémiai szinten stressz választ indukál. Ezek közé tartozik például az egyszálú DNáz (egyszálú DNS-specifikus nukleáz) és a peroxidáz-aktivitás emelkedése (M-Hamvas és mtsai, 2003; Szigeti és mtsai, 2010).

<b>2. táblázat: MCY által okozott rendellenességek növényekben (Máthé és mtsai, 2016 nyomán)</b>				
<b>Növényekre gyakorolt hatás</b>	<b>MCY koncentráció</b>	<b>Célszervezet/sejttípus</b>	<b>Biokémiai háttér</b>	<b>Referencia</b>
Mikrotubuláris destabilizáció/részleges vagy teljes depolimerizáció	MCY-LR, 10-20 $\mu\text{M}$	<i>Phragmites australis</i> gyökér	Valószínűleg a PP1 és PP2A gátlása és ROS indukció	Máthé és mtsai, 2009
Mikrotubuláris reorientáció	MCY-LR, 0.01-10 $\mu\text{M}$	<i>C. demersum</i> gyökér csúcsok		Szigeti és mtsai, 2010
A mikrotubulusok túlzott kötegelése interfázisos sejtekben, tripoláris és monopoláris osztódási orsók, rendellenes fragmoplaszt organizáció a mitotikus sejtekben	MCY-LR 0.1-20 $\mu\text{M}$	<i>Phragmites australis</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>V. faba</i>	Valószínűleg a PP1 és PP2A gátlása és az azt követő MAP-ok hiperfoszforilációja és ROS indukció	Máthé és mtsai, 2009; Beyer és mtsai, 2012
Metfázis-anafázis átmenet késleltetése, kromoszóma kondenzációs és osztódási orsó zavarok	MCY-LR, MCY-RR (5 $\mu\text{M}$ ), rövid távú kezelések	<i>Tradescantia</i> porzó szőrsejtek	PP2A gátlás	Wolniak és Larsen, 1992; Beyer és mtsai, 2012
A sejtek profázisban való megállítása, amit a PPB gyakorisága jelez	MCY-LR (0.01-10 $\mu\text{M}$ ), hosszú távú kezelések	<i>Ceratophyllum demersum</i> gyökér csúcsok	Valószínűleg PP2A gátlás	Szigeti és mtsai, 2010
Növekedés gátlás és nekrozis	MCY-LR	<i>Sinapis alba</i> , <i>Phragmites australis</i>	nem tisztázott	M-Hamvas és mtsai, 2003; Máthé és mtsai, 2007

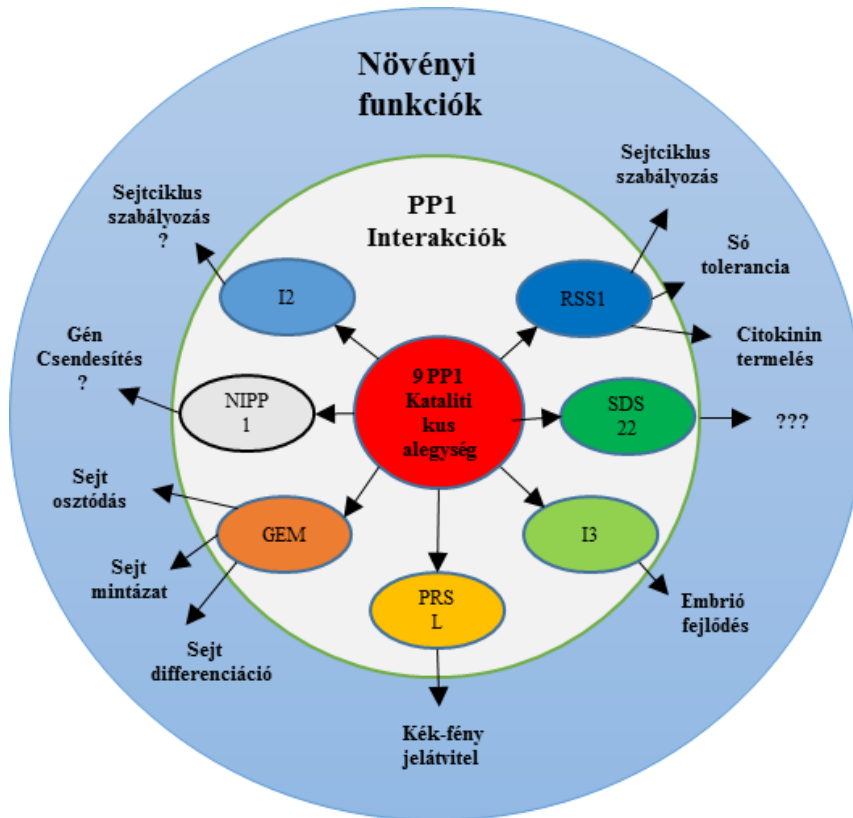
## 2.4. A PP1 és PP2A funkciója a növényekben

A növényekben és állatokban a fehérjék reverzibilis foszforilációja szabályoz celluláris folyamatokat. A fehérjék foszforilációs státusza a protein kinázok és protein foszfatázok aktivitásának szabályozása alatt áll. Az eukarióta fehérjék defoszforilációja főként szerin/treonin protein foszfatázok szabályozása révén valósul meg. Állatokban a protein foszforilációnak igen fontos szerepe van különböző sejtszintű folyamatokban, mint például a glikogén metabolizmus, a sejtciklus szabályozás és különböző szignál transzdukciós útvonalak. Növényekben is megfigyeltek protein foszfatáz aktivitást például a mitokondriumokban, a kloroplasztiszokban, a sejtmagban és a citoszolban. Mivel egyes növényi és állati protein foszfatázok evolúciósan konzerváltak, ezért rövid idő alatt sikerült a növényekben is jellemezni az emlős 1-es és 2-es típusú szerin/treonin protein foszfatázokat (PP1 és PP2). A növényekben a PP1 és PP2 aktivitásnak fontos szerepe van a jelátvitelben, a hormonális szabályozásban, a mitózisban valamint a szén és nitrogén anyagcserében (Smith és Walker 1996; Luan, 2003). A PP2 további három alcsoportra osztható az alegység szerkezet és szubsztrát specifikáció alapján (PP2A, PP2B, PP2C) (Cohen és Cohen 1989).

A protein foszfatázokat 4 csoportba sorolhatjuk: PP1, amelyek aktivitását a hőstabil fehérjék I1 és I2 inhibitor fehérjék gátolják; PP2, aktivitásukat a hőstabil I1 és I2 nem gátolja. A PP2 család további 3 alcsaládra osztható. Az első a PP2A melynek nincs kétértékű kation követelménye; a második a PP2B és PP3, (növényekben nem található meg) melyek aktivitása kalcium-függő és a harmadik a PP2C/PPM, melyek aktivitása magnézium-függő. A további protein foszfatáz típusok a foszfortirozin foszfatázok (PTP) és aszpartát (Asp) függő foszfatázok. Úgy gondolják, hogy a foszoprotein foszfatázok (PPP) katalizálják a fehérjék defoszforilációjának több mint 90%-át az eukarióta sejtekben (Heroes és

mtsai, 2013). Ellentétben a PPP és PPM családokkal a PTP és Asp-függő enzimek a foszfo-tirozin, szerin-treonin és kettős specifikitású foszfatázok keverékei (Seifried és mtsai, 2013, Tonk 2013). A PPP (PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, PP6) család biológiai jelentőségét alátámasztja, hogy potenciális célpontjai onkogén vírusoknak és több kisebb gátló molekulának, mint a mikrocisztin és az okadainsav (MacKintosh és MacKintosh 1994, Moorhead és mtsai, 2009).

Emlősökben és gombákban kimutatták, hogy a PP1-et egy katalitikus alegység komplex és egy vagy több szabályozó alegység építi fel (Stark és mtsai, 1994). A PP1 katalitikus aktivitásának specifikus funkcióját a szabályozó alegységek határozzák meg. (Francois és mtsai, 1992). A PP1 katalitikus alegység cDNS és genomiális klónozása során 9 izoformát írtak le *A. thaliana*-ban (Kerk és mtsai, 2008). A PP1 az RVxF (PP1 katalitikus alegység-kötő motívum a regulátor alegységen) motívumot ismeri fel, amely konzervált az eukariótákban. Számos másodlagos interakciós motívumot is azonosítottak a regulátor alegységeken, mint például G/SILK és a MyPhoNE motívum (Heroes és mtsai, 2013). PP1 szefaróz affinitáskromatográfiát használva több PP1 regulátor alegységet mutattak ki *A. thaliana*-ban mint például a NIPP1 (Nuclear Inhibitor of Protein Phosphatase 1), SDS22 (Suppressor of Dis2), GL2 expressziós modulátor (GEM) és az inhibitor-2 (I2) (Templeton és mtsai, 2011).



**3. ábra:** A PP1 katalitikus alegységhez kapcsolódó regulátor alegységek és azok funkciói a növényi sejtben. I2 – protein foszfatáz inhibitor-2, NIPP1 – PP1 alegység, amely gátolja a PP1 aktivitását (nuclear inhibitor of protein phosphatase 1), GEM – GL2 expressziós modulátor, PRSL – PP1 szabályozó alegység, I3 – növényi PP1 partner inhibitor-3, SDS22 – DIS2 szupresszor, RSS1 – Rice Salt Sensitive 1, szabályozó fehérje faktor (Uhrig és mtsai, 2013).

A PP2A állati sejtekben heterodimer formában egy 36 kD-os katalitikus C-alegységet és egy 65 kD-os szabályozó A-alegységet tartalmaz vagy heterotrimer formában még egy variábilis B-alegységet, amelynek a molekulatömege 50-70 kD közötti (Mayer-Jaekel és Hemmings 1994). *S. cerevisiae*-ben a tpd3 által kódolt PP2A A-alegysége elengedhetetlen a citokinezis során illetve a cdc55 által kódolt B-alegység esszenciális a celluláris morfogenezisben (Healy és mtsai, 1991; van Zyl és mtsai, 1992). Növényeknél is megtalálható a PP2A a sejtmagban, a citoszolban és a

hozzájuk kapcsolódó membránokban. *A. thaliana*-ban a PP2A katalitikus alegységét 4 gén kódolja. A növényekben és az állatokban körülbelül 80%-os egyezést mutattak ki a PP2A-ra nézve. A PP2A katalitikus alegysége megtalálható minden vizsgált szövetben bár a kifejeződésének szintje fejlődés által szabályozott (Casamayor és mtsai, 1994). Három A-alegységet izoláltak *A. thaliana*-ból. A növények A-alegysége 58%-ban azonos a humán A-alegységgel, míg a B-alegység 46%-os egyezést mutat a humán B-alegység. Kimutatták, hogy az *A. thaliana* poláris auxintranszport mutáns *rcn1* egy PP2A A-alegységet kódol, amely 58%-os egyezést mutat a humán PR65a-val. Az *rcn1* recesszív mutációja rendellenes morfológiai változást okoz a csíranövényekben, ami arra utal, hogy a PP2A fontos szerepet játszik a poláris auxintranszportban (Johnson és mtsai, 1995). Leírták, hogy a PP2A-A1 alegység (RCN1-Root Curl in Naphthylthalamic Acid) és több B alegység közvetlen szerepet játszik a stressz válaszban és a gyökérnövekedésben (Suorsa és mtsai, 2012).

Filogenetikai analízisek bizonyították, hogy a PP2A, PP4 és PP6 külön családot alkot a PPP családon belül (Moorhead és mtsai, 2009). Ezenkívül minden eukarióta PP2A, PP4 és PP6 katalitikus alegység tartalmaz egy C-terminális YFL motívumot (Sents és mtsai, 2013). Összhangban ezekkel a megállapításokkal felfedezték, hogy az *A. thaliana* PP2A, PP4 és PP6 tud kötődni a TAP46 ( $\alpha 4$  emberben és TAP42 élesztőben) regulátor alegységhez. A TAP 46 regulátor alegység hiánya növekedés gátlást és a növény pusztulását okozza, amelyek során apoptózis markereket is azonosítottak (Ahn és mtsai, 2011). A PP2A holoenzim egy trimer, amely tartalmaz egy katalitikus (C), egy scaffolding (A) és egy regulátor (B) alegységet. Az *A. thaliana* genom 5 katalitikus, 3 scaffolding és 17 regulátor alegységet kódol, amelyek különböző kombinációkban képesek kölcsönhatásba lépni egymással, így több szabályozási lehetőséget biztosítva

(Jonassen és mtsai, 2011). A *ton2* gén mutációja a kortikális mikrotubulusok random orientációját okozza, illetve meggátolja a preprofázis köteg (PPB) kialakulását. A *ton2* gén a PP2A egyik regulációs alegységét kódolja (Camillieri és mtsai, 2002). Ayaydin és mtsai (2000) hasonló rendellenességeket figyeltek meg PP2A gátlószer hatására azzal a különbséggel, hogy a mitotikus orsóban és a fragmoplasztban is észleltek elváltozásokat. MCY-LR (PP1 és PP2A inhibitor) hatására a mikrofilamentumok és mikrotubulusok polimerizációs zavarát figyelték meg, amely során folyamatosan megfigyelhető volt a mikrofilamentumok aggregációja patkány hepatocita és patkány vese epiteliális sejtvonalakban (Wickstrom és mtsai, 1995). A PP2A A-regulátor alegységének funkcióvesztése súlyos fejlődési rendellenességet okoz, amely hibás gyökérnövekedést, a hipokotil és a szár elongációjának zavarát (törpeség) mutatja (Zhou és mtsai, 2004).

## **2.5. A növényi citoskeleton**

Az állatokban és a növényekben sok különbséget fedezhetünk fel sejt szinten, de kiemelkedő különbség mutatkozik a sejtmozgásban is. Az állati sejtek függetlenül mozognak és foglalják el helyüket az embriogenezis során. Ezzel ellentétben a növényi sejtek a helyükön maradnak az embriogenezis során, mivel sejt fal határolja őket, valamint a morfogenezisük és fejlődésük során a növények ellenőrzik a sejtosztódás irányát is. Mivel a sejtek relatív helyzete nem változik a sejtosztódás után, ezért a differenciálódás sejt-autonóm programokon és erős sejtek közötti szignálokra alapszik. Ezzel egyidejűleg a növényi sejtek megnyúlásos növekedése is elkezdődik a megfelelő méret és alak eléréséig. A megnyúlásos növekedést illetve a sejtosztódást az aktin filamentumok, a mikrotubulusok és

a mikrotubulus asszociált fehérjék (MAP) szabályozzák (Downing és Nogales 1998).

Az F-aktin a citoszkeleton egyik, körülbelül 8 nm átmérőjű eleme, amely G-aktin monomerek polimerizációjából jön létre. Az oldható aktin egy globuláris fehérje (375 aminosav) amelyet G-aktinnak neveznek, míg a polimert vagy filamentumot F-aktinnak hívják. Az aktin a mikrotubulusokkal ellentétben nem GTP-t hanem ATP-t köt és azt hidrolizálja. Bár az aktin és a mikrotubulus citoszkeleton különböző fehérjékből épül fel, az összeszerelődésük hasonló folyamaton alapszik és több közös jellemzővel is rendelkezik. A citoskeletális polimerek tipikusan negyedleges fehérjeszerkezettel rendelkeznek, amelyekben a makromolekuláris alegységek nem kovalens kötéssel kapcsolódnak össze. Ez lehetővé teszi a mikrotubulusok és aktin filamentumok dinamikáját valamint összeszerelődését és szétesését. A polimerizáció 3 szakaszra osztható. Az első a „lag fázis” amely során a polimer elkezdi összeszerelődni, ezt nukleációnak nevezik. A nukleáció előfeltétele az úgynevezett „mag” kialakulása. A második szakasz az elongációs szakasz (növekedési fázis), amely során további alegységek kapcsolódnak a templáthoz. A megnyúlás mértékét a polimerizáció és a depolimerizáció közötti arány szabályozza. A harmadik szakasz az úgynevezett „steady state” (egyensúlyi állapot) fázis. Ez az állapot dinamikus, mivel ebben a szakaszban a polimerizáció és a depolimerizáció egyensúlyban van. Az aktin a mikrotubulusokhoz hasonlóan egy poláris struktúra, ebből adódóan az egyik vagy a másik végén különbség lehet a polimerizáció és a depolimerizáció között. A dinamikusabb vég az úgynevezett „+” vég, míg a kevésbé aktív a „-” vég (Baskin, 2015).

Az eukariótákban sokrétű szerepe van az aktin citoszkeletonnak a sejt polaritásában, a sejtosztódásban, a vezikulumok transzportjában, az organellek mozgásában és sejtmagi aktivitásban (Meagher és Fechheimer

2003). Eddigi vizsgálatok bizonyították, hogy az aktin és számos aktin kötő fehérje (ABP) szükséges a normál növényi sejt polaritásához és elongációjához. Az aktin filamentumok nukleációjához, elongációjához, átrendeződéséhez és dinamikájához változatos citoszkéletális fehérje variánsokra van szükség (Hepler és mtsai, 2001; Frank és mtsai, 2003).

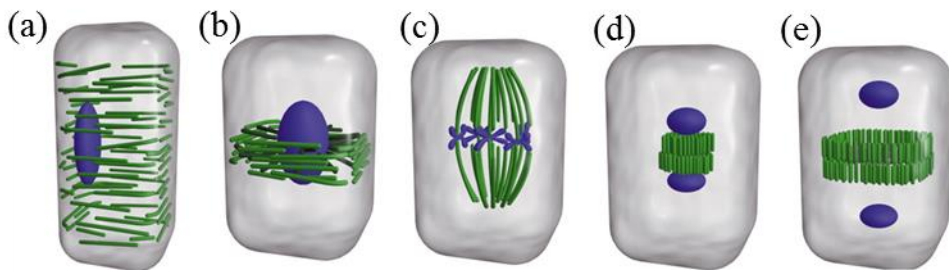
Az aktin filamentumok gyors mozgása fontos része a sejtosztódásnak, sejtmegnyúlásnak és differenciálódásnak. (Higaki és mtsai, 2007). A növényekben a profilin az ATP-aktin szállítását végzi a „+” véghez, viszont nem tud ADP-ből ATP-t szintetizálni, mint az állati és gomba profilin. *Arabidopsis thaliana*-ban leírták az adenilát-cikláz-asszociált protein 1-et (Cap1) amely felgyorsítja a nukleotidok cseréjét az aktin monomereken. A Cap1 és aktin aránya 1:3. A cofilin és az ADF (aktin-depolimerizáló-faktor) felgyorsítják az ADP-aktin formák leválását a “minusz” végről. (Chaudhry és mtsai, 2007).

Kimutatták, hogy *Arabidopsis thaliana*-ban a reprodukciós ACT1 és a vegetatív ACT2 overexpressziója a vegetatív szövetekben törpeséget és rendellenes aktin citoszkéletont eredményezett. Az egyik aktin izoforma, mégpedig az ACT7 elég erősen expresszálódik a mitózis alatt. Az ACT7 csökkent expressziója hibát eredményez az osztódási sík orientációjában (Kandasamy és mtsai, 2002; Gilliland és mtsai, 2003).

*Arabidopsis thaliana* *dis1-1* (ARP3 mutáns) és *wrm1-1* (ARP2 mutáns) mutánsokon tapasztaltak rövid majdnem fekvő, torz trichómákat a leveleken, míg a vad típusú egyedek trichómái normálisak voltak (álló, 2-3 ágú). Vad típusú egyedek sziklevél epidermisz sejtjei jellegzetes jigsaw-puzzle mintázatot mutattak, míg a *dis1-1* és *wrm1-1* mutánsokon véletlenszerű alakú, kis karéjos és nem megnyúlt sejteket figyeltek meg. *Dis1-1* mutánsoknál a rövid és széles hipokotil sejteket figyelték meg, amelyekről gyakran a sztóma sorok is hiányoztak. Vad típusú növények

esetében a hipokotil sejtekre a hosszúkás alak a jellemző sztóma sorokkal. A mutánsokban az F-aktin aggregációját és erős kötegelését figyeltek meg. A dupla mutánsokat fenotípusosan nem lehetett megkülönböztetni az egyszeres mutánsoktól (Mathur és mtsai, 2003).

A növényi sejtekben öt kiemelkedő, mikrotubulusok által felépített struktúrát különíthetünk el: a kortikális mikrotubulusokat (CMT: 4. a ábra), az endoplazmatikus mikrotubulusokat (EMT), a preprofázis köteget (PPB: 4. b ábra), az osztódási orsót (4. c ábra) és a fragmoplasztot (4. d és e ábra) (Hamada 2014). A mikrotubulusok a citoszkeleton legsokoldalúbb alkotói, amelyek részt vesznek a vezikuláris transzportban, a sejtek osztódásában illetve a sejtek alakjának és polaritásának meghatározásában illetve képesek kötegekbe szerveződni. Ez igaz a CMT, PPB, osztódási orsó illetve a fragmoplaszt esetében is (Eckardt 2008; Guo és mtsai, 2009; Karahara és mtsai, 2009; Pickett-Heaps és Forer 2009).



**4. ábra:** a növényi sejtben található mikrotubuláris struktúrák: (a) kortikális mikrotubulusok (CMT); (b) preprofázis köteg (PPB); (c) bipoláris osztódási orsó; (d) fragmoplaszt; (e) a fragmoplaszt expanzója a citokinezis során (Wasteneys, 2002).

Maguk a mikrotubulusok  $\alpha$ -tubulinból és  $\beta$ -tubulinból ( $\alpha$ - $\beta$  tubulin dimerekből) épülnek fel. Mindkét típusú monomer rendelkezik konzervált GTP kötőhellyel. A mikrotubulus egy 25-37 nm-es vastagságú, üreges henger alakú struktúra, amely 13 párhuzamos protofilamentumból épül fel (Alberts és mtsai, 2008). A mikrotubulusokra jellemző a polaritás, ebből kifolyólag

rendelkeznek egy „+” és egy „-” véggel, amelyeken folyamatosan tudnak polimerizálódni és depolimerizálódni. Ezt a folyamatot nevezik dinamikus instabilitásnak. A növényekben a mikrotubulusok nukleációját a sejtmagmembrán és a sejtmembrán közelében elhelyezkedő  $\gamma$ -tubulint tartalmazó fehérje komplexek végzik (Stoppin-Mellet és mtsai, 1999, Guo és mtsai, 2009). Azok a szabályozó fehérjék, amelyek a mikrotubulusok dinamikájáért felelősek két csoportra oszthatóak: az egyik csoport a mikrotubulusok polimerizációjáért, míg a másik csoport a depolimerizációért felelős. Az  $\alpha$ -tubulin és  $\beta$ - tubulin közötti egyensúlyt a *KIS* gén szabályozza (Kirik és mtsai, 2002). A tirozin karboxipeptidáz és a tubulin ligáz képes az  $\alpha$ -tubulin izoformák poszttranszlációs módosítására és így nitrotirozin- $\alpha$ -tubulint hoz létre (Jovanović és mtsai, 2010). Meg kell említeni még az augmin komplexet, mint a mikrotubulus organizációban résztvevő egységet, amely a nem centroszómális mikrotubulus organizációban vesz részt. Goshima és Kimura, (2010) állati sejtekben figyelték meg ezt a komponenst, melynek hiánya a  $\gamma$ -tubulin komplexek lecsökkent szintjét eredményezi a mitotikus orsóban, de nem befolyásolja a centroszómális lokalizációt. Az interfázisos sejtek kortikális mikrotubulusaihoz az AUG8 kapcsolódik, amely egy növény-specifikus augmin komponens. Az AUG8 a mikrotubulusok „+” végén helyezkedik el és részt vesz a CMT-k organizációjában. Az augmin komplex továbbá részt vesz az osztódási orsó és a fragmoplaszt organizációjában is (Hotta és mtsai, 2012, Cao és mtsai, 2013, Toya és Takeichi 2016).

A CMT-t az interfázisos és differenciált sejtekben figyelhetjük meg. A CMT-k a növekedés tengelyére merőleges, spirális lefutású párhuzamos mikrotubulus kötegekből állnak. A CMT fontos szerepet játszik az anizotropikus növekedés során a megnyúlásos növekedés irányának meghatározásában. Az anizotropikus növekedés nagymértékben függ a

cellulóz mikrofibrillumok orientációjától is. Ha a cellulóz mikrofibrillumok egy irányban helyezkednek el a sejtfalban és körülveszik a sejtet, akkor a sejt a mikrofibrillumok orientációjára merőlegesen nyúlik meg. Ha viszont a cellulóz mikrofibrillumok iránya véletlenszerű, akkor a sejt izotropikus megnyúláson megy át, amely gömb alakot eredményez. Ezért a tipikus növényi sejtekben (hipokotil és gyökér sejtek) a hosszanti megnyúlás irányára transzverzálisan helyezkednek el a cellulóz mikrofibrillumok. Érdekes módon a cellulóz mikrofibrillumok és a CMT orientációja nagyon hasonló mind a nem vagy izotropikusan növekedő, mind a megnyúló sejtekben (Paradez és mtsai, 2006a; Paradez és mtsai, 2006b; Wright & Smith, 2007; Wasteneys and Ambrose, 2009; Hamada 2014).

A mitózis kezdetekor a CMT-k depolimerizálódnak és átrendeződnek. Az így kapott struktúrát hívják PPB-nek, amely az osztódás preprofázisában jelenik meg a sejt középvonalában. Ez a citoskeletális változás elengedhetetlen a normális lefutású sejtosztódáshoz, mivel ez az átmeneti mikrotubulus köteg fogja kijelölni a sejtlemez kialakulásának helyét. A PPB egy széles, mikrotubulusokból álló sávként jelenik meg a G2 fázisban, amely a profázisban leszűkül és egy néhány mikrométer széles kortikális öv régiót hoz létre a késői profázisban amelyet kortikális osztódási zónának neveznek (Cortical Division Zone; CDZ). A PPB tartalmaz számos olyan molekulát, amelyek közül néhány a mikrotubulusok felépülésében játszik szerepet, míg más molekulák a CDZ-nél maradnak a sejtlemez helyes kialakulását segítve a telofázisban. A Ran GTPáz-t aktiváló fehérje (Ran-GAP) felhalmozódik a CDZ zónában és Ran-GAP sávot képez a profázisban. A G2 fázisban lévő széles PPB sáv  $7\mu\text{m}$  szélesség alá csökkenése után jelenik meg a Ran-GAP sáv, amely kissé a PPB alatt helyezkedik el. Orizalin és Latrunculin B kezelések hatására a PPB elvékonyodott vagy megvastagodott, viszont ezeknek a depolimerizáló szerepeknek alig volt hatása a Ran-GAP sávra a

profázisban. Ennek magyarázata, hogy a CDZ zónában a PPB és a Ran-GAP egymástól függetlenül halmozódik fel. A *ton2* (PP2A regulációs alegységet kódoló gén) mutánsban azt tapasztalták, hogy a CMT-k random orientációja gátolja a PPB kialakulását (Dhonukshe és mtsai, 2005; Boruc és mtsai, 2012; Hamada 2014; Yabuuchi és mtsai, 2015; Dashek és Miglani 2017). Az elmúlt évtizedben a TANGLED (TAN) fehérjét és a Ran-GAP1-et írták le, mint a kortikális osztódási sík (CDS) pozitív markereit. Ez azt jelenti, hogy mindkét fehérje a CDS régióban marad a PPB szétszerelődése után (Walker és mtsai, 2007; Xu és mtsai, 2008). A TAN és RanGAP1 fehérjék CDS régióban való lokalizációjához szükségesek a POK1/POK2 kinázok (Rasmussen és mtsai, 2011). Egy korábbi tanulmányban kimutatták azt is, hogy ezen kinázok jelenléte szükséges a sejtosztódás térbeli szabályozásához is (Müller és mtsai, 2006). A PP2A egyik szabályozó alegysége a TON2/FASS és a TON1 is fontos a TAN és Ran-GAP1 lokalizációjához a CDS zónában és PPB-ben (Camillieri és mtsai, 2002; Xu és mtsai, 2008).

Az osztódási orsó az a mikrotubuláris struktúra, amely a testvérkromatidák szegregációját végzi a metafázis során. Az állati sejtekben az orsó összeszerelődése a centroszómából indul ki. A centroszóma egy mikrotubulus organizációs centrum, ami az interfázisban egyetlen egységként jelenik meg, majd pedig duplikálódik, a mitózis előtt létrehozva egy bipoláris osztódási orsót (Hamada 2014). A növényi sejteknél ezzel szemben nem találhatunk centroszómákat, itt diffúzabb mikrotubulus organizációs centrumok (MTOC) veszik át a centroszóma szerepét. Az MTOC kialakulása során a mikrotubulusok nukleációja  $\gamma$ -tubulin komplexek által valósul meg (Alberts és mtsai, 2008; Nakamura és mtsai, 2010). A mikrotubulus asszociált fehérjék (MAPs) között, amelyek a mikrotubulusok nukleációjában vesznek részt, a legismertebb a  $\gamma$ -tubulin komplex. Ez a komplex konzervált az eukarióták körében (Kollman és mtsai, 2011). Az állati sejtekben az

osztódási orsó összeszerelődését a Ran gradiens szabályozza. Növényi sejtekben a Ran-GAP fehérje aktiválja a Ran-GTPáz-t, amely a Ran-GTP-t Ran-GDP-vé alakítja, és ezáltal segít fenntartani a Ran grádiensét illetve a sejtmagi transzportokat (Import/Export). A mitózis során ezek a fehérjék szoros kapcsolatot létesítenek a mikrotubulusokkal. A kromoszómák körül megnövekedett koncentrációjú Ran-GTP vonzza az importinokat és elengedik az NLS-t (sejtmagi lokalizációs szignál) tartalmazó szállító fehérjéket. Ezek a szállító fehérjék például az osztódási orsó összeszerelődésében résztvevő Xklp2 célfehérjéi (TPX2). A TPX2 az interfázis alatt a sejtmagban található, viszont aktív exportja a profázis alatt eredményezi a kezdeti osztódási orsó körüli felhalmozódását, amely elősegíti annak összeszerelődését. A TPX2 az úgynevezett orsó összeszerelési faktorok közé tartozik, amely a profázistól a metafázisig aktív. Kimutatták, hogy ha a mitózis korai szakaszában anti-TPX2 antitestet juttatnak be az osztódási orsó nem fog kialakulni. (Vos és mtsai, 2008). Ez arra utal, hogy a TPX2 kapcsolatba lép az újonnan összeszerelődött mikrotubulus kötegekkel és szerepe lehet a stabilizációjukban vagy reorientációjukban az orsó kialakulása alatt (Aguirre-Portolés és mtsai, 2012). Metafázis alatt a Ran-GAP1 a kinetokor régióban és az osztódási orsóban lokalizálódik (Dashek és Miglani 2017). *Arabidopsis thaliana* Ran-kötő fehérje 1 (AtRanBP1) mutánsokban a metafázis/anafázis átmenet blokkolva van, ebből adódóan igen fontos szerepet játszanak a mitózis során (Kim és mtsai, 2001). Kimutatták, hogy a  $\gamma$ -tubulin és Augmin komplexek is részt vesznek az osztódási orsó stabilizálásában, valamint részt vehetnek a mikrotubulosok nukleációjában is. (Fache és mtsai, 2010). Miután a sejtmag felbomlott, a mitotikus orsó működése igen hasonló az eukarióták körében (Wadsworth és mtsai, 2011). A mikrotubulusok a kromoszómákat az osztódási síkra igazítják, „plusz” végükkel a kromoszómák kinetokor (kinetokor

mikrotubulusok) régiójához kapcsolódva, míg a „mínusz” végük az MTOC-hoz kapcsolt. Az *A. thaliana* MAP65-4 az osztódási orsó kialakításában játszik szerepet a profázisban és a kinetokor mikrotubulusok kialakításában a metafázistól az anafázis végéig. *In vitro* a MAP65-4 a mikrotubulusok kötegelését indukálta keresztkötések kialakításával a mikrotubulusok között (Fache és mtsai, 2010).

A fragmoplaszt olyan mikrotubulusokból felépülő struktúra, amely a sejtlemez felépülésében játszik fontos szerepet a két leánysejt között. Az anafázis után az osztódási orsó maradványaiból épül fel a két leánysejt között. A fragmoplaszt mikrotubulusainak dezorganizációja kritikus hibát okoz a sejtlemez kialakulásában vagy egyes esetekben a citokinezis végbemenetelét is gátolhatja, mivel a fragmoplaszt mikrotubulusai a felelősek azon Golgi vezikulumok mozgatásáért, amelyek az új sejtlemez felépüléséhez szükséges anyagokat (glikoproteinek, poliszacharidok) szállítják. A vezikulumok a sejt egyenlítői síkjába érve fuzionálnak és létrehozzák a sejtlemezt. A folyamat addig tart, míg a sejtlemez el nem éri a plazmamembránt és a két sejt külön nem válik. A felesleges membrán lipidek és sejtfa anyagok clathrin/dynamin-függő retrográd membrán transzporton keresztül újrafelhasználásra kerülnek (Müller, 2012, Alberts és mtsai, 2008). Az aktin filamentumok lokalizációját és felhalmozódását is leírták a fragmoplasztnál az anafázis alatt. Az aktin filamentumok dezorganizációja a sejtlemez kialakulását késlelteti, ez jelzi, hogy az aktin is hozzájárul a fragmoplaszt kialakulásához (Higaki és mtsai, 2008, Molchan és mtsai, 2002). A fragmoplaszt növekvő szélein egy fehérje faktor, a MAP65-1 halmozódik fel, amely a mikrotubulusok kötegeléséért felelős a fragmoplaszt kialakulása alatt (Austin és mtsai, 2005). A fragmoplasztban megtalálható még a MAP-ok közül a MOR1, katanin, CLASP, SPR2 és  $\gamma$ -tubulin komplex is. A MOR1 minden mikrotubulus által felépített struktúrában megtalálható,

ami arra utal, hogy részt vesz a mikrotubulusok organizációjában. A MOR1 mutánsokban ezáltal drasztikus hibák jelentkeznek a CMT, az osztódási orsó és a fragmoplaszt organizációjánál is (Whittington és mtsai, 2001; Kawamura és mtsai, 2006; Oh és mtsai, 2010; Yasuhara és Oe, 2011). A fragmoplaszt középvonalában található két MAP, amely különösen fontos az antiparallel mikrotubulusok kötegelésében, ezek a MAP65-3 és a kinezin-5 (Bannigan és mtsai, 2007, Ho és mtsai, 2011). A kinezin-7 családba tartozó fehérjék aktiválnak egy MAPK kaskádöt, amely eredménye a MAP65 foszforilációja lesz. A foszforilált MAP65-1 és MAP65-2 is a fragmoplaszt középvonalában lokalizálódik, amelyek mutációja nem okoz elváltozást a növények növekedése és fejlődése során. Ezzel ellentétben a MAP65-3 mutációja súlyos fenotípusos változást (törpeség) eredményez valamint a citokinezis is hibát szenved (duzzadt sejtek, hiányos sejtfal). Ezek az adatok azt támasztják alá, hogy MAP65-1 és MAP65-2 a MAP4 foszforilációjának hiányában is működőképes a citokinezis alatt (Sasabe és mtsai, 2011, Lee és Liu, 2013).

## **2.6. A DNS replikáció és a kromoszóma szegregáció**

Az eukarióta szervezetek növekedésében és fejlődésében elengedhetetlen szerepe van a mitotikus sejtosztódásnak, melyet összehangolt biokémiai és genetikai folyamatok irányítanak (Sugiura és mtsai, 2015). Az interfázist további 3 szakaszra tudjuk osztani: a preszintetikus (G1), a szintetikus (S) és a posztszintetikus (G2) szakaszra (Velich, 2001). A sejtciklus átmenetek univerzális vezérlői a ciklin dependens kinázok (CDK) és a ciklinek. A növények viszonylag sok kódoló génnel rendelkeznek különböző CDK-ra és ciklinekre nézve (Van Leene és mtsai, 2011). A CDK-k ciklinekkel való kötődése során aktiválódnak CDK-ciklin komplexet képezve.

A G1 szakaszban történik a sejtek felkészülése az osztódásra, ennek során a sejtek növekednek, bizonyos makromolekulák szintézise és sejtorganellek osztdása zajlik le (Velich, 2001). A retinoblasztóma típusú fehérje (RBR) család jól ismert represszora a G1/S átmenetnek, mivel gátló hatást fejt ki a heterodimer E2F/DP transzkripciós faktorra (Sabelli and Larkins, 2009). Az szekvenciálisan foszforilált RBR fehérje gátolva van különböző CDK komplexek által, amely enyhíti a blokkot az E2F/DP-függő génexpresszió, ezáltal elősegítve az S-fázisba való átmenetet. Növényekben a CDK komplexek tartalmazznak D- és A-típusú ciklineket, amelyek úgy tűnik, hogy foszforilálják és ezáltal gátolják az RBR fehérjéket (Sabelli and Larkins, 2006, 2009). A D-típusú ciklinek a G1/S átmenet elsődleges mediátorai, fő feladatuk a mitotikus sejtek stimulálása. A D-típusú ciklinek transzkripcióját extracelluláris szignálok aktiválják ami az aktív CDKA-CYCD komplex kialakulásához vezet. Ezek a szignálok teszik lehetővé a retinoblasztóma (Rb) fehérje foszforilációját és ezáltal inaktiválják az Rb fehérjét, amely elveszíti a hozzá kapcsolódott E2F-et és már nem tudja gátolni az E2F-regulátor gén aktivációját. Az E2F ezután képes aktiválni a folyamatban résztvevő gének transzkripcióját S-fázisban és más növekedési és sejtciklus folyamatokban. Az E2F2c kompetitív inhibitora az E2F-aktivált génexpresszióknak. (Dewitte és Murray, 2003).

A növényekben a DNS replikáció szabályozása, úgy vélik, hogy követi a konzervált eukarióta mechanizmust. Az S-fázis elindulásának feltétele a pre-replikációs komplex összeszerelődése. Érdekes, hogy a pre-replikációs komplex gének expressziója megfigyelhető a nem osztódó növényi szövetekben is, ami arra utal, hogy nem csak a DNS replikáció engedélyezésében van szerepük. A pre-replikációs komplex összeszerelődésére a G1 fázisban kerül sor, alacsony CDK-aktivitás mellett. A replikációs origókhoz kötődnek be a replikációs origó komplexek (ORC 1-

6), amelyek a CDC6 (cell division cycle 6) nevű kisebb fehérjével egyesülve ATPáz együttest alkotnak. Ehhez egy szintén bonyolult komplex csatlakozik, amely egyrészt az MCM2-7 komplexből (Minichromosome maintenance complex), másrészt a CDT1 (cdc10-dependent transcript 1) nevű fehérjéből áll. Az immár elkészült pre-replikációs komplex további aktiválását CDK-ciklin kinázok végzik el a sejtciklus S-fázisának kezdetén (Costas és mtsai, 2011; Tuteja és mtsai, 2011). Miután az MCM komplex bekötődött az origón elindítja a replikációt mindenhol ahová kapcsolódott. Az MCM komplex képes aktiválni a replikációs villát. A replikációs villa előrehaladtával az MCM komplex felszabadul és meg kell akadályozni az újbóli bekötődését a születendő DNS-hez. A MCM újbóli bekötődésére az S-fázis alatt különböző mechanizmusok alakultak ki. Az MCM komplex koncentrációja a DNS tartalom növekedésével egyenesen arányosan nő. G1-től G2-ig a DNS tartalom a kétszeresére nő, ahogyan az MCM fehérje koncentrációja is. Sarjadzó élesztőkben CDK-mediált foszforiláción keresztül inaktiválódik az ORC2 és ORC6 az S-fázisban (Shultz és mtsai, 2009).

Az aktivált MCM2-7 komplexek helikázaktivitásuk folytán részt vesznek a DNS lokális denaturációjában, a CDT1 fehérjék foszforilációja után pedig az ubiquitin-úton lebomlanak. Ez utóbbi fontos lépés a re-replikáció elkerülése céljából (Masuda és mtsai, 2004; Costas és mtsai, 2011, Tuteja és mtsai, 2011). A replikációs komplexeket a G1/S átmenet során aktiválják a CDK-k. A továbbiakban az MCM fehérje komplex szabályozza a DNS replikációját (Masuda és mtsai, 2004). *Arabidopsis thaliana* PROLIFERA (MCM7) mutációja során a heterozigóta sejtekben a citokinezis rendellenes végbemenetelét tapasztalták, ami látszólag kapcsolatban van az S-fázis hibás progressziójával. (Holding and Springer, 2002). Az MCM expresszió transzkripciós szabályozása függ a promóter régión lévő E2F cisz-elemekről, amelyek az E2F transzkripciós faktorhoz kötődnek. Az E2F

kötőhelynek fontos szerepe van a promóter G2-specifikus repressziójában szinkronizált sejttényészetekben és a merisztéma specifikus expresszióban. Az E2F target genes 1 (ETG1) kapcsolatban van az MCM3 fehérje komplexel, amely döntő fontosságú a DNS replikációjában. Az RBR (növényi retinoblasztóma-homológ) gének (RGB1) gátolják az E2F transzkripciós faktort, amely a sejtciklust a G1-fázisban megállítja a DNS replikáció alulregulációjával. Az RBR3 gén viszont sejtciklus aktivátorként működik növényi sejtekben az MCM2-7 felülregulációját idézi elő (Tuteja és mtsai, 2011).

Immunológiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy kukoricában az MCM3 a sejtmagban lokalizálódik a sejtciklus alatt. Az MCM7 az osztódó sejtek sejtmagjában lokalizálódik G1 alatt és ez szükséges a fejlődéshez *A. thalianában*. A kukoricában az MCM6 legmagasabb szintje a G1/S alatt mérhető a sejtmagban, majd pedig exportálódik a citoplazmába a G2/M alatt. Ez a megfigyelés azt mutatja, hogy az MCM6 a sejtmag és a citoplazma között közlekedik sejtciklus függő módon (Dresselhaus és mtsai, 2006, Tuteja és mtsai, 2011). Újabb kutatások kimutatták az MCM2-7 alegységeinek koordinált expresszióját az *A. thaliana* fejlődése alatt, valamint gyakoriságát osztódó szövetekben, amelyek a DNS replikációban való szerepét jelzik. Az endogén MCM5 és MCM7 fehérjék a sejtciklus G1, S és G2 fázisa alatt a sejtmagban lokalizálódnak, viszont a mitózis alatt kikerülnek a citoplazmatikus kompartmentbe (Shultz és mtsai, 2009).

A posztszintetikus (G2) fázisban a sejt már felkészült a mitózisra. A diploid eukarióta szervezetekben az interfázis kezdetén (G1) a sejtmag DNS tartalma 2C. Az S fázisban történő DNS replikáció miatt a G2 fázisban a sejt DNS mennyisége 4C (Velich, 2001).

A G2/M átmenetet a CDK-CYCB kináz aktivitása szabályozza. A CDK-k gátlása megállítja a sejteket G2-fázisban és stabilizálják a PPB-t

(Binarová és mtsai, 1998). A CYCB mennyiségének növekedése a G2 alatt összefügg a CDKA és CDKB1-el. A CDK aktivitás szabályozásában részt vesz a KRP fehérje ("Kip-Related" Protein) és a WEE1 kináz is. A KRP (ciklin függő protein kináz inhibitor) fehérjéről kimutatták, hogy differenciáltan gátolja az egyes CDK komplexeket valamint aktivitása foszforilációs szabályozás alatt áll (Pettkó-Szandtner és mtsai, 2006). A foszfatázok ezért fontos szerepet játszhatnak az M fázis elindulásában. A növényekben is megtalálhatóak a G2/M ellenőrzési pontot működtető wee1 kináz és cdc25 tirozin foszfatáz enzimek homológjai (de Jager és mtsai, 2005). Az eukarióta sejt mitózisba történő belépése érdekében a CDK-n levő mindkét foszfát csoportot specifikus foszfatáz távolítja el. Ezt a foszfatázt, mely cdc25-ként ismert, először élesztőből izolálták (Zhang és mtsai, 2005a).

A CDK komplexek kapcsolódnak a mikrotubuláris és kromatin struktúrákhoz valamint a CDK-k aktivitása fontos szerepet játszik a mikrotubulusok dinamikájában és stabilitásában (Vantard és mtsai, 2000). Aktív CDK mikroinjektálásával bizonyították *Tradescantia* porzók szőrsejtjeiben, hogy a mitózis korai szakasza felgyorsul, míg a CDK aktivitás gátlása abnormális osztódási orsót eredményez (Binarová és mtsai, 1998). Bár a CDK tényleges subsztrátjait még nem azonosították az bizonyított, hogy a CDK komplexek képesek foszforilálni a MAP-okat mint például a MAP4 homológokat, amelyek szabályozzák a mikrotubulusok dinamikus összeszerelődését (Nieuwland és mtsai, 2008). A növényi citokinezis során nagyon fontos szerepet játszik a fragmoplaszt, amely a sejtlemez kialakításában játszik szerepet a Golgi vezikulumok mozgásával. Különböző fehérjék vesznek részt a vezikulumok mozgásában és a MAP-ok felhalmozódásában a fragmoplasztban. Ezen túlmenően számos protein kinázt, mint például az MMK3, p43Ntf6 és a mitogén aktivált protein kinázokat (MAPK) írtak le a sejtlemez kialakulásának helyén. Az NPK1

(CDK foszforilálja) egy MAPK-kináz-kináz, amely a fragmoplaszt egyenlítői síkjában halmozódik fel és szabályozza a sejtlemes oldalirányú megnyúlását. Célzott aktivitása függ a kinezin-szerű motorfehérjétől is (Nishihama és mtsai, 2002).

A profázis alatt a kromoszómák kezdenek elkülönülni és egyenletesen oszlanak meg a sejtmagban. A kromoszóma szálak még nem egységesek a profázis elején. A profázis végére a kromoszóma 2 kromatidája jól látható és jól elkülöníthető valamint a sejtmag kezd eltűnni. A kromoszómák kondenzációja elkezdődik, amely számos hiszton módosításon keresztül szabályozott folyamat, valamint a prometáfázis alatt elkezdődik az osztódási orsó összeszerelődése (Weingartner és mtsai, 2001; Dhonukshe és mtsai, 2005). A CDKA kapcsolódik a PPB-hez. A G2 fázisban megjelenő mitózis elősegítő faktor (Mitosis Promoting Factor-MPF) aktivitása a p34cdc2 ciklin-függő protein kináztól függ. Az MPF kapcsolatban van a mitotikus orsóval és a sejtmaghártya lebomlás (Nuclear Envelope Breakdown-NEB) folyamatával is, amely a prometáfázis kezdetét jelzi (Gautier és mtsai, 1988). Így valószínű, hogy a növekvő p34 kináz aktivitás hozzájárul a NEB-hez mivel a p34 inaktivációja gátolja a NEB-et viszont a p34 aktivációja a PPB szétszerelődéséhez vezet. A p34 kináz aktivitás a metafázisban éri el a legmagasabb szintet (Hush és mtsai, 1996).

A prometáfázis alatt a sejtmag eltűnik és a metafázis alatt a kromoszómák kondenzációja zajlik. Metafázisban a kromoszómákkal kapcsolódnak az osztódási orsó mikrotubulus szálai és a sejt központi síkjában helyezkednek el. Kialakul a kromoszómák teljes kondenzációja és formája. Az osztódási orsó a két ellentétes pólus felé húzza a kromatidákat. A mitózis központi eseménye a testvér kromatida szegregáció. Az osztódási orsó kromoszómális fonalai a kromoszómák centromerjéhez kapcsolódnak a „+” végükkel és az ellentétes pólus felé húzzák a testvér kromatidákat

(Alberts és mtsai, 2008). Kimutatták, hogy az ICK1 késlelteti a sejtártya lebomlását metafázisban. A KRP fehérjék képesek gátolni a CDK-CYCD komplex kialakulását és gátolják a CDKA komplex kináz aktivitását is. A KRP fehérjék gátló hatása a CDKA aktivitásra befolyásolja a sejtciklus előrehaladását. A KRP1 overexpressziója csökkent sejt számot eredményezett a szíromlevelekben illetve a KRP1 és KRP4 overexpressziója során rendellenes virág morfológiát figyeltek meg (Zhou és mtsai, 2002).

Az anafázis-elősegítő komplex/cikloszóma (APC/C) egy multiprotein E3 ubiquitin ligáz komplex, amely részt vesz a sejtciklust szabályozó kulcsfehérjék ubiquitin függő proteolízisében, például a mitotikus ciklinek lebontásában a metafázis/anafázis átmenet során. Az APC/C a metafázis/anafázis átmenetet és a mitózisból való kilépést a szekurin és más mitotikus ciklinek (A- és B-típusú ciklinek) lebontása révén váltja ki (Eloy és mtsai, 2012). A mitózis kulcseseményei a testvérkromatidák elválása és a ciklin függő kináz 1 inaktivációja ubiquitin függő proteolízis által szabályozottak (Peters, 2002). APC/C hiányában a testvérkromatidák szegregációja gátlódik az anafázisban, és a mitózisból való kilépés gátlása figyelhető meg, valamint a DNS replikációhoz szükséges lépések sem indulnak el. Az APC/C genetikai inaktiválása halálos az eddig vizsgált összes fajra nézve (Zheng és mtsai, 2011). A hiszton H3-nak a 10-es pozíciójú szerinnél (H3S10) történő foszforilációja a profázisban kezdődik és a telofázisig tart. A H3S10ph hiszton módosítás konzervált az eukariótákban, beleértve az állatokat, a protozoákat és a növényeket is. A hiszton H3 foszforilációjában sok kináz vesz részt, ami azt sugallja, hogy ezt a folyamatot mind külső mind pedig szubcelluláris tényezők befolyásolhatják (de la Paz Sanchez, 2008). A Ser10 foszforilációja vagy defoszforilációja számos folyamatban szerepet játszik, mint például a kromoszómák kondenzációjában, és a testvérkromatidák közötti kohézióban (Zhang és mtsai,

2005b). A Ser10 foszforilációja egybeesik a kromoszóma kondenzációval, míg a kromoszómák dekoncenzációját figyelték meg a Ser10 defoszforilációja során (de la Paz Sanchez, 2008). *Arabidopsis thaliana* genomban három AURORA kinázt (AUR1, AUR2 és AUR3) írtak le. Ezek a szerin/treonin kinázok magas expressziós szintet mutatnak az osztódó sejtekben, támogatva a hiszton H3 foszforilációját. Az AUR1 és az AUR2 az interfázis alatt a sejtmembránban lokalizálódnak, míg a mitózis alatt az osztódási orsóban figyelték meg jelenlétét. Az AUR3 és H3Ser10 pontszerű mintázatot mutat a kondenzált kromoszómákon a profázisban majd pedig az AUR3 az osztódási orsóban lokalizálódik a mitózis alatt. Prometáfázisban és a korai anafázisban (testvérkromatida szegregáció kezdete) szintén pontszerű mintázatot figyeltek meg a H3Ser10 esetében a kromoszómák centromer régiója körül. Késői anafázisban (a testvérkromatidák szegregációja után) az AUR3 és a H3Ser10 egyenletesen oszlik meg a kromoszómákon. Az AUR3 és a foszforilált hiszton H3 nagyon hasonló lokalizációs mintázattal rendelkezik a mitózis alatt. *In vitro* vizsgálatokkal igazolták, hogy mind a három *Arabidopsis thaliana* AUR (AtAUR) képes foszforilálni a hiszton H3Ser10-et. BY-2 dohány sejtekben megfigyelték, hogy az AtAUR3 overexpressziója különböző orientációjú osztódási síkot eredményez, viszont ezt a jelenséget nem figyelték meg az AtAUR1 és AtAUR2 overexpressziója során. Lehetséges, hogy az AtAUR3 fehérje nagy mennyisége magas kináz aktivitást okoz, ami a sejtosztódáshoz kapcsolódó fehérjék deregulációjához vezet (Kawabe és mtsai, 2005).

Az anafázis alatt a testvérkromatidák közötti kohézió teljesen eltűnik és kialakulnak az egykromatidás kromoszómák. A metafázis/anafázis átmenet során a kohézió megszüntetése két mechanizmus alapján kezdődhet meg, a szeparáz függő és a szeparáz független folyamat révén. A szeparáz függő mechanizmus esetén a szeparin a kohezin Ssc alegységét hasítja, míg a

szeparáz független esetében a kohezin gyűrűt a mikrotubulusok által generált erő az, amely fizikailag eltöri (Renshaw és mtsai, 2010). Anafázis alatt a CDKA lokalizációját az osztódási orsó központi régiójában figyelték meg (Weingartner és mtsai, 2001). A CYCB1 nincs jelen, mert eltűnik a metafázis anafázis átmenetnél. Megjelenik egy úgynevezett anafázist elősegítő komplex (Anaphase-promoting complex-CCS52) amely többek között a mitotikus ciklinek ubiquitin-függő lebontásáért felel (Cebolla és mtsai, 1999).

A telofázis alatt a kromoszómák köré maghártya szintetizálódik, a kromoszómák dekondenzálódnak és láthatóvá válik a sejtmagvacska. Végül a citokinezis során a sejt teljesen kettéválik. Telofázis alatt a CDKA a fragmoplaszt középvonalában lokalizálódik. A késői telofázis alatt a CDKA re-asszociál a kromatinnal (Weingartner és mtsai, 2001).

### **3. Anyag és módszer**

#### **3.1. A cilindropermopszin tisztítása**

A kísérleteinkhez szükséges CYN-t, egy *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) vízvirágzásból származó cianobaktérium törzsből (ILC-164) tisztították Vasas és munkatársai egy korábban közölt módszer szerint (Vasas és mtsai, 2002). A módszer röviden: 10 napig nevelt tenyészeteket centrifugáltak, majd a keletkezett üledéket  $-20^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten tárolták. A fagyasztott sejteket felolvasztották, majd két ismétlésben újrafagyasztották és hagyták felengedni. A kivonáshoz a sejteket egy éjszakán át 90% (v/v) metanolban tartották (1:3 nedves tömeg: térfogat) folyamatos rázatás mellett  $4^{\circ}\text{C}$ -on. Centrifugálás után az üledéket még kétszer átmosták 100 ml 90% (v/v) metanollal, majd az elegyített felülúszókat  $40^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten bepárolták. A bepárolt mintát 50% (v/v) etanolban feloldották és 20 perc  $20000 \times g$ -n történő centrifugálás után a felülúszót gélkromatográfia (Toyopearl HW-40; 80 x 3 cm oszlop) segítségével frakcionálták. A frakciókat mustár csíranövény teszt (BGST, Kós és mtsai, 1995) segítségével ellenőrizték.

A toxikus frakciókat elegyítették, majd a töményítés után szemipreparatív C-18-as HPLC oszlopra vitték fel. Az elúciót 1-10 (v/v) majd 10-30% (v/v) metanol grádiens segítségével végezték. A preparátum tisztaságát HPLC és kapilláris elektroforézis módszerekkel ellenőrizték, Vasas és mtsai (2002, 2004) módszere szerint.

#### **3.2. A mikrocisztin-LR tisztítása**

A toxin tisztítását Kós és mtsai, (1995) módosított módszere alapján végezték el Vasas Gábor és munkatársai. A MCY-LR-t a *Microcystis*

*aeruginosa* BGSD 243 jelű cianobaktérium törzs tenyészetéből tisztították. A törzs egy 1992-es Velencei-tavi vízvirágzásból származik, amelyet 28 °C hőmérsékleten 160  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fényerősség mellett neveltek Allen tápoldatban. A sejteket centrifugálással gyűjtötték össze, majd pedig a sejtfeltáráshoz a sejteket kétszer lefagyasztották. Ezután hagyták felolvadni, majd az üledékből 1:1 arányú 50%-os metanolos kivonás következett egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt a lépést centrifugálás követte 17400  $\times$  g-n 10 percen keresztül 25 °C-on, utána a felülúszót bepárolták. Az eluátumot Büchi vákumbepárló segítségével párolták be, majd 10 mM 7,5-ös pH-jú Tris-HCl pufferben szuszpendálták fel. A cianotoxin végső tisztítását DEAE Cellulóz-52 oszlopon végezték el növekvő Tris-HCl pH 7,5 + 0,2 M NaCl gradienssel. A MCY-LR-t tartalmazó eluátumokat Toyopearl méretkizárásos kromatográfiával tisztították meg a további szennyezőktől, ahol 50%-os EtOH volt az eluálószer. A kinyert mikrocisztin-LR koncentrációját és tisztaságát fotometriás (240 nm), HPLC (magas nyomású folyadékkromatográfia), valamint kapilláris elektroforézis módszerek segítségével állapították meg.

### 3.3 Terepi mintavétel

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

### 3.4. A *Vicia faba* csíranövények nevelése, és toxinkezelés

Kísérleteink során három *Vicia faba* fajtát használtunk (*Standard* és *ARC Egypt Cross* a CYN kezelések során és *Lippói* a MCY-LR kezelések

során). A kísérletek előtt a magvakat felületi sterilizálásnak vetettük alá 20%-os Domestos-oldattal 20 percig. Az oldatot 10 percenként cseréltük. Ezután a magvakat háromszor 5 percig steril desztillált vízzel mostuk, az utolsó mosásnál a magokat Erlenmeyer-lombikban hagytuk egy éjszakára, hogy megpuhuljon a maghéj. Ezt követően steril körülmények között lefejtettük a maghéjat, és a magvakat agarral szilárdított táptalajon neveltük. Két táptalajt alkalmaztunk, az egyik a Gamborg vitaminjait és 2% szacharózt tartalmazó Murashige Skoog (MS\*) táptalaj (Murashige és Skoog, 1962; Gamborg és Mtsai, 1968), a másik az Allen táptalaj (Allen, 1968) volt. A nevelés körülményei: fényintenzitás-  $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$  (14/10 óra fotoperiódus), hőmérséklet - fényen  $22\pm 2^\circ\text{C}$ , sötétben  $18\pm 2^\circ\text{C}$ . A szilárd táptalajról steril körülmények között 5 ml folyékony táptalajra helyeztük a csíranövényeket, majd az első oldalgyökér kezdemények megjelenése után adagoltuk a táptalajhoz a cianotoxinokat, a kontroll mellett  $0,01\text{-}20 \mu\text{g ml}^{-1}$  koncentrációtartományban. Törzsoldatként  $2 \text{ mg/ml}$  toxint használtunk. A toxinkezelés időtartama 1, 2, 3 és 6 nap volt.

### **3.5. Növekedés vizsgálatok**

A növekedés vizsgálata során 3 napig kezeltük a csíranövényeket CYN-nel, folyamatos megvilágítás ( $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , hideg fehér fény) mellett, ill. sötétben. A 6 napos cianotoxin kezeléseket csak folyamatos megvilágítás mellett végeztük el, mivel a sötétben nevelt növények a kezelés végére elpusztultak. A CYN növekedésre gyakorolt hatását az epikotil és a főgyökér hosszának mérésével valamint az oldalgyökerek számának változásával határoztuk meg a kontrollhoz viszonyítva. Minden paramétert a CYN kezelés kezdetén és végén mértük. A növekedés méréseket legalább 3 független kísérletben végeztük el. Az adatokat Systat Sigma Plot 10.0<sup>®</sup>

szoftverrel ábrázoltuk. A kontroll és a CYN kezelés közötti eltérés statisztikai szignifikanciáját kétmintás t-tesztel becsültük meg, a különbséget akkor tekintettük szignifikánsnak ha a  $P < 0,05$ .

### **3.6. Hisztokémiai és immunhisztokémiai módszerek**

A gyökércsúcsokat 2 órára mikrotiter lemezbe helyeztük, és PBS (NaCl tartalmú foszfát puffer) + 2%-os paraformaldehid (PFA) oldatban fixáltuk. A fixálás letelte után 5 percig PBS-ben mostuk a gyökércsúcsokat, majd hozzáadtunk 40%-os szacharóz tartalmú PBS-t és vákuuminfiltráltuk 20 percig. Négyórás inkubálást követően fagyasztva metszést végeztünk Leica Histoslide 2000 mikrotómmal. Ezt követően a metszeteket legalább egyszer átmostuk PBS-sel és mélyített tárgylemezre helyeztük át, 10 percig permeabilizáltuk 0,5%-os Triton X-100 tartalmú PBS-sel, majd háromszor 5 percig mostuk PBS-sel. A direkt immunfluoreszcenciás jelölés sötétben 16 órán keresztül tartott, Cy3-mal konjugált anti- $\beta$ -tubulinnal (Sigma-Aldrich). A jelölőoldat térfogata 30  $\mu$ l, a *V. faba* esetében az antitestet harmincszorosra hígítottuk 1% BSA (borjúszérum albumin, Merck) tartalmú PBS-sel. Az antitesttel jelölt metszeteket háromszor 5 percig PBS-sel mostuk. A foszfohiszton H3 (H3S10ph) jelölésekhez az elsődleges antitestet (cat. No. 05-817, Upstate, Lake Placid, NY, USA) 50-szeres hígításban használtuk. A jelölés időtartama 12 óra volt 4 °C-on, amelyet két mosási lépés követett 1xPBS-el. A másodlagos antitestet (Alexa 488-konjugált kecskében készített anti-nyúl IgG; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) 100-szoros hígításban alkalmaztuk 37 °C-on 4 órán keresztül. A kromatin jelöléshez DAPI-t (4',6'-diamidino-2-fenilindol, Fluka) használtunk. A DAPI törzsoldat 150  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> volt, és ezt hígítottuk PBS-sel (a végkoncentráció 3  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> volt). A festés időtartama 1 óra, sötétben. A megfestett metszeteket háromszor 5 percig PBS-sel mostuk, majd áthelyeztük egy másik tárgylemezre. A preparátumok elkészítése során MOWIOL-t (Sigma-Aldrich) használtunk.

A gyökércsúcsok ROS szintjének meghatározásához 2',7'-diklorofluorescein-diacetátot (DCFH-DA, Sigma-Aldrich) használtunk Guo és mtsai (2008) módszere alapján. A vizsgálatokat élő oldalgökökerek jelölésével végeztük. Első lépésben mostuk a gyökereket PBS-sel majd pedig 30 percen keresztül inkubáltuk 20  $\mu$ M-os DCFH-DA oldatban. Ezt követően kétszer mostuk a gyökereket PBS-ben.

A rövidtávú szinkronkísérleteket hasonlóképpen végeztük, azzal a különbséggel, hogy a toxin hozzáadása előtt az oldalgökökér merisztéma sejteket (egész oldalgökökér csúcsokat) hidroxürea (HU) oldattal szinkronizáltuk. Az inkubálás után steril ioncserélt vízzel kimostuk a HU-t és tiszta folyékony MS\* táptalajba helyeztük a növényeket, melyekhez hozzáadtuk a megfelelő mennyiségű CYN-t. A toxin koncentrációja 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> volt. A preparátumok készítése a fent említett módon történt.

A preparátumokat Olympus Provis AX-70 konvencionális fluoreszcens mikroszkóppal és Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A fluorokrómok gerjesztési hullámhossztartományai: 320-360 nm (DAPI), 540-580 nm (Cy3), 450-480 nm (Alexa 488) és 450-480 nm (DCFH-DA) az Olympus Provis AX-70, 351/364 nm (DAPI), 543 nm (Cy3) és 488 nm (Alexa 488) a Zeiss LSM 510 mikroszkóp esetében. A fluoreszcencia emissziót 560–615-, 505–550- and 385–470-nm band-pass szűrőn keresztül detektáltuk. Olympus Provis AX-70 esetében 40x apokromatikus objektívet, míg Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóp esetében 60x apokromatikus olajimmerziós objektívet (NA 1,4) használtunk. A H3S10ph jeleket ImageJ64 szoftverrel kvantifikáltuk. A mitotikus és a kromatin szerveződés kiértékelése során az osztódási orsó és a hozzákapcsolódó kromatin-változások típusát detektáltuk és kvantifikáltuk. Minden alkalommal legalább tíz gyökércsúcs metszetet és 200 orsót vizsgáltunk minden kísérletben.

### **3.7. Az oldalgökér csúcsmerisztéma sejtek mitotikus aktivitásának vizsgálata**

Az oldalgökér csúcsmerisztéma sejtek osztódóképességének vizsgálatakor minden osztódási stádiumot külön megszámláltunk, majd az adatokból kiszámoltuk a mitotikus indexet az alábbi képlet segítségével: mitotikus index = osztódó sejtek száma/összes sejtek száma  $\times 100$ . Az egyes mitotikus stádiumokban lévő sejtek arányát is kiszámítottuk. Az S-fázis index meghatározását szintén az oldalgökér csúcsmerisztémában végeztük az alábbi képlet segítségével: S-fázis index=S-fázisban lévő sejtek/összes sejt száma  $\times 100$ . A sejtek számolásakor figyelmen kívül hagytuk a nyugvó centrum, a kialakuló szállító szövet és a gyökérsüveg sejtjeit. A korai, ill. a késői mitotikus fázisok indexét is számoltuk. A kísérleteket legalább három ismétlésben végeztük el.

### **3.8. *In vivo* és *in vitro* DNS szintézis vizsgálatok**

A *V. faba* csíranövények nevelése és felületi sterilizációja a fent említett módon történt. A maghéjat steril körülmények között eltávolítottuk, és a magvakat Allen táptalajon neveltük melyet agarral szilárdítottunk meg, majd a megfelelő növekedési stádiumban lévő növényeket folyékony táptalajra helyeztük. A megfelelő növekedési stádiumban lévő növényekhez hidroxihidroxiména (HU) oldatot adtunk a sejtek szinkronizálása végett. Az inkubálást követően a HU-t kimostuk a növényekből és tiszta folyékony táptalajra helyeztük. Ezek után megtörtént a mintavétel, amely során 2-3 mm oldalgökércsúcsokat vettünk le a növényekről és ezekkel dolgoztunk tovább. A mintavételt követően az egész oldalgökércsúcsokat 25  $\mu\text{M}$ -os 5-BrdU (5-bróm-2'-deoxiuridin, Sigma-Aldrich) oldattal kezeltük 1 órán keresztül 37  $^{\circ}\text{C}$ -on sötétben, majd pedig kimostuk PBS oldattal. Az 5-BrdU jelölést

követően a gyökércsúcsokat PBS + 2% formaldehid oldattal fixáltuk egy órán keresztül. Ezt követően szintén PBS-ben mostuk a mintákat majd hozzáadtunk 40%-os szacharóz tartalmú PBS-t és vákuuminfiltráltuk 20 percig. Négyórás inkubálást követően fagyasztva metszést végeztünk Leica Histoslid 2000 mikrotómmal. Ezt követően a DNS denaturálására 1N HCl-t használtunk, amelynek az inkubációs ideje 30 perc volt 37 °C-on. A HCl kimosás szintén PBS-sel történt. A sejtek neutralizálásához 0,1 M Borax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) oldatot használtunk maximum 10 percig. Ezután következett az elsődleges ellenanyaggal történő jelölés (anti-BrdU, Sigma-Aldrich), amely 4 órán keresztül 37 °C-on sötétben történt. Az antitestet százszorosára hígítottuk 1% BSA (borjúszérum albumin, Merck) oldattal. A nem kötődött ellenanyag kimosása után következett a másodlagos ellenanyaggal (Alexa Fluor 546, Molecular Probes) történő jelölés szintén 4 órán keresztül 37 °C-on sötétben, majd pedig a mintákat PBS-sel mostuk. A másodlagos ellenanyagot ötvenszeresére hígítottuk szintén 1% BSA oldattal. A kromatinállomány jelölését DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol, Fluka) festékkel végeztük. 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$  DAPI törzsoldatot használtunk, és azt hígítottuk PBS-sel (a végkoncentráció 3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  volt). A festés időtartama 1 óra, sötétben. A jelölési eljárást követően preparátumokat készítettünk a metszetekből. A preparátumok elkészítése a fent említett módon történt. A BrdU jelölések során kísérletenként 5-6 oldalgyökér 30 metszetét vizsgáltuk meg. A jelölések alapján megszámláltuk az S-fázisban lévő sejteket mind a kontroll mind pedig a kezelt növények esetében. Eredményeinket a Systat Sigma Plot 10.0<sup>®</sup> szoftverrel ábráztuk.

Az *in vitro* DNS szintézis vizsgálatok során PCR és qPCR technikát használtunk. A PCR reakciókat Riba Milánnal (DE TTK Növénytani Tanszék), míg a qPCR reakciókat Simon Ádámmal (DE MÉK Állattenyésztési Tanszék) együtt végeztük el. A PCR vizsgálataink során a

16S rRNS génre specifikus primerek segítségével PCR módszerrel amplifikáltuk a gén egy kb. 1100 bp. hosszú szakaszát (359. bázistól a 1492. bázisig). Forward primerként a CYA359F (GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG) (Nübel és mtsai, 1997) cianobaktériumokra specifikus primert használtuk, míg a reverse primer a 1492R (TAC GGY TAC CTT GTT ACG AC) (Lane, 1991) volt. A PCR reakcióhoz használt reagensek: 1. DreamTaq Green PCR Master Mix, 2. CYA359F forward primer, 3. 1492R reverse primer, 4. Nukleázmentes víz, 5. templát, 6. CYN 0,1, 1, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . A PCR program lépései: 1. Denaturálás: 94°C-on 30 másodpercig 2. Anellálás: 60°C-on 30 másodpercig 3. Polimerizáció/lánchosszabbítás: 72°C-on 60 másodpercig. A fent említett ciklus a készülékben 40X játszódtott le. A reakció termékeket etídium bromidot tartalmazó 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk meg, amelyeket UVIDoc (UVITEC Cambridge) géldokumentációs rendszer segítségével dokumentáltunk. A DNS sávok kvantifikálásához ImageJ64 szoftvert használtunk.

A valós idejű PCR reakciókat négy technikai ismétlésben futtattuk 96 vályús optika plate-en (Life Technologies) ABI 7300 qPCR gépen (Life Technologies). Kontrollként DNS mintát nem tartalmazó reakciókat használtunk. A hőmérséklet profil az alábbi volt: 95°C 3 min, majd 40 cikluson át denaturáció: 95°C 45 sec; primer tapadás: 55°C 45 sec; lánchosszabbítás: 72°C 1 perc, majd végső lánchosszabbítás 72°C 10 perc. A reakciók tartalmaztak (20  $\mu\text{l}$  végtérfogat) 1,25 ng DNS templátot, 1X Xceed qPCR SG Hi-ROX mastermixet (Institute of Applied Biotechnologies) és 0,5  $\mu\text{M}$ -t mindkét primerből valamint 0,1, 1 vagy 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN-t. A kvantitatív ciklus értékeket ( $C_q$ ) az SDS 1.4 adatgyűjtő szoftverből (Life Technologies) exportáltuk ki.

### **3.9. Peroxidáz (POD) és kataláz (CAT) enzimaktivitás meghatározás gélelektroforézissel**

Az enzimatis antioxiidáns aktivitást 7,5%-os natív poliakrilamid gélelektroforézissel határoztuk meg. A kivonatok elkészítéséhez fiatal oldalgökereket használtunk, amelyeket egy 150mM NaCl-t, 14,6 mM 2-merkaptoetanolt és 100mM Tris-HCl-t tartalmazó pufferben dörzsöltünk el 1:2 arányban. A puffer pH-ja 8,0 volt (Schlereth és mtsai, 2000). Ezt követte egy 15000  $\times$  g centrifugálás 10 percen keresztül, amely után a felülúszóval dolgoztunk tovább. A géltre 20-20  $\mu$ l mintát vittünk fel amely körülbelül 7-8 mg oldalgökércsúcsnak megfelelő extraktumot tartalmazott.

A pirogallol peroxidáz gélek detektálásához első lépésben a gélt 50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pufferben inkubáltuk (pH=7,5) . Ezt követte a festési lépés 15-30 percen keresztül 50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  pufferben (pH=7,5), amely 20 mM pirogallolt és 5mM  $H_2O_2$ -t tartalmazott. Az oxidációs termék barnás sávként jelentkezett a gélen.

A kataláz izoenzimek detektálását Weydert és Cullen, (2010) módszere alapján végeztük el. Első lépésként a gélt 0,03%  $H_2O_2$ -ben 15 percen keresztül inkubáltuk. A festés során 0,76 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  és 1,5 mM  $FeCl_3$  oldatban inkubáltuk a gélt. A kataláz aktivitás a sötét háttéren megjelenő világos sávok formájában volt detektálható.

A gélek kiértékelését CP Atlas<sup>®</sup> szoftverrel végeztük. A teljes enzimaktivitást a kapott csúcsok alatti területekből számoltuk ki, majd Sysstat Sigma Plot 10.0<sup>®</sup> szoftverrel ábrázoltuk.

### **3.10. Kromoszóma („squash”) preparátumok készítése**

A kromoszómapreparátumok készítése során a gyökércsúcsokat 0,1%-os kolchicin (Sigma-Aldrich) oldattal kezeltük 4 órán keresztül, majd 20 percig fixáltuk 45% ecetsavban. Ezt követően a gyökereket 60°C-on 5,5

percig hidrolizáltuk 1N sósavban. A kromoszómákat 5%-os kármin-acetáttal festettük 60°C-on 30 percig, majd dörzspreparátumokat készítettünk. A kromoszóma preparátumok kiértékelése során Olympus Provis AX-70 mikroszkópot használtunk. Kísérletenként legalább 100 metafázisos kromoszómákat tartalmazó sejtet vizsgáltunk meg minden koncentrációban.

### **3.11. Protein foszfatázok (PP1 és PP2A) aktivitásának vizsgálata**

A teljes protein foszfatáz (PP1 és PP2A) aktivitás meghatározásához *V. faba* (Lippói fajta) csíranövények fiatal oldalgyökereit használtunk. A fiatal oldalgyökereket 50mM Tris-HCl-t (pH 7,5), 0,1 mM EDTA-t, 0,2 mM EGTA-t, 0,1% (w/v) 2-merkaptoetanolt és 0,2 mM PMSF-t tartalmazó pufferben extraháltuk. A sejtmentes kivonatok fehérje tartalmát Bradford (1976) módszerével határoztuk meg. Az elkészített kivonatok protein foszfatáz aktivitásának meghatározását Erdődi Ferenc és munkatársai végezték. A specifikus foszfatáz aktivitást pmol [<sup>32</sup>Pi] mg fehérje<sup>-1</sup> formájában adtuk meg (Erdődi és mtsai, 1995). Az adatokat a kontroll aktivitás (100%) százalékában adtuk meg. Az adatok kiértékeléséhez Systat Sigma Plot 10.0 szoftvert használtunk.

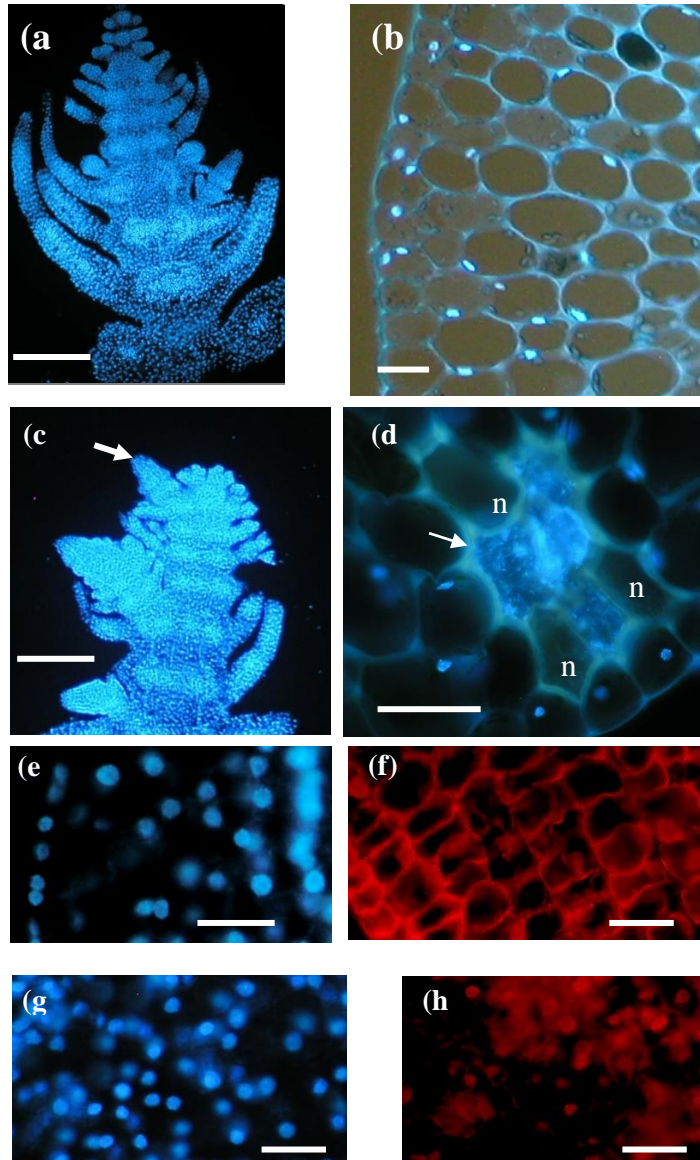
## 4. Eredmények

### 4.1. Bárdos-tóból származó terepi minták citológiai vizsgálata

A Bárdos-tóból vett terepi mintákat 2012. 09. 03.-án gyűjtötték Vasas Gábor és munkatársai. A mintagyűjtés két helyről történt. A kontroll csoportot alkotó növényeket a tavon lévő vízvirágzás helyszínétől távoli tiszta víztérből, míg a hatás vizsgálatba bevont növényeket a vízvirágzás helyszínéről vették. Vasas és munkatársai méréseinek alapján a kontroll víztérben mért mikrocisztin koncentráció  $0,00 \mu\text{g L}^{-1}$ , míg a vízvirágzás helyszínén mért mikrocisztin koncentráció  $5,92 \mu\text{g L}^{-1}$  volt. A *Ceratophyllum submersum* (sima tócsagaz) növényekben mért mikrocisztin koncentráció a kontroll növények esetében  $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ , míg a vízvirágzásból vett növények esetében a mikrocisztin koncentrációja  $1,04 \mu\text{g g}^{-1}$  volt száraz tömegre vonatkoztatva.

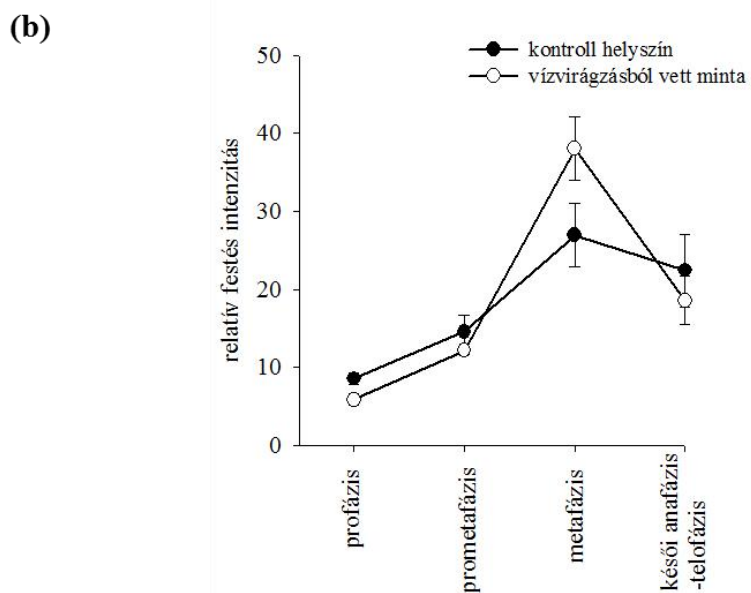
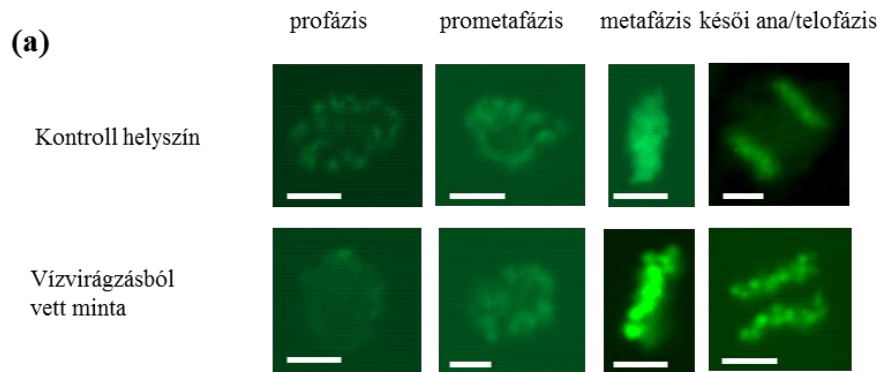
A szövettani és citológiai vizsgálatok során számos mikrocisztin mérgezésre utaló elváltozást figyeltünk meg. Vizsgálataink során *C. submersum* hajtáscsúcsban illetve hajtásban figyeltünk meg különböző elváltozásokat, amelyeket valószínűleg a vízvirágzás során a víztérbe kerülő cianobakteriális toxin okozott. A kontroll növényekből készített hajtáscsúcs hosszmeteszetekben nem tapasztaltunk elváltozásokat a hajtáscsúcs fejlődése során. A hajtáscsúcs normál felépülése figyelhető meg, jól meghatározott levél primórdiumokkal és internódiumokkal (5. a ábra), valamint a szárból készített keresztmeteszetek vizsgálata során sem detektáltunk rendellenes fejlődésre utaló jeleket (5. b ábra). A vízvirágzásból vett növények esetében a hajtáscsúcs hosszának rövidülését, kiszélesedését, radiális duzzanatát, valamint az oldalrügyek korai kialakulását figyeltük meg (5. c ábra). A fiatal szár egyes szöveteiben nekrozis volt megfigyelhető valószínűleg a cianotoxin hosszú távú jelenlétének következtében. Ezen szövetek sejtjeit a DNS

tartalom teljes hiánya is jellemezte. A nekrozis előjeleként megfigyelhető volt a sejtmag degradációja is egyes sejtekben. Továbbá ezeknél a szöveteknél rendellenes sejtfalvastagodás is megfigyelhető volt (5. d ábra). A hajtáscsúcs további vizsgálata során nem tapasztaltunk változást a DNS jelölések alkalmazásával sem a kontroll (5. e ábra) sem pedig a vízvirágzás helyszínéről vett növényekben (5. g ábra), kivéve a nekrotikus foltokban. Viszont, kontroll növényekben nem volt megfigyelhető a sejtmagok autofluoreszcenciája (5. f ábra), míg a vízvirágzás helyszínéről vett növények esetében a sejtmagok autofluoreszcenciája jelzi az oxidált aromás (fenolos) vegyületek felhalmozódását, illetve az oxidatív stressz folyamatok sejtmagon belüli megjelenését (5. h ábra).



**5. Ábra:** *Microcystis* vízvirágzás okozta hisztológiai és citológiai elváltozások. (a) hajtáscsúcs, kontroll; (b) fiatal hajtás keresztmetszeti képe, kontroll mintavételi hely; (c) hajtáscsúcs, vízvirágzásból vett minta: hajtáscsúcs radiális duzzanata, oldalrügyek korai kialakulása (nyíl); (d) fiatal hajtás keresztmetszeti képe, vízvirágzásból vett minta: nekrotikus sejtek, amelyekben a kromatinállomány degradációja figyelhető meg (n), rendellenes sejtalfalvastagodás (nyíl); (e) hajtáscsúcs hosszmetset, kontroll, DAPI jelölés; (f) hajtáscsúcs hosszmetset, kontroll, autofluoreszcencia; (g) hajtáscsúcs hosszmetset, vízvirágzásból vett minta, DAPI jelölés; (h) hajtáscsúcs hosszmetset, vízvirágzásból vett minta, autofluoreszcencia. Skála: 1 mm (a, c), 50  $\mu$ m (b, d-h).

További immunhisztokémiai vizsgálatok során megvizsgáltuk a hiszton-H3 foszforilációs fokát a Ser10 pozícióban (H3S10ph) a *C. submersum* hajtáscsúcs merisztéma szövetében. Külön vizsgáltunk minden mitotikus fázist (profázis, prometáfázis, metafázis, késői anafázis/telofázis átmenet). A vizsgálat során a hiszton H3 foszforilációs fokában nem találtunk eltérést a profázisban, prometáfázisban és a késői anafázis/telofázis átmenetben. Viszont a metafázisos sejtekben a H3S10ph hiperfoszforilációja volt megfigyelhető az immunhisztokémiai vizsgálatok során, amely rendellenes testvérkromatida szegregációt eredményezhet (6. a ábra). Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményeinek kvantifikálása során egyértelművé vált a metafázisban lévő sejtek H3S10ph hiperfoszforilációja, amely a kontroll növényekben mért foszforilációs szint 1,5-szeresére emelkedett (6. b ábra).



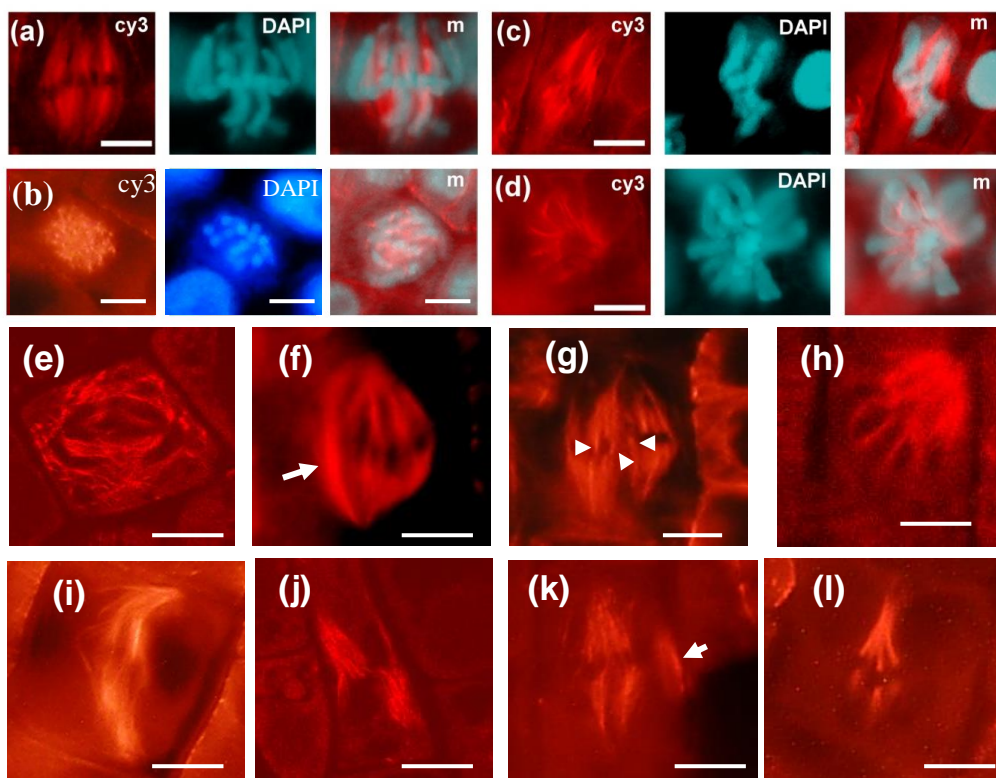
**6. ábra:** H3S10ph jelölés. **(a)** konfokális mikroszkóppal készült felvételek, *C. submersum* hajtás csúcs merisztéma szövetek egyes mitotikus fázisai, Skála: 5  $\mu$ m. **(b)** H3S10ph jelölés kvantifikált eredményei.

## **4.2. MCY-LR hatása a metafázis és anafázis orsó organizációjára**

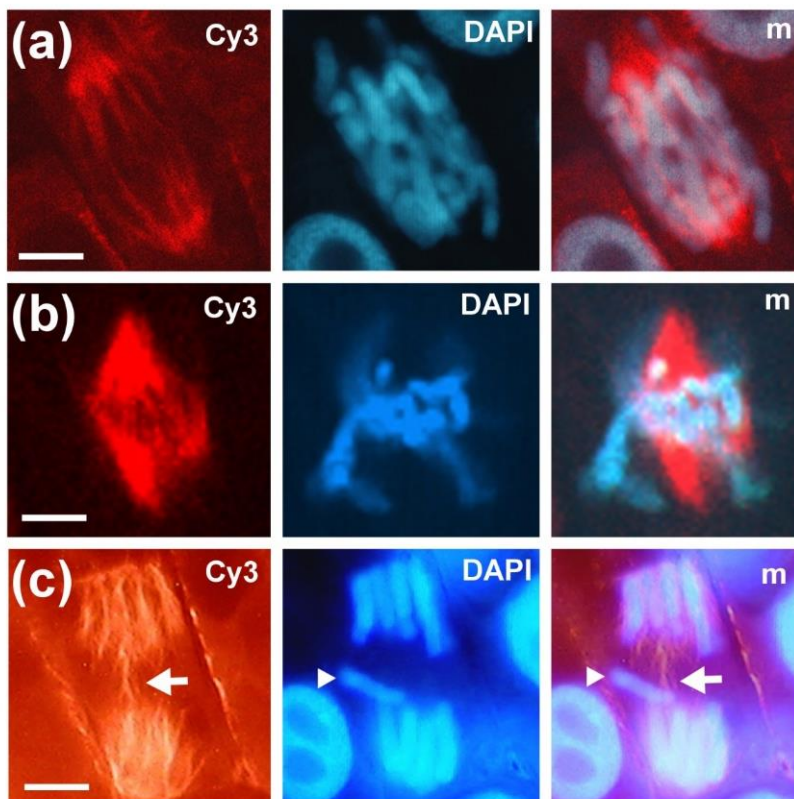
A vizsgálataink során *V. faba* „Lippói” fajtájának oldalgyökér csúcsait használtuk, amelynek a merisztéma szöveteiben figyeltük meg a MCY-LR hatására kialakuló rendellenes osztódási orsó struktúrákat. Kontroll növényekben jellemzően normális bipoláris osztódási orsókat figyeltünk meg, valamint a kromoszómák normális, egyenlítői síkba való rendeződése volt jellemző. A kontroll metafázis sejtekben az osztódási orsó mindkét pólusa több kiindulási ponttal rendelkezik, hiszen ismert, hogy az osztódó növényi sejtben pólusonként több mikrotubulus organizációs centrumból (MTOC) indulnak ki a mikrotubulus kötegek (Baskin, 2015; 7. a, b ábra). Az anafázis során a kontroll növényekben szintén megfigyelhető a normálisan összeszerelődő bipoláris osztódási orsó valamint a kromoszómák normális elrendeződése. Az anafázisban az osztódási orsó mikrotubulus kötegeinek a rövidülése illetve a testvérkromatidák lassú szétválása figyelhető meg (8. a ábra). 1 napos MCY-LR kezelés nem okozott jelentős változásokat a mitotikus orsó összeszerelődésében. Ezzel szemben, 2 és 6 napos kezelések hatására különböző típusú osztódási orsó anomáliákat figyeltünk meg (3. és 4. táblázat).

**3. Táblázat:** 2 napos MCY-LR kezelések hatására jelentkező teljes metafázis/anafázis osztódási orsó rendellenességek százalékos aránya *V. faba* oldalgyökér merisztémában. Átlag ± szórás értékek.

Osztódási orsó rendellenességek típusai	MCY-LR, µg ml <sup>-1</sup>			
	0	0,1	1	10
<b>a, szétesett orsó</b>				
metafázis	0,48 ± 0,15	1,11 ± 0,33	0,62 ± 0,23	2,63 ± 0,57
anafázis	0	0	0	0,79 ± 0,2
<b>c, tripoláris/multipoláris orsó</b>				
metafázis	0	0	0	0,7 ± 0,28
anafázis	0	0	0	0
<b>e, monopoláris orsó</b>				
metafázis	0	0	0,41 ± 0,11	4,73 ± 1,3
anafázis	0	0	0	0
<b>f, hiányos orsó (hiányzó kinetokor szálak)</b>				
metafázis	0	0	0	1,01 ± 0,29
anafázis	0	0	0	0
<b>g, C-alakú orsó</b>				
metafázis	0	0	0	0,92 ± 0,33
anafázis	0	0	0	0
<b>g, S-alakú orsó</b>				
metafázis	0	0	0	0,3 ± 0,15
anafázis	0	0	0	0
<b>g, aszimmetrikus (egyenlőtlen) orsó</b>				
metafázis	0	0	0	0,95 ± 0,26
anafázis	0	0	0	0
<b>Összesített orsó rendellenességek</b>				
metafázis	0,48 ± 0,15	1,11 ± 0,33	1,00 ± 0,27	11,72 ± 1,8
anafázis	0	0	0	0,79 ± 0,2



**7. ábra:** Mikrocisztin-LR (MCY-LR) hatására kialakuló metafázis orsó rendellenességek *V. faba* gyökércsúcs merisztémában. (a-d) mikrotubulusok anti- $\beta$ -tubulin jelöléssel (cy3), kromatin hisztokémiai jelölése DAPI-val és a két jelölés egyesített képe (m). (e-l) anti- $\beta$ -tubulin jelölés. (a) Kontroll metafázis, oldalnézet; (b) kontroll metafázis felülnézet; (c) tripoláris orsó oldalnézete ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 6 napos kezelés); (d) hiányos orsó felülnézeti képe és a kromoszómák rozetta-szerű elrendeződése ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 2 napos kezelés); (e) szétesett orsó ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 2 napos kezelés); (f) osztódási orsó további poláris mikrotubulus köteggel (nyíl) ( $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 6 napos kezelés); (g) multipoláris orsó a kinetokor mikrotubulus szálak (nyíl) túlzott kötegelésével ( $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 6 napos kezelés); (h) monopoláris orsó ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 2 napos kezelés); (i) C-alakú orsó ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 6 napos kezelés); (j) S-alakú orsó ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 2 napos kezelés); (k) további mikrotubuláris struktúra (orsó) (nyíl) ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 6 napos kezelés); (l) aszimmetrikus orsó ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 6 napos kezelés). Konvencionális fluoreszcens mikroszkópos képek (a-d, f, g, i, l) és konfokális mikroszkópos képek (e, h, j, k). Skála:  $5 \mu\text{m}$ . **Kromatin jelölés: Függelék, 1. ábra**



**8. ábra:** MCY-LR hatására bekövetkező rendellenes anafázis orsók *V. faba* oldalgyökér merisztéma szövetben. Anti- $\beta$ -tubulin jelölés mutatja a mikrotubulusokat (cy3), a kromoszómák hisztokémiai jelölése DAPI-val és a két jelölés egyesített képe (m). (a) Kontroll anafázis orsó; (b) tripoláris anafázis orsó ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 6 napos kezelés); egyenlítői kinetokor szálkötegek (nyíl) és lemaradó kromoszóma (nyílhegy) ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR, 6 napos kezelés). Konvencionális fluoreszcens mikroszkópos képek (c) és konfokális mikroszkópos képek (a, b).

a, Szétesett osztódási orsó, amely egy rendezetlen mikrotubuláris struktúra, és  $0,1, 5$  és  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR esetében detektáltuk metafázisos sejtekben (7. e ábra). 2 napos kezelés során  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  valamint 6 napos kezeléseknél  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR koncentráció mellett az anafázisos sejtekben is kimutatható volt ez a típusú rendellenesség (3. és 4. táblázat).

b, Egyes esetekben az osztódási orsót egy további poláris mikrotubulus köteg jellemezte, amely az interpoláris mikrotubulus szálak

túlzott kötegelése miatt alakulhatott ki. Ez a típusú osztódási orsó anomália a metafázisban lévő sejtekben volt megfigyelhető  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására hosszú távú (6 napos) kezelésekből (7. f ábra).

c, Tripoláris/multipoláris osztódási orsók, ez az orsó típus több mint 2 pólusból indul ki (7. c és 8. b ábra). Ez a típusú elváltozás a 6 napos MCY-LR kezelésekre volt a legjellemzőbb. Ez az osztódási orsó anomália kimutatható volt  $0,5, 1, 5, 10$  és  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR koncentráció mellett a metafázisos sejtekben. Legnagyobb arányban a  $0,5$  és  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR kezelés hatására volt kimutatható. Anafázisos sejtekben  $1$  és  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR koncentrációk mellett volt detektálható. A legmagasabb százalékos aránya  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR koncentráció mellett volt megfigyelhető (4. táblázat). Multipoláris orsót csak a metafázisos sejtekben tudtunk kimutatni 2 napos kezelése hatására  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR mellett (3. táblázat).

d, Kimutattunk multipoláris orsót hiperkötegelt kinetokor mikrotubulusokkal. Ezek 6 napos kezelése során  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR mellett voltak megfigyelhetőek a metafázisban lévő sejtek esetében (7. g ábra).

e, Monopoláris orsókat csak metafázisban figyeltünk meg, amelyekre jellemző volt, hogy a mikrotubulusok nukleációja csak egyik póluson valósult meg az osztódó sejtekben (7. h ábra). 2 napos kezelése során  $1$  és  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MYC-LR mellett volt megfigyelhető, valamint 6 napos kezelése alatt  $5, 10$  és  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására jelentkezett ez a típusú elváltozás.

f, Hiányos osztódási orsókat is megfigyeltünk 2 és 6 napos MCY-LR kezelése hatására. 2 napos kezelése esetében csak a metafázisos sejtekben figyeltük meg  $1$  és  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR mellett, míg 6 napos kezelése során metafázisos és anafázisos sejtekben is megfigyeltük ezt a típusú osztódási orsó rendellenességet. Metafázisos sejtek esetében  $10$  és  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ , míg

anafázisos sejtek esetében csak  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR kezelés hatására jelentkezett. A hiányos osztódási orsókra jellemző volt a kinetokor mikrotubulusok hiánya, valamint a kromoszómák rozetta-szerű elrendeződése és hiperkondenzációja a metafázisos sejtekben (7. d ábra).

g, Torz vagy hajlított osztódási orsókat csak a metafázisos sejtekben figyeltünk meg. Ebben az esetben mindkét pólus MTOC rendszere megtalálható volt. A két pólus között kialakuló osztódási orsó jellemzően C- és S-alakzatot vett fel (7. i és j ábra). Mind 2, mind pedig 6 napos kezelések során megfigyelhető volt magasabb toxin koncentrációk esetében. 2 napos kezelések során mindkét típus jelentkezett  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására, valamint 6 napos kezelések során mindkét típus jellemzően  $10$  és  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR jelenlétében volt megfigyelhető.

h, Egyes esetekben megfigyelhető a sejt egyenlítői síkjában a normális osztódási orsó mellett kialakuló plusz mikrotubuláris struktúra a metafázisos sejtekben (7. k ábra). Ez a típusú orsó a multipoláris osztódási orsó egyik variánsa lehet. Ezt a típusú elváltozást csak 6 napos kezelések során tudtuk kimutatni  $0,1$  és  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására.

i, Voltak esetek, amikor az osztódási orsó egyes kinetokor mikrotubulus szálai a sejt egyenlítői síkjában voltak detektálhatóak az anafázisos sejtekben, ami a kromoszóma vagy kromoszómák egyenlítői síkban maradását eredményezi. Ezeket a kromoszómákat lemaradó kromoszómának nevezzük, amelyek mikronukleuszok kialakulásához vezethetnek (8. c ábra). Ilyen típusú elváltozást csak  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR esetében tapasztaltunk hosszú távú (6 napos) kezelések hatására.

j, Aszimmetrikus osztódási orsók jellemzően a metafázisos sejtekben voltak kimutathatóak, amelyekre a két pólusból kiinduló egyenlőtlen méretű/hosszúságú mikrotubulus kötegek voltak jellemzőek. Mind 2, mind

pedig 6 napos kezelések során  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR jelenlétében voltak megfigyelhetőek (7. 1 ábra).

A mitotikus orsó rendellenességek mennyiségi analízise megmutatta, hogy a kontroll növényekben detektált osztódási orsók csak kis százalékban mutattak valamilyen rendellenességet 2 napos tenyésztés után. A 6 napos kezelések esetén egyáltalán nem tapasztaltunk rendellenességeket a mitotikus orsó szerveződésében (3. és 4. táblázat). 2 napos cianotoxin kezelés hatására jelentősen növekedett a metafázis orsó rendellenességek száma  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR jelenlétében, viszont az anafázis orsók esetében nem volt megfigyelhető szignifikáns emelkedés (9. a ábra). Ezzel szemben, a 6 napos kezelések során a MCY-LR szignifikáns és dóziszfüggő módon megemelte a rendellenesen kialakuló osztódási orsók számát mind a metafázisos mind pedig az anafázisos sejtekben (9. b ábra).  $0,01 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR esetében nem detektáltunk osztódási orsó rendellenességet egyik osztódási fázisban sem.  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR ( $8,64 \pm 0,23\%$ ) esetében volt elsőként megfigyelhető az osztódási orsó rendellenességek kialakulása, amelyek aránya dóziszfüggő módon emelkedett egészen  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR ( $21,15 \pm 1,47\%$ ) koncentrációig a metafázisos sejtekben (9. b ábra, 4. táblázat). Magasabb ( $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) MCY-LR koncentráció esetén a rendellenes osztódási orsók százalékos aránya csökkent a  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR kezelésekhöz képest, de még mindig viszonylag nagy számban megtalálhatóak voltak. Az anafázisos sejteket figyelembe véve  $0,01$ - $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR még nem okozott változásokat az osztódási orsó szerveződésében. Ezzel szemben  $1$ - $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR koncentráció tartományban nagy számban fordultak elő abnormális osztódási orsók. Az osztódási orsó szerveződésben bekövetkezett változások az anafázisban lévő sejtek esetében  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR ( $8,54 \pm 0,58\%$ ) mellett voltak a legmagasabb arányban (9. b ábra).

**4. Táblázat** 6 napos MCY-LR kezelések hatására jelentkező teljes metafázis/anafázis osztódási orsó rendellenességek százalékos aránya *V. faba* oldalgyökér merisztémában. Átlag ± Szórás értékek.

Osztódási orsó rendellenességek típusai	MCY-LR, $\mu\text{g ml}^{-1}$							
	0	0,01	0,1	0,5	1	5	10	20
<b>a, szétesett orsó</b>								
metafázis	0	0	4,92 ± 0,42	0	0	4,16 ± 0,31	3,02 ± 0,29	0
anafázis	0	0	0	0	0	8,54 ± 0,58	0	0
<b>b, további poláris mikrotubulus kötegek</b>								
metafázis	0	0	1,23 ± 0,05	0	0	0	0	0
anafázis	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>c, tripoláris/multipoláris orsó</b>								
metafázis	0	0	0	10,12 ± 0,59 <sup>i</sup>	9,37 ± 0,44 <sup>i</sup>	4,16 ± 0,5 <sup>i</sup>	3,02 ± 0,16 <sup>i</sup>	1,53 ± 0,13 <sup>i</sup>
anafázis	0	0	0	0	5,55 ± 0,45 <sup>i</sup>	0	5,88 ± 0,85 <sup>i</sup>	0
<b>d, multipoláris orsók kinetokor mikrotubulusainak túlzott kötegelése</b>								
metafázis	0	0	1,23 ± 0,09	0	0	0	0	0
anafázis	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>e, monopoláris orsó</b>								
metafázis	0	0	0	0	0	4,16 ± 0,3 <sup>i</sup>	3,02 ± 0,36 <sup>i</sup>	1,53 ± 0,09 <sup>i</sup>
anafázis	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>f, hiányos orsó (hiányzó kinetokor szálak)</b>								
metafázis	0	0	0	0	0	0	1,51 ± 0,15	1,53 ± 0,13
anafázis	0	0	0	0	0	0	0	1,47 ± 0,17
<b>g, C-alakú orsó</b>								
metafázis	0	0	0	0	0	0	1,51 ± 0,13	3,07 ± 0,29
anafázis	0	0	0	0	0	0	0	0

Osztdási ors rendellenessgek típusai	MCY-LR, $\mu\text{g ml}^{-1}$							
	0	0,01	0,1	0,5	1	5	10	20
<b>g, S-alakú ors</b>								
metafázis	0	0	0	0	0	0	$3,02 \pm 0,36$	$0,77 \pm 0,05$
anafázis	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>h, további ors a sejtben</b>								
metafázis	0	0	$1,23 \pm 0,12$	0	0	0	$4,54 \pm 0,28$	0
anafázis	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>i, egyenlői kinetokor mikrotubulus kötegek</b>								
metafázis	0	0	0	0	0	0	0	0
anafázis	0	0	0	0	0	0	0	$1,47 \pm 0,13^i$
<b>j, aszimmetrikus (egyenlőtlen) ors</b>								
metafázis	0	0	0	0	0	0	$1,51 \pm 0,11$	0
anafázis	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Összesített ors rendellenessgek</b>								
metafázis	0	0	$8,64 \pm 0,23$	$10,12 \pm 0,59$	$9,37 \pm 0,44$	$12,48 \pm 1,0$	$21,15 \pm 1,47$	$8,35 \pm 0,9$
anafázis	0	0	0	0	$5,55 \pm 0,45$	$8,54 \pm 0,58$	$5,88 \pm 0,85$	$2,94 \pm 0,29$

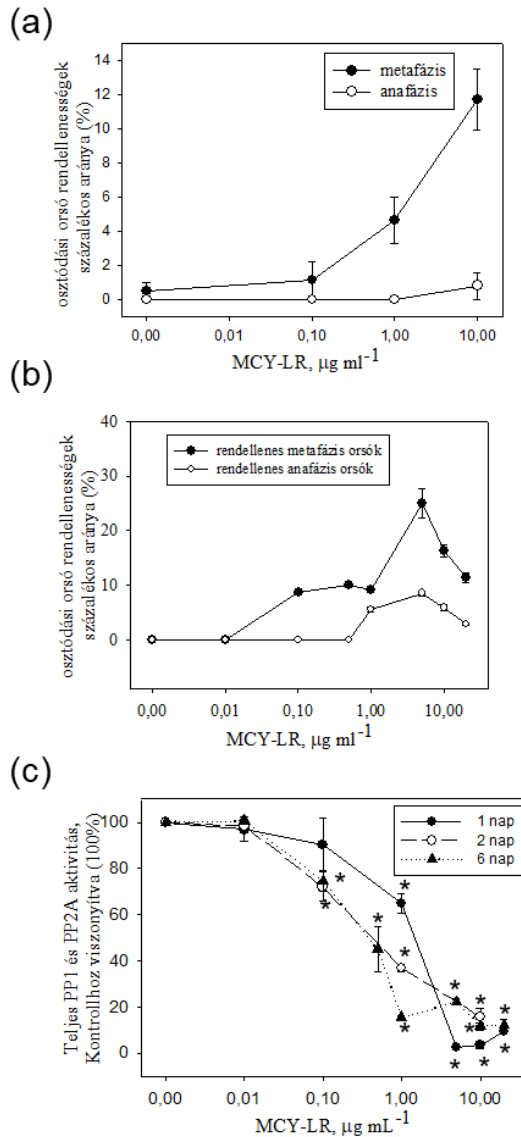
<sup>i</sup>Osztdási ors rendellenessgeket kísérő rendellenes mitotikus kromoszóma organizáció/testvérkromatida szegregáció hisztokémiai elemzés során.

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy ezeknek a változásoknak a hátterében a MCY-LR által indukált protein foszfatáz gátlás áll, az oxidatív stressz kiküszöbölése érdekében kombinált 100  $\mu\text{M}$  aszkorbinsav (ASA) és 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR kezelést is végeztünk 2 napig. A MCY-LR kezelésekhöz képest az ASA + MCY-LR kezelés nem csökkentette a mitotikus orsóban bekövetkezett rendellenességek százalékos értékét, ami azt jelenti, hogy az ASA, mint antioxidáns nem védi meg az osztódó sejteket a MCY-LR által indukált mitotikus hibáktól (Függelék, 2. ábra). Ez a tény azt vetíti előre, hogy a MCY-LR által indukált protein foszfatáz gátlás önmagában is elég a mitotikus orsó rendellenes fejlődéséhez.

#### **4.3. MCY-LR hatása a teljes protein foszfatáz aktivitásra *V. faba* gyökérben**

A MCY-LR idő és dózisfüggő hatását figyeltük meg a teljes protein foszfatáz aktivitásra (PP1 és PP2A) nézve *V. faba* fiatal oldalgyökérben. A mérés során szubsztrátként a miozin II 20 kDa-os foszforilált könnyű láncát használtuk. A kísérletek kivitelezésében Prof. Dr. Erdődi Ferenc és Kónya Zoltán (DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet) működött közre. 0,01  $\mu\text{g ml}^{-1}$  toxin koncentráció mellett nem tapasztaltunk gátló hatást egyik kezelési időtartamban sem. Ebben a toxin koncentrációban a mitotikus orsó rendellenességei sem voltak megfigyelhetőek. 1 napos kezelése során 1-20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  koncentráció tartományban a MCY-LR jelentősen csökkentette a teljes PP1 és PP2A aktivitást, de az 50%-os gátló hatást ( $\text{IC}_{50}$ ) már 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  feletti MCY-LR koncentráció kiváltotta. 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására a PP1 és PP2A aktivitás majdnem teljes gátlása volt megfigyelhető a kontrollhoz képest. 2 és 6 napos kezelése során, ami viszonylag hosszú időtartam, a protein foszfatázok jelentős gátlása már 0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására

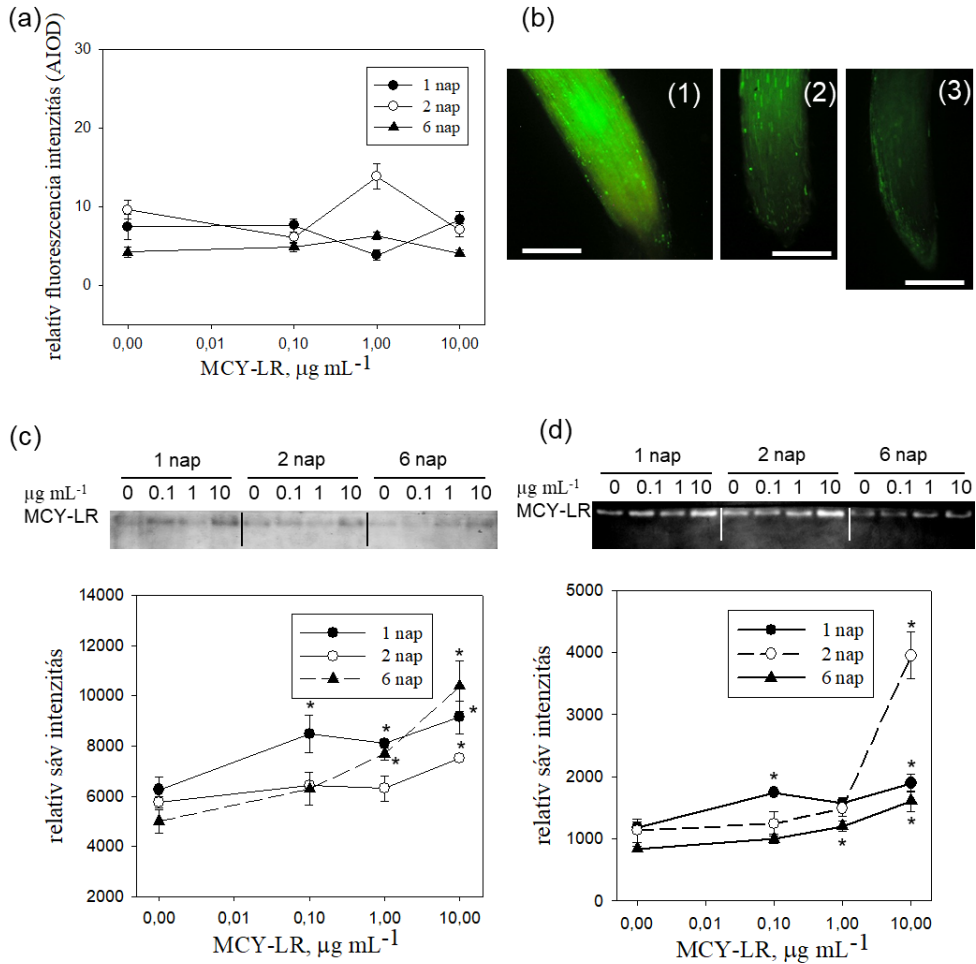
bekövetkezett. Az  $IC_{50}$  érték ezeknél az időtartamoknál  $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására volt megfigyelhető. A 2 és 6 napos kezelések során  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR koncentráció felett szintén megfigyelhető volt a totál PP1 és PP2A aktivitás majdnem teljes gátlása (9. c ábra).



**9. ábra:** A MCY-LR dózisfüggő hatása a rendellenes osztódási orsók kialakulására *V. faba* oldalgyökércsúcs merisztéma sejtekben: (a) 2 napos kezelések; (b) 6 napos kezelések. A MCY-LR idő- és dózisfüggő hatása a teljes protein foszfatáz (PP1 és PP2A) aktivitásra *V. faba* gyökérben. \* Statistikailag szignifikáns különbségek,  $P < 0,05$ .

#### **4.4. MCY-LR hatása a ROS szintre és az antioxidáns enzim aktivitásra**

A cianotoxinnal kezelt oldalgöyökér csúcsokat DCFH-DA-val jelöltük, amely nem mutatott szignifikáns változást a reaktív oxigéngyökök (ROS) szintjének emelkedésében MCY-LR kezelések hatására. Ez általánosan elmondható az összes kezelési időtartamra (1, 2 és 6 nap). 2 napos kezelések során  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására enyhe emelkedést tapasztaltunk a ROS szintben, de ez az emelkedés nem bizonyult szignifikánsnak (10. a ábra). A pirogallol peroxidáz (POD) és a kataláz (CAT) enzimaktivitás mérések során az enzimaktivitás emelkedése idő- és dóziszfüggő módon jelentkezett MCY-LR jelenlétében, hasonlóan a totál PP1 és PP2A aktivitás során mért gátláshoz. A két enzimrendszer között mind az idő-, mind pedig a dóziszfüggés tekintetében voltak változások (10. b és c ábra). A peroxidáz enzimaktivitás esetén  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  vagy ennél magasabb MCY-LR koncentráció az enzimaktivitás emelkedését indukálta. Szignifikáns emelkedés volt tapasztalható 1 napos kezelések során  $0,1-10 \mu\text{g ml}^{-1}$ , míg 6 napos kezelések alkalmával  $1-10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására. A legmagasabb enzimaktivitást a 6 napos kezelések során  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR kezelés mellett mértük, amely több mint kétszerese volt a kontroll enzimaktivitásnak. A 2 napos kezelések során csak a  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR által indukált enzimaktivitás növekedés bizonyult szignifikánsnak a kontrollhoz viszonyítva (10. c ábra). Ez a toxinkoncentráció a kataláz aktivitás tekintetében igen drasztikus, majdnem 4-szeres emelkedést indukált a 2 napos kezelések során. 1, 2 és 6 napos kísérletek során is szignifikáns emelkedés volt tapasztalható a kataláz aktivitásban  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására. Az alacsonyabb cianotoxin koncentrációk tekintetében csak a  $0,1-1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR indukált szignifikáns emelkedést az enzimaktivításban az 1 és 6 napos kezelési időtartamoknál (10. d ábra).



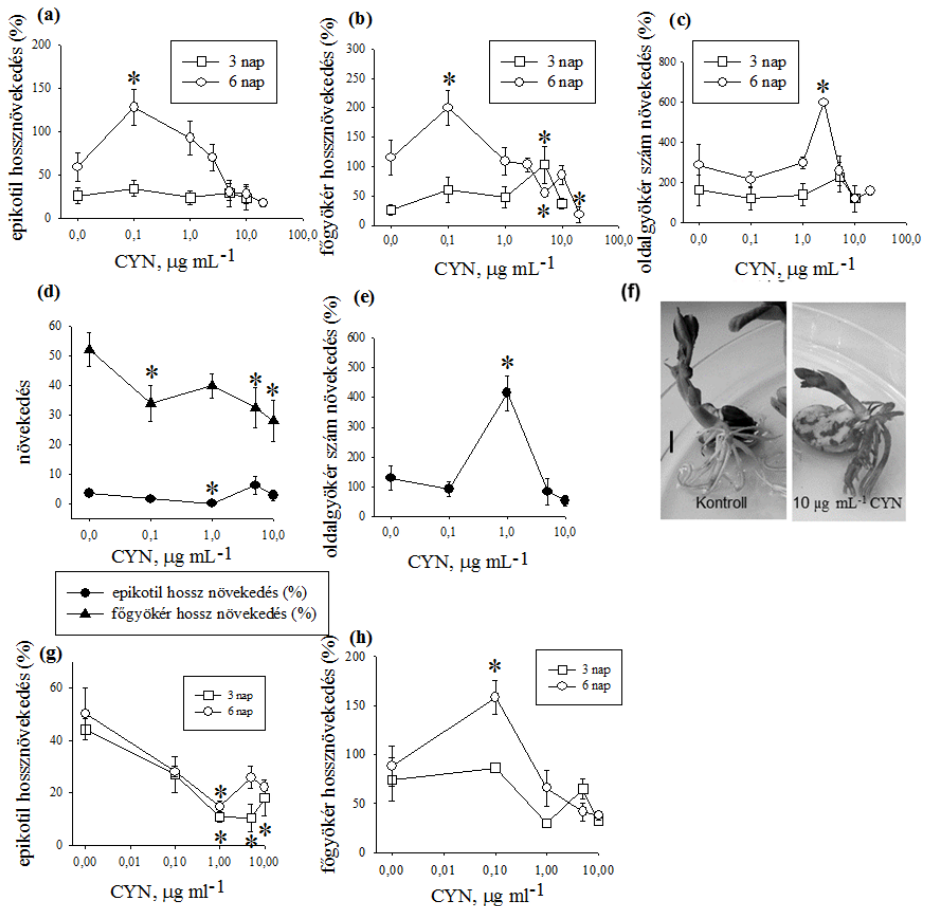
**10. ábra:** A MCY-LR idő és dóziszfüggő hatása a ROS szintre valamint a peroxidáz és kataláz aktivitásra *V. faba* gyökereiben. (a) DCFH-DA jelölés kvantitatív kiértékelése; (b) reprezentatív mikroszkópos képek a DCFH-DA jelölésről *V. faba* oldalgyökér csúcsokban. (b1) pozitív kontroll, 1 napos 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés, (b2) kontroll gyökércsúcs 1 nappal a kezelés indítása után, (b3) 1 napos 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  MCY-LR kezelés; (c) Pirogallol peroxidáz aktivitásának változása; (d) kataláz aktivitás változása MCY-LR hatására. \*Statistikailag szignifikáns különbség,  $P < 0,05$ . Lépték: 1mm (b).

#### 4.5. CYN hatása a *Vicia faba* csíranövények növekedésére és fejlődésére

A kísérleteink során *V. faba* „standard és ARC Egypt Cross” fajtákat használtunk és vizsgáltuk a CYN hatását a gyökér és a szár növekedésére valamint az oldalgökörek fejlődésére nézve folyamatos megvilágítás mellett. A CYN-nek nem volt szignifikáns hatása 3 napos kezelések során az epikotil növekedésére, valamint az oldalgökörek számában sem figyeltünk meg szignifikáns változást. Viszont a főgyökér esetében  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  toxin koncentráció mellett stimuláló hatást figyeltünk meg. 6 napos toxinkezelés alatt stimuláló hatást tapasztaltunk az epikotil és a főgyökér megnyúlására nézve  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására, míg  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  toxinkoncentráció mellett az oldalgökörek számának növekedését tapasztaltuk. Magasabb CYN koncentráció mellett az epikotil kismértékű, valamint a főgyökér növekedés szignifikáns gátlását figyeltük meg  $5\text{-}20 \mu\text{g ml}^{-1}$  koncentráció tartományban. Az oldalgökörek fejlődésének enyhe gátlását tapasztaltuk  $10\text{-}20 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN kezelések során (11. a-c ábra). Magas,  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  cianotoxin koncentráció a gyökerek barnulását okozta, amely nekrozisra utal (11. f ábra). 3 napos kezelések során, amikor a növényeket sötétben neveltük, az epikotil és a főgyökér elongáció esetében nem volt megfigyelhető a stimuláló hatás, de  $5\text{-}10 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentráció hatására a főgyökér növekedésének gátlása volt megfigyelhető. A toxin az oldalgökörek fejlődését stimulálta  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  és kismértékben gátolta az oldalgökörek kialakulását  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  koncentrációban (11. d és e ábra).

*V. faba* „ARC Egypt Cross” fajta esetében szintén megvizsgáltuk a CYN növekedésre gyakorolt hatását fényen nevelt növények esetében. Az epikotil elongáció esetében csak gátló hatást tapasztaltunk mind 3, mind pedig 6 napos kezelések során. Szignifikáns gátlás volt megfigyelhető mindkét kezelési időtartamban  $\geq 1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására. A főgyökér

elongációban 3 napos kezelések során enyhe növekedés gátlás volt megfigyelhető  $\geq 5 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentráció esetében, viszont a 6 napos kezelések során a „Standard” fajtához hasonlóan kettős válaszreakció volt megfigyelhető.  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN stimulálta a főgyökér növekedését, míg  $\geq 5 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN gátló hatást fejtett ki (11. g és h ábra).

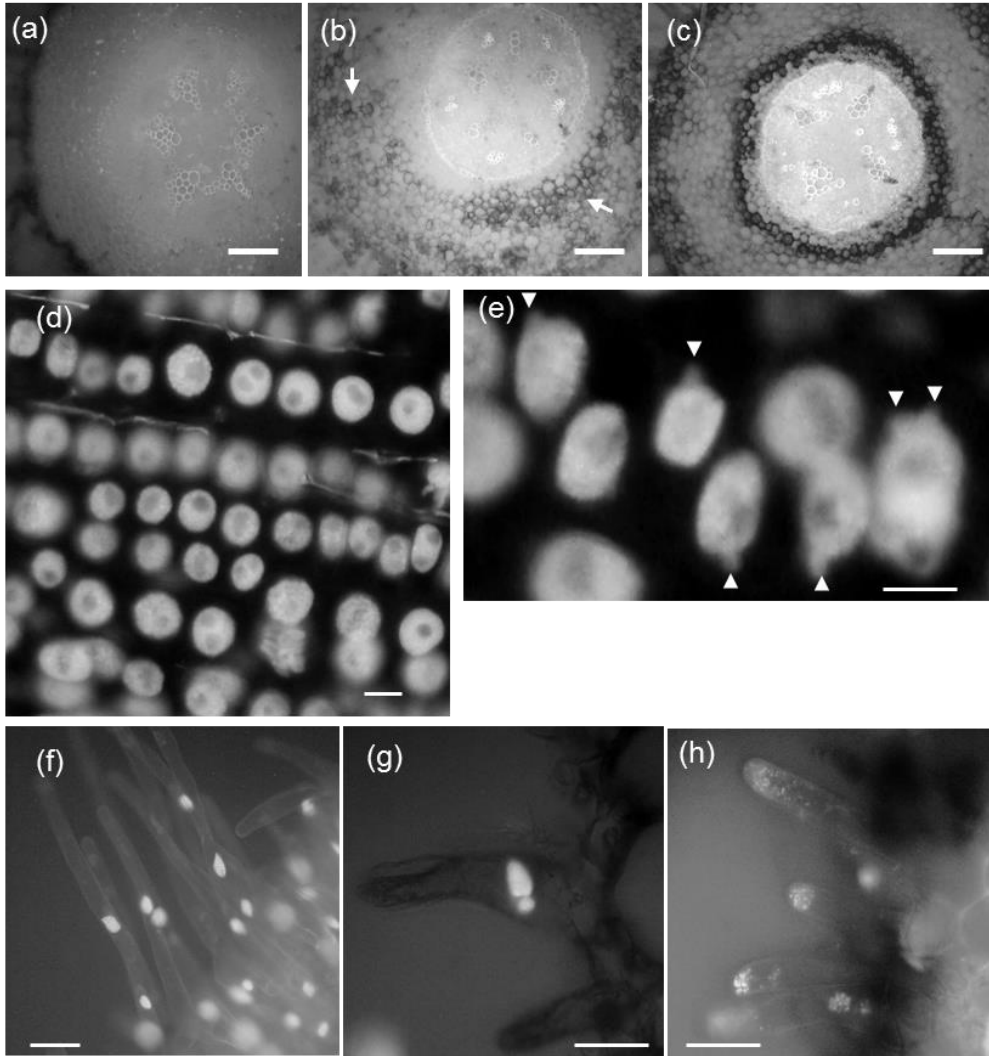


**11. ábra:** CYN hatása a 3 és 6 napos kezelések során a *V. faba* csíranövények növekedésére. (a és b) CYN hatása az epicotil és főgyökér növekedésére és az (c) oldalgökökerek fejlődésére folyamatos fényen nevelt *V. faba* „Standard” fajta esetében. (d) az epicotil és főgyökér növekedésére és az (e) oldalgökökerek fejlődésére kifejtett hatás sötétben nevelt *V. faba* „Standard” fajta esetében (3 napos). (f) Folyamatos fényen nevelt *V. faba* „Standard” fajta morfológiája: Kontroll és  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN, 6 napos kezelés. Lépték = 10 mm. Jól látható a CYN kezelt gyökerek nekrozisa. (g) Epicotilra és a (h) főgyökérra kifejtett hatás folyamatos megvilágítás mellett *V. faba* „ARC Egypt Cross” fajta esetében. \* Szignifikáns különbség a kontroll és a CYN kezelések között,  $P < 0,05$ .

#### **4.6. A CYN hisztológiai és citológiai hatása különböző állandósult szövetekben és interfázisos merisztéma sejtekben**

A főgyökerekből készített keresztmetszetek vizsgálata során a kontroll növényekben a gyökér normális anatómiája volt megfigyelhető, valamint a kétszikűekre jellemző másodlagos gyökérvastagodás (12. a ábra). 3 napos CYN kezelések hatására nem találtunk szöveti nekrozisokat, sem a rizodermiszben, sem a mélyebb szövetekben. 6 napos kezelések hatására viszont nekrozis volt megfigyelhető minden toxinkoncentráció esetén. 0,1-5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentráció tartományban a gyökér kéregszöveteiben nekrotikus foltok jelentek meg (12. b ábra), míg 10-20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentráció tartományban a toxin egy vagy két folyamatos nekrotikus gyűrű kialakulását indukálta a gyökér cortexben és a rizodermiszben (12. c ábra). A CYN nekrotikus hatása mindkét lóbab fajta esetében megfigyelhető volt.

Az interfázis merisztéma sejtek vizsgálata során nem tapasztaltunk elváltozásokat a kontroll növényekben, amelyek normális sejtmag morfológiát mutattak (12. d ábra). Ezzel ellentétben minden CYN koncentrációnál megfigyelhetőek voltak a sejthalálra jellemző nukleusz morfológia változások („nuclear blebbing”) a kezelés időtartamától és a fényviszonyoktól függetlenül mindkét *V. faba* fajta esetében (12. e ábra). A gyökérszőrők vizsgálata során a kontroll növényeket normál kromatin organizáció jellemezte (12. f ábra). 6 napos kezelések alatt magas CYN koncentrációknál (10-20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) megfigyelhető volt a sejtmag részleges, majd pedig teljes fragmentációja (12. g és h ábra).



**12. ábra:** (a-h) Fluoreszcens mikroszkóppal detektált CYN indukálta sejthalál *V. faba* „standard” fajta gyökereiben (gerjesztési hullámhossz: 320-360 nm). (a-c) Főgyökér keresztmetszet 6 napos folyamatos fényen nevelt növényeknél (autofluoreszcencia). (a) Kontroll gyökér; (b)  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN kezelés, nekrotikus szövetek (nyíl); (c)  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN kezelés, folyamatos nekrotikus gyűrű a rizodermiszben és a kortexben. (d és e) Oldalgöyökér csúcs apikális merisztéma sejtjei sötétben nevelt növényeknél (3 napos kezelés), DNS jelölés DAPI-val. (d) Kontroll; (e)  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN kezelés, sejtmagi elváltozások megjelenése (nyílhegyek). (f-h) oldalgöyökér szőrök 6 napos folyamatos fényen nevelt növények esetében. (f) Kontroll gyökérszőr intakt sejtmaggal; (g) sejtmag degradáció  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN jelenlétében; (h) sejtmag fragmentáció  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN jelenlétében. Lépték:  $300 \mu\text{m}$  (a-c),  $5 \mu\text{m}$  (d, e),  $100 \mu\text{m}$  (f-h).

#### 4.7. CYN hatása a kromoszóma morfológiára

Kontroll *V. faba* oldalgyökerekből készült kromoszóma preparátumokban jól megfigyelhető egy metacentrikus és öt akrocentrikus kromoszómapár a merisztéma szövetekben (13. a ábra, Fuchs és mtsai, 1998). Ezekben a növényekben a metafázisos kromoszómák csak kis százalékában volt megfigyelhető kromoszóma törés (3.44 ±0.54%). CYN hatására viszont a kromoszóma törések gyakorisága megnőtt mindkét fajta esetében a kísérlet időtartamától (3 és 6 nap) és a fényviszonyoktól függetlenül (13. b ábra). 0.1-5 µg ml<sup>-1</sup> CYN koncentráció tartományban a kromoszóma törések száma 2,7-szeresére emelkedett (9,3±1,12%) a kontroll növényekhez viszonyítva. A kromoszóma preparátumok elkészítésénél *V. faba* „Standard” fajtát használtunk.



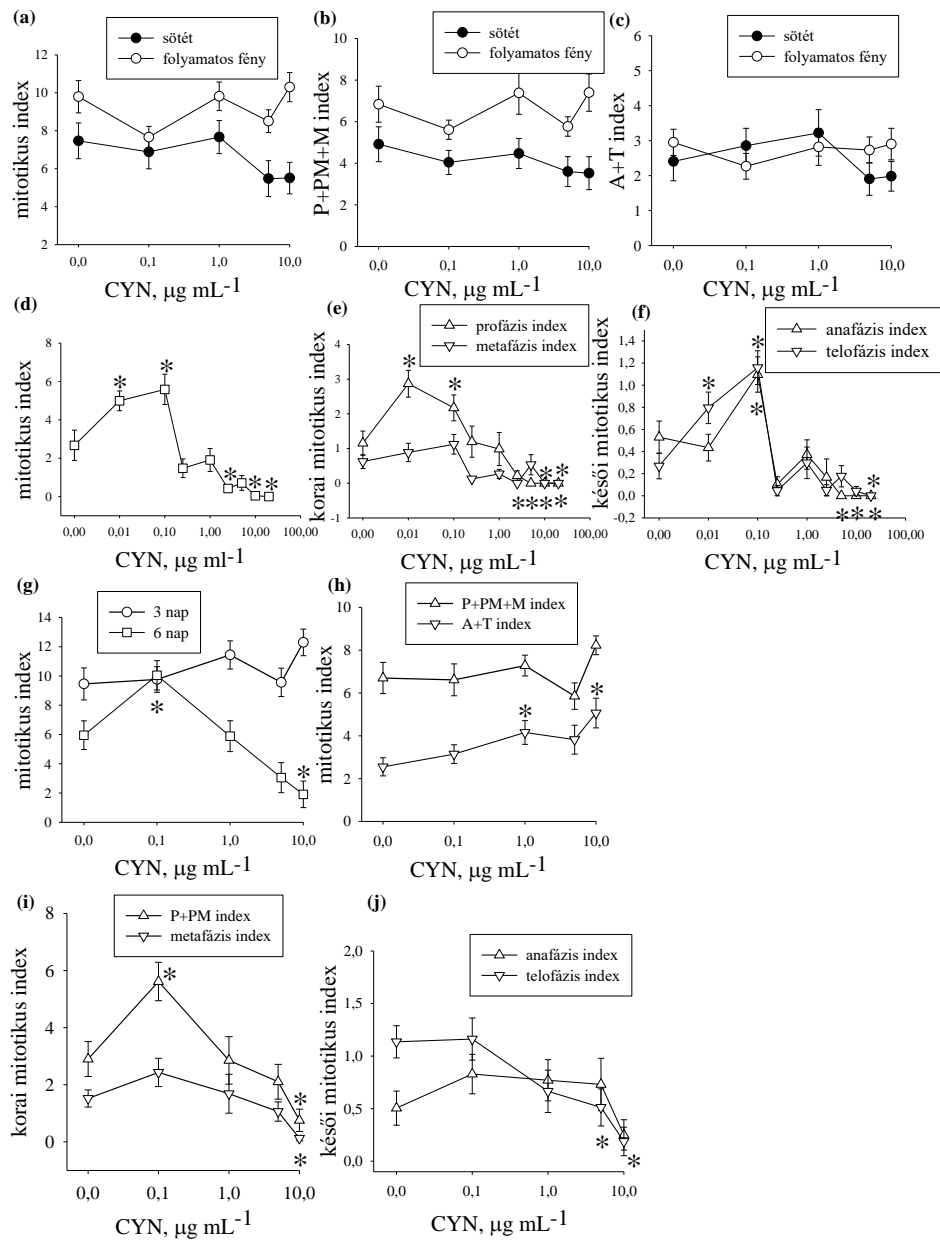
**13. ábra:** *V. faba* „Standard” oldalgyökér csúcsok szétterült kromoszómái (a és b). (a) Kontroll; (b) 5 µg ml<sup>-1</sup> CYN (3 nap, sötétben nevelt) hatására bekövetkező kromoszóma törés (nyíl). Lépték: 5 µm (a, b).

#### 4.8. CYN hatása a mitotikus aktivitásra és a preprofázis kötegre (PPB) nem szinkronizált merisztéma sejtekben

A növények mitotikus aktivitásának vizsgálata során *V. faba* „Standard” fajta esetében a kontroll mitotikus aktivitás magasabb volt a folyamatos fényen nevelt növények esetében (14. a-c ábra). 3 napos CYN

kezelések hatására sem a fényen, sem pedig a sötétben nevelt növények esetében nem volt szignifikáns változás a teljes mitotikus indexben. A korai (P+PM+M) illetve kései (A+T) mitotikus indexben sem volt megfigyelhető szignifikáns változás egyik CYN koncentráció esetében sem. (14. a-c ábra). 6 napos kezeléseknél viszont a teljes mitotikus indexben  $0,01-1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentráció tartományban a mitotikus aktivitás emelkedése figyelhető meg. Ez a tendencia a korai és a késői mitotikus indexben is megfigyelhető. Magas toxin koncentráció esetén ( $2,5-20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) pedig elég erős, nagyrészt szignifikáns gátló hatást figyeltünk meg. Az alacsony toxinkoncentráció tartományban detektált szignifikáns serkentő hatás a metafázisos sejtek arányának növekedésében nem mutatkozott meg (14. d-f ábra).

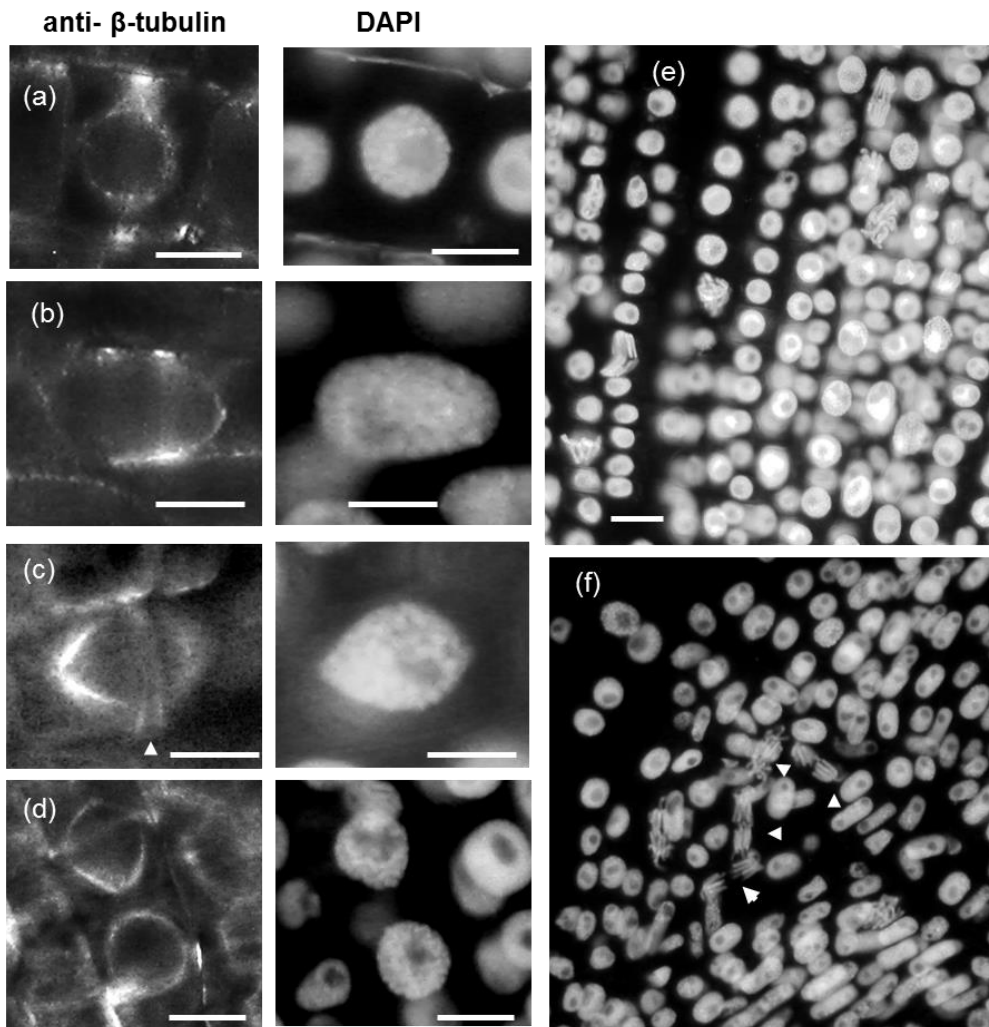
*V. faba* „ARC Egypt Cross” fajta esetében a mitotikus aktivitást csak folyamatos fényen nevelt növények esetében vizsgáltuk meg. 3 napos kezeléseknél a CYN nem váltott ki szignifikáns változást a teljes mitotikus aktivitásban és a korai mitotikus aktivitásban, de a késői mitotikus aktivitásban  $1$  és  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentrációnál szignifikáns emelkedés volt tapasztalható (14. g és h ábra). 6 napos CYN kezelés hatására  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentrációnál szignifikáns emelkedés volt tapasztalható a teljes mitotikus indexben illetve a profázisos sejtek arányának emelkedésében is. A metafázisos és anafázisos sejtek aránya ugyan kis mértékben növekedett, de ez nem bizonyult szignifikánsnak. A telofázisos sejtek arányában nem volt kimutatható változás ennél a toxinkoncentrációnál.  $5-10 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására a telofázisos sejtek aránya szignifikáns csökkenést mutatott. A teljes mitózis, valamint azon belül a profázisos, a metafázisos és az anafázisos szignifikáns gátlása csak a  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentráció esetén volt megfigyelhető (14. g, i és j ábra).



**14. ábra:** CYN hatása a mitotikus aktivitásra *V. faba* oldalgyökér csúcs merisztéma sejtekben. (a-f) *V. faba* „Standard”: (a-c) 3 napos CYN kezelés; (d-f) 6 napos CYN kezelés folyamatos megvilágítás mellett. (g-j) *V. faba* „ARC Egypt Cross” CYN kezelés folyamatos megvilágítás mellett: (g) totál mitotikus index 3 és 6 napos CYN kezelés során; (h-j) a totál mitotikus index osztódási fázisonkénti lebontása: (h) 3 napos CYN kezelés; (i és j) 6 napos CYN kezelés. Rövidítések: P – profázis; PM – prometafázis; M – metafázis; A – anafázis; T – telofázis. \*Szignifikáns különbségek a kontroll és kezelt növények között,  $P < 0,05$ .

A mikrotubulusok szerveződését a sejtciklus késői G2/profázis átmenetében vizsgáltuk. Az itt jelenlévő mikrotubuláris struktúra a preprofázis köteg (PPB). A kontroll növények vizsgálata során nem tapasztaltunk rendellenességet a PPB kialakulásában és a perinukleáris mikrotubulusok szerveződésében. A PPB-k a sejt egyenlítői síkjában helyezkedtek el az esetek majdnem 100%-ban (15. a ábra). CYN kezelések hatására rendellenes PPB-k kialakulása volt megfigyelhető (15. b-d ábra). Három különböző rendellenes PPB struktúrát tudunk elkülöníteni a toxin hatására: (1) dupla PPB-k, erről akkor beszélünk, amikor 2 egymástól jól elkülöníthető PPB helyezkedik el egy sejtben; (2) hasadt PPB-ről akkor beszélünk, ha a sejt egyik oldalán a PPB egy mikrotubulus köteget alkot, míg a sejt másik oldalán két jól elkülöníthető mikrotubulus köteg található; (3) aszimmetrikus PPB, ebben az esetben egyetlen mikrotubulus kötegből áll a PPB, de a sejtmaghoz képest az elhelyezkedése excentrikus. A rendellenes PPB-k kialakulása  $1-10 \mu\text{g ml}^{-1}$  toxinkoncentráció tartományban volt megfigyelhető mindkét lóbab fajta esetében a kezelés időtartamától és a megvilágítástól függetlenül.

Megvizsgáltuk a sejtosztódási mintázatokat is az oldalgöyökér csúcsok merisztéma szöveteiben. Kontroll oldalgöyökér csúcsok merisztéma régiójában normál sejtosztódási mintázatot figyeltünk meg, itt a sejtek osztódási síkja a hosszanti növekedés irányára merőleges volt (15. e ábra). Ezzel szemben,  $5-10 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN kezelés hatására megváltozott sejtosztódási síkokat figyeltünk meg. A szomszédos osztódó sejtek az antiklinális és periklinális osztódás véletlenszerű mintázatát mutatták (15. f ábra).

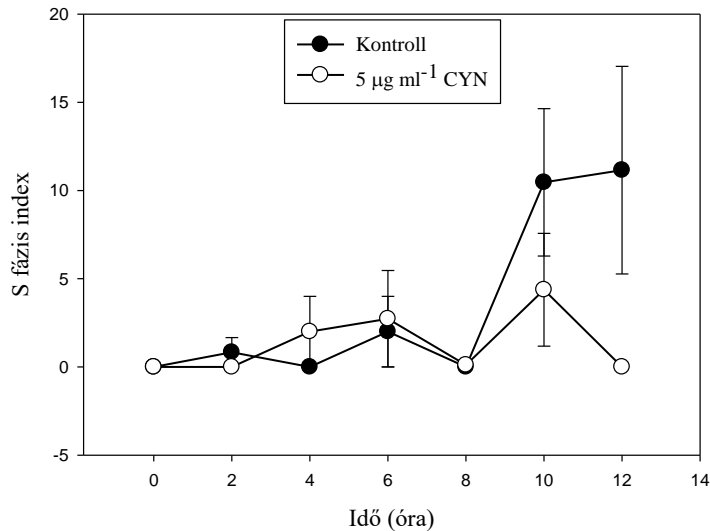


**15. ábra:** CYN hatása a preprofázis kötegek (PPB-k) organizációjára és a perinukleáris mikrotubulus kötegekre, valamint az osztódási sík orientációjára. (a-d) A mikrotubulusok jelölése anti- $\beta$ -tubulin antitesttel és a kromatin jelölése DAPI-val; (e és f) kromatin jelölése DAPI-val. (a) Normál PPB formáció a kontroll oldalgökér csúcsban (*V. faba* „Standard”) 3 napos sötétben nevelt növényeknél; (b) dupla PPB, 3 napos kezelés sötétben, („Standard”)  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására; (c) hasadt PPB (a nyílhegy mutatja a hasadás helyét), 6 napos kezelés, folyamatos fényen nevelt növények,  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására; (d) két egymás melletti sejt aszimmetrikus PPB-vel, 3 napos kezelés, folyamatos megvilágítás,  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására („Standard”); (e) kontroll merisztéma szövet oldalgökérből, 6 napos kezelés, („ARC Egypt Cross”); (f) megváltozott osztódási síkok (nyílhegyek) az „ARC Egypt Cross” oldalgökérében, 6 napos kezelés folyamatos megvilágítás mellett,  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására. Lépték:  $5 \mu\text{m}$  (a-d),  $10 \mu\text{m}$  (e és f).

#### **4.9. *In vivo* és *in vitro* DNS szintézis vizsgálatok**

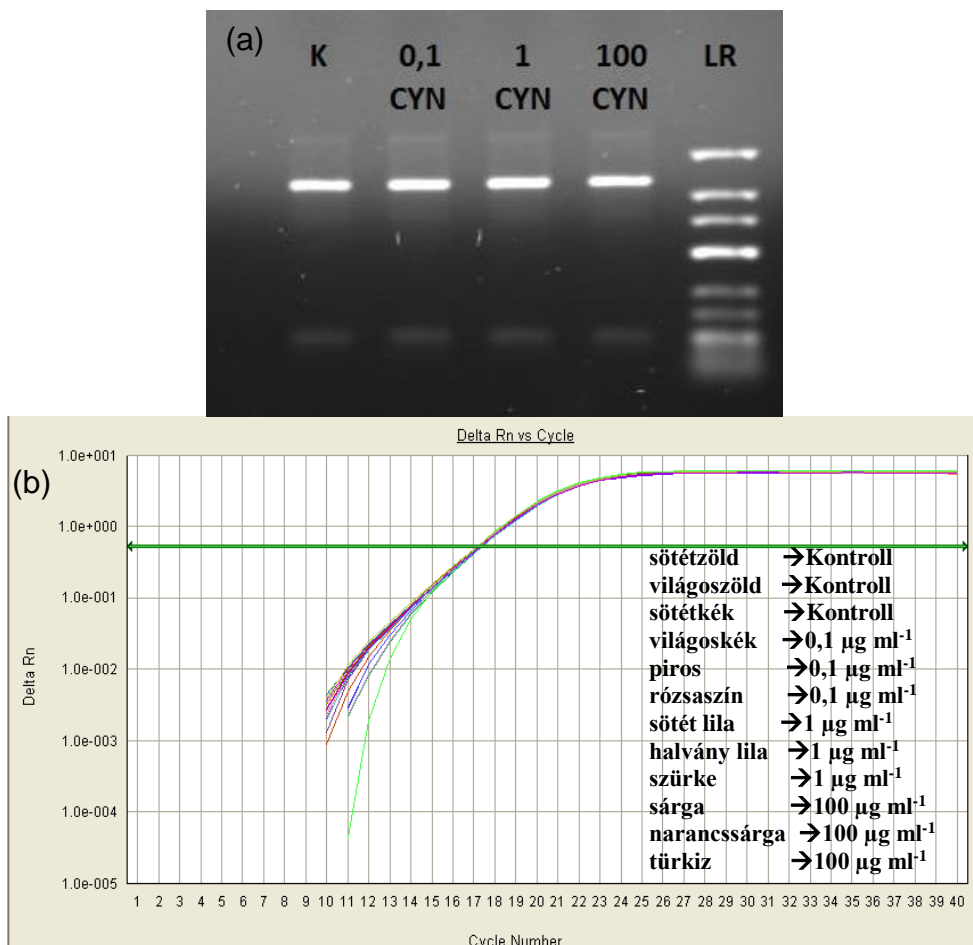
Mivel a fentiekben leírt eredmények azt mutatják, hogy a CYN gátolja a sejtek mitózisba való belépését nem szinkronizált *V. faba* „Lippói fajta” csíranövényekben, úgy gondoltuk, hogy az S fázisban bekövetkező DNS szintézis gátlása áll a háttérben. Mivel a CYN uracil származékot tartalmaz, interferálhat ezzel a folyamattal. Ennek vizsgálatára BrdU-t használtunk. A BrdU az öt felismerő ellenanyaggal együtt a DNS szintézis kimutatására alkalmas hisztokémiai jelölő anyag. A kísérleteket  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentrációval végeztük el.

A kísérlet során vizsgáltuk az S-fázis indexben bekövetkező változásokat CYN hatására, ahol látható, hogy a kontroll növények esetében a HU kimosása után 8 órával az S-fázisban lévő sejtek száma folyamatosan növekszik, míg az  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására nem történt jelentősebb változás az S-fázisos sejtek számának növekedésében a HU kimosása után 12 órával sem (16. ábra). Összességében, eredményeink arra utalnak, hogy a CYN nemcsak a mitózis elindulását, hanem az S-fázis elindulását is késlelteti, aminek oka lehet a G1/S átmenet vagy a DNS szintézis elindulásának gátlása, amelyben szerepet játszhat a CYN fehérjeszintézis gátló hatása.



**16. ábra:** Szinkronizált (HU) *V. faba* csíranövények S-fázis indexe. HU kimosása után S-fázisban lévő sejtek.

*In vitro* körülmények között is megvizsgáltuk a CYN DNS szintézisre gyakorolt hatását. A kísérletek során 0,1, 1, 10 és 100 µg ml<sup>-1</sup> CYN koncentrációkat használtunk. Mivel a CYN nem érzékeny a magas hőmérsékletre, így PCR és qPCR reakcióban próbáltuk kimutatni a DNS szintézisében bekövetkezett változásokat. A PCR (17. a ábra) és a qPCR (17. b ábra) eredményeket figyelembe véve nem tapasztaltunk szignifikáns változást a képződött DNS mennyisége között. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CYN *in vitro* körülmények között nem gátolja a DNS szintézist.



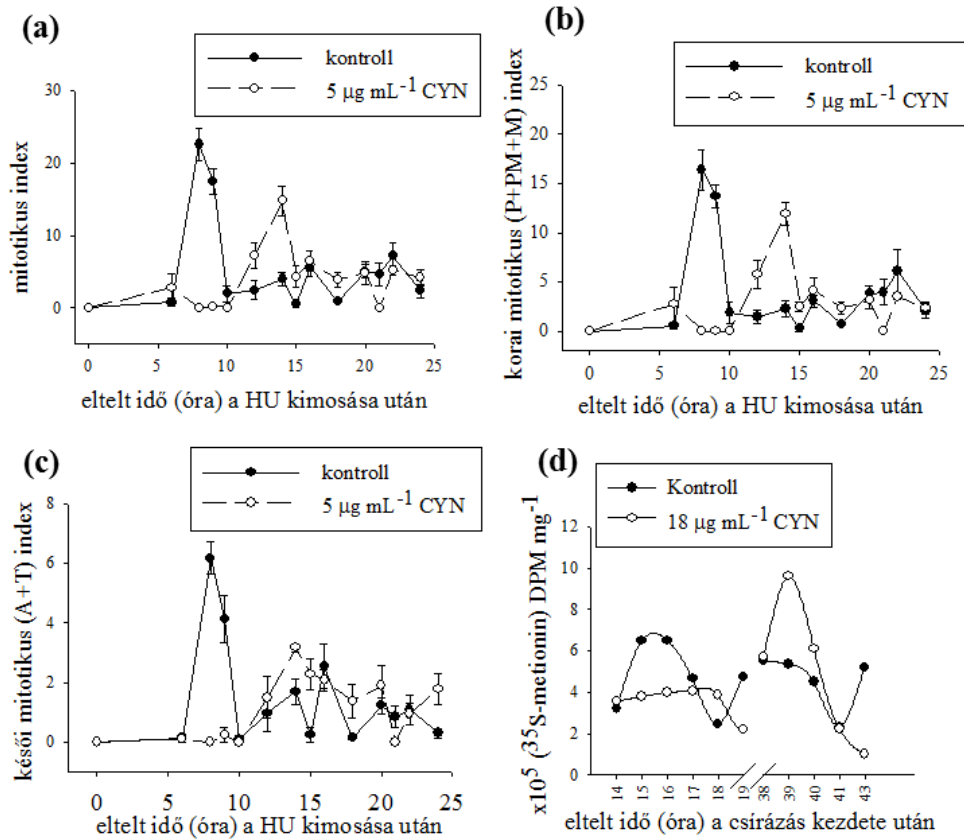
**17. ábra:** In vitro DNS szintézis vizsgálatok. (a) PCR reakció során keletkezett termék agaróz gélelektroforézise (a DNS-t etídium-bromiddal detektáltuk); (b) qPCR eredmények. Mindkét esetben 0,1, 1 és 100 µg ml<sup>-1</sup> CYN koncentrációt alkalmaztunk.

#### 4.10. A CYN rövidtávú hatása a mitózisra és a protein szintézisre

A szinkronizált kontroll *V. faba* oldalgyökércsúcs merisztéma sejtek maximális mitotikus aktivitása a hidroxiurea (HU) kimosása után 8-9 órával volt megfigyelhető, ami egybeesett a korai és késői mitózisban lévő sejtek maximális százalékos arányával. A korai mitotikus index a profázisban, prometáfázisban és metafázisban lévő sejtek százalékos arányából, míg a

késői mitotikus index az anafázisban és telofázisban lévő sejtek százalékos arányából állt össze (18. a-c ábra). A szinkronizálás során  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentrációt használtunk.  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN általánosan késleltette a mitózist, amely megfigyelhető volt a teljes mitózisban illetve a korai és késői mitotikus indexben is. A CYN hatására a maximális mitotikus aktivitás a teljes mitotikus és a korai mitotikus indexben a HU kimosás után 12-14 órával következett be. A késői mitotikus index maximális csúcsa pedig a HU kimosás után 12-18 órával volt detektálható. A CYN hatására nem csak késlekedett a késői mitózis el, hanem az időtartama is meghosszabbodott (18. a-c ábra). Szinkronizált *Sinapis alba* (fehér mustár) esetén  $18 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN hatására hasonló mitózis késleltetést tapasztaltunk (az adatokat itt nem mutatjuk be).

Vasas Gábor és munkatársai nem szinkronizált *Sinapis alba* fiatal gyökerek *de novo* fehérjeszintézis vizsgálatához pulzus jelölést használtak  $^{35}\text{S}$ -metioninnal. A vizsgálat során kiderült, hogy a *de novo* fehérjeszintézis 2 csúcst (maximumot) mutatott a vizsgálat időtartama alatt (43 óra) kontroll növényekben. A fehérjeszintézis első ciklusának maximális *de novo* fehérjeszintjei 15-16, a második ciklusának maximális szintje pedig 38-39 órával a csírázás kezdete után voltak megfigyelhetőek (18. d ábra).  $18 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN esetében 50% növekedés gátlást figyeltek meg *Sinapis alba* csíranövények esetében (Vasas és mtsai, 2002), ami késleltette a fehérjeszintézist ebben az intervallumban. A kezelés során szintén 2 csúcs volt megfigyelhető a fehérjeszintézisben. A CYN kezelt növényekben az első ciklus során erőteljes gátló hatás volt megfigyelhető a fehérjeszintézisben a kontrollhoz képest, melynek csúcsa a csírázás után 16-18 órával következett be. A második ciklusban a fehérjeszintézis maximális értéke a csírázás után 39-40 órával volt megfigyelhető, de az első ciklussal ellentétben itt a fehérjeszintézis mértéke erőteljesen emelkedett (18. d ábra).



**18. ábra:** CYN hatása a sejtosztódásra és a fehérje szintézisre. (a-c) a mitotikus index időbeli lefutása szinkronizált *V. faba* „ARC Egypt Cross” oldalgyökér csúcs merisztémában. A szinkronizálást hidroxipiureával (HU) végeztük. (d) *Sinapis alba* fehérjeszintézisének időbeli lefutása. A pulzus jelölés <sup>35</sup>S metioninnal történt. Rövidítések: P – profázis; PM – prometafázis; M – metafázis; A – anafázis; T – telofázis.

## 5. Az eredmények megbeszélése

### 5.1. MCY-LR

Vizsgálataink során széles skáláját detektáltuk a MCY-LR által okozott mitotikus osztódási orsó rendellenességeknek *V. faba* oldalgyökér csúcsok merisztéma szövetében. Nincs más ismert protein foszfatáz gátló, amely ilyen sokféle változást idéz elő a mikrotubulusok szerveződésében (5. táblázat). Ezek a mitotikus orsó elváltozások idő- és MCY-LR dóziszfüggő módon jelentkeztek a *V. faba* csíranövényekben (9. a és b ábra). Általában, a 2 napos kezelések hatására az osztódási orsó rendellenességek százalékos aránya alacsonyabb volt, mint a 6 napos kezelések során valamint számos osztódási orsó rendellenesség nem volt kimutatható ebben a szakaszban. Ilyenek voltak: a poláris mikrotubulusok erőteljes kötegelése, a multipoláris orsók az erősen kötegelt kinetokor mikrotubulusokkal, a mitotikus orsó mellett megjelenő további mikrotubuláris (orsó) struktúra és az anafázis egyenlítői síkjában látható kinetokor kötegek (3. és 4. táblázat összehasonlítása, anomáliák b, d, h, i). 2 napos kezelési időtartamban  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására csak szétesett osztódási orsók voltak kimutathatóak.  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására 2 (szétesett és monopoláris orsó), míg  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR hatására már 7 (szétesett, tripoláris/multipoláris, monopoláris, hiányos, C- és S-alkú valamint aszimmetrikus osztódási orsó) osztódási orsó rendellenesség volt kimutatható (3. táblázat). 6 napos cianotoxin kezelés során alacsonyabb toxin koncentráció ( $0,1-5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) 1-4 fajta (szétesett, további poláris mikrotubulus köteg, tripoláris/multipoláris, további mikrotubuláris orsó struktúra) osztódási orsó rendellenességet indukált. Magasabb koncentrációban  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR 8 féle, míg  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR 6 féle mitotikus orsó rendellenességet váltott ki (4. táblázat). Ez azt jelenti, hogy bizonyos rendellenességek (hiányzó kinetokor szálak, C- és S alakú orsók, egyenlítői kinetokor szálak, aszimmetrikus orsók) csak nagy

koncentrációjú cianotoxin jelenlétében jelennek meg, ahol a PP1 és PP2A aktivitás majdnem teljes gátlása figyelhető meg (4. táblázat, 9. c ábra). Így a 2 és 6 napos kezelések során a rendellenesen kialakuló osztódási orsók száma növekedett a cianobakteriális toxin koncentrációjának növelésével (3. és 4. táblázat). A multipoláris orsók erősen kötegelt kinetokor mikrotubulusokkal, illetve a további poláris mikrotubulus (orsó) kötegek csak 6 napos (hosszú távú) kezelések során jelentek meg alacsony toxinkoncentráció ( $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR) jelenlétében, ahol a protein foszfatáz aktivitás gátlása  $22 \pm 3\%$  volt. A szétesett és multipoláris orsók a toxin koncentráció széles skálájában megfigyelhetőek voltak (4. táblázat). Összességében az orsó rendellenességek azon MCY-LR koncentrációknál ( $0,1-20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) jelentkeztek, ahol a protein foszfatáz (PP1 és PP2A) aktivitás szignifikáns gátlása is megfigyelhető volt (9. ábra). Alacsonyabb toxin koncentráció ( $0,01 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) esetén sem osztódási orsó rendellenesség, sem pedig protein foszfatáz gátlás nem volt megfigyelhető (4. táblázat és 9. c ábra).

## 5. Táblázat PP1 és/vagy PP2A gátlás hatására bekövetkező osztódási orsó rendellenességek típusai

Orsó rendellenességek típusai	PP1/PP2A gátlók	Szervezet/sejt típus	Mitotikus fázis	Referencia
<b>a, szétesett orsó</b>	kantaridin <sup>a</sup> , fosztricin <sup>a</sup> , MCY-LR <sup>b</sup> ,	<i>Phragmites australis</i> , <i>V. faba</i> gyökér, A549 (emberi) sejtek, BHK-21 (emlős) sejtek	metafázis, anafázis	Beyer és mtsai, (2012); Cheng és mtsai, (1998); Manzanero és mtsai, (2002); Máthé és mtsai, (2009); Roberge és mtsai, (1994); jelen munka
<b>b, további poláris mikrotubulus kötegek<sup>c</sup></b>	MCY-LR <sup>b</sup>	<i>V. faba</i> gyökér	metafázis	jelen munka, Garda és mtsai, 2016
<b>c, Tripoláris/multipoláris orsó</b>	kantaridin <sup>a</sup> , kalikulin A <sup>b</sup> , endothall <sup>a</sup> , fosztricin <sup>a</sup> , okadainsav <sup>a</sup> , MCY-LR <sup>b</sup>	<i>P. australis</i> , <i>V.faba</i> gyökér, alfalfa sejt szuszpenzió, CHO K1 sejtek, A549 (human) sejtek, emberi leukémiás sejtek, LLC-PK (emlős) sejtek, GH <sub>4</sub> (emlős) sejtek	prometafázis, metafázis, anafázis	Ayaydin és mtsai, (2000); Bonness és mtsai, (2006); Cheng és mtsai, (1998); Lankoff és mtsai, (2003); Máthé és mtsai, (2009); Sakurada és mtsai, (1992); Van Dolah és Ramsdell (1992); Vandré és Wills (1992); jelen munka
<b>d, multipoláris orsók kinetokor mikrotubulusainak túlzott kötegelése<sup>c</sup></b>	MCY-LR <sup>b</sup>	<i>V. faba</i> gyökér	metafázis	jelen munka, Garda és mtsai, 2016
<b>e, monopoláris orsó</b>	MCY-LR <sup>b</sup>	<i>V. faba</i> gyökér, CHO K1 sejtek	metafázis	Beyer és mtsai, (2012); Lankoff és mtsai, (2003); jelen munka
<b>f, hiányos orsó (hiányzó kinetokor szálak)<sup>c</sup></b>	MCY-LR <sup>b</sup>	<i>V. faba</i> gyökér	metafázis, anafázis	jelen munka, Garda és mtsai, 2016
<b>g, eltorzult (C- vagy S-alakú orsók)<sup>c</sup></b>	okadainsav <sup>a</sup> , MCY-LR <sup>b</sup>	<i>V. faba</i> gyökér, LLC-PK (emlős) sejtek	metafázis	Vandré és Wills (1992); jelen munka
<b>h, további orsó a sejtben<sup>c</sup></b>	MCY-LR <sup>b</sup>	<i>V. faba</i> gyökér	metafázis	jelen munka, Garda és mtsai, 2016
<b>i, egyenlítői kinetokor kötegek<sup>c</sup></b>	MCY-LR <sup>b</sup>	<i>V. faba</i> gyökér	metafázis	jelen munka, Garda és mtsai, 2016
<b>j, asszimmetrikus (egyenlőtlen) orsó</b>	MCY-LR <sup>b</sup>	<i>P. australis</i> , <i>V.faba</i> gyökér	metafázis, anafázis	Máthé és mtsai, (2009); jelen munka
<b>k, instabil orsó</b>	calyculin A <sup>b</sup>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	nem definiált	Schlaitz és mtsai, (2007)

<sup>a</sup>főleg PP2A gátló; <sup>b</sup>PP1 és PP2A gátló; <sup>c</sup>csak a jelen munkában figyeltük meg, mint MCY-LR hatás

A fenti eredmények arra utalnak, hogy kapcsolat van a PP1 és PP2A aktivitás gátlása, illetve a mitotikus orsó rendellenes kialakulása között. Azonban, 1 napos kezelések során a MCY-LR nem indukálta a mitotikus orsó dezorganizációját, viszont a PP1 és PP2A aktivitás szignifikáns gátlása volt megfigyelhető  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  vagy magasabb MCY-LR koncentráció hatására (9. c ábra). Rövid távú (maximum 24 óra) cianotoxin tesztek során ismert, hogy a MCY-LR indukál más mitotikus változásokat, mint például a hiszton-H3 hiperfoszforilációját és a kromoszómák hiperkondenzációját *V. faba* csíranövényekben (Beyer és mtsai, 2012). Tehát úgy tűnik, hogy csak a hosszú távú protein foszfatáz gátlás okoz mikrotubuláris elváltozásokat modellnövényünkben. Több szerző tárgyalta már a MCY-LR által indukált oxidatív stressz hatását, amely szintén lehetséges okozója lehet a mikrotubuláris struktúrák rendellenességeinek az állati sejtekben (Ding és mtsai, 2001; Jiang és mtsai, 2011). A ROS felhalmozódása is indukálhatja a multipoláris orsók kialakulását és a mitotikus mikrotubulusok destabilizációját (Wang és mtsai, 2013). Ebből adódóan, kerestük a kapcsolatot a MCY-LR által indukált oxidatív stressz és a mitotikus mikrotubulusok zavara között *V. faba* csíranövényekben. DCFH-DA jelöléssel nem tudtunk kimutatni jelentős ROS növekedést a kezelések hatására *V. faba* oldalgöyökér csúcsokban, függetlenül a MCY-LR koncentrációjától és a kezelés időtartamától (10. a ábra). Viszont a kezelések alatt szignifikáns emelkedését mutattuk ki a ROS eliminálásában résztvevő enzimeknek, mind a POD, mind pedig a CAT aktivitásában (10. b és c ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a modellnövénynek használt *V. faba* képes hatékonyan védekezni a MCY-LR által indukált ROS ellen. Több szerző szerint vannak olyan lóbab fajták, amelyek több másodlagos metabolitot (fenolos anyagok, vicin, divicin) termelnek, amelyek segítségével hatékonyan tudják a ROS-t eliminálni (El-Maksoud és mtsai, 2013; Shetty és

mtsai, 2002). Az MCY-LR oxidatív stresszt indukál állatokban és növényekben, beleértve a vízinövényt is, valamint ezen kitettség alatt sokkal fogékonyabbak lesznek a ROS akkumulációjára (Pflugmacher, 2002; Campos and Vasconcelos, 2010). A kísérleteinkben használt *V. faba* fajta úgy tűnik, hogy ellenáll az oxidatív stressznek. Ezért az általunk detektált mikrotubuláris rendellenességek szempontjából kizárható a MCY-LR által okozott oxidatív stressz. A *V. faba* kiváló modellnövény lehet a MCY-LR által indukált protein foszfatáz gátlás tanulmányozására citológiai viszonylatban, mivel ebben a növényben a ROS indukáló hatása nem érvényesül.

Mindent összevetve ezek az eredmények arra utalnak, hogy ténylegesen a hosszú távú protein foszfatáz gátlás az elsődleges oka a mitotikus mikrotubulusok rendellenességeinek *V. faba* csíranövényekben. Ezt bizonyítja az is, hogy 1 napos kezelések hatására nem találtunk osztódási orsó rendellenességet annak ellenére sem, hogy  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR kezelés során a protein foszfatázok aktivitásának majdnem teljes gátlása volt megfigyelhető. Ezzel szemben 2 napos kezelések során  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR okozza a legtöbb mitotikus orsó rendellenességet, ahol szintén megfigyelhető a totál PP1 és PP2A aktivitás közel teljes gátlása. Továbbá nem mutattunk ki szignifikáns emelkedést a ROS szintben MCY-LR kezelése hatására, valamint az AsA sem csökkentette a mitotikus orsó rendellenességek számát annak ellenére, hogy hosszú távon erős antioxidáns hatást fejt ki, ezzel megakadályozva a ROS indukciót (Thompson és mtsai, 1987). Conklin (2001) leírta, hogy a külsőleg adott AsA kedvező hatással van a sejtciklus előrehaladására. Amikor az AsA egyik perkurzorát használták dohány BY-2 sejtekben, mitotikus aktivitás emelkedés volt megfigyelhető, viszont a dehidro-aszkorbinsav gátló hatású volt a mitózisra nézve (De Pinto és mtsai, 1999). Az a tény, hogy az AsA nem tudja megvédeni a sejteket a mitotikus

hibáktól, tovább bizonyítja, hogy a MCY-LR által indukált ROS-nak nincs szerepe jelen esetben a mitotikus orsó hibáinak a kialakulásában a modellnövényünkben. 6 napos kezelések (még hosszabb távú PP1 és PP2A gátlás) során több mitotikus orsó rendellenesség volt megfigyelhető, valamint a rendellenességek kialakulásának a gyakorisága is megnőtt a 2 napos kezelésekhez viszonyítva. Az általunk leírt osztódási orsó rendellenességek egy részét más protein foszfatáz gátlók (köztük a PP2A-ra preferenciálisan ható vegyületek) jelenlétében is megfigyelték (5. táblázat). Az 5. táblázat összefoglalja a különböző protein foszfatázok által kiváltott mitotikus orsó elváltozásokat, de a MCY-LR sokkal több mitotikus orsó rendellenességet okoz, mint más protein foszfatáz gátlók. Ismert, hogy a PP1 aktivitás gátlása megváltoztatja az osztódási orsó szerkezetét. Egy *Drosophila* mutánsban, amelyben egy PP1 izoenzim hiányzik, multipoláris orsók jelenlétét mutatták ki (Axton és mtsai, 1990). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PP1 és a PP2A is szerepet játszik az osztódási orsó polarításában és összeszerelődésében. A mi kutatócsoportunknak sikerült elsőként leírnia az osztódási orsóban kialakuló további poláris mikrotubulus kötegeket, a multipoláris orsók kinetokor mikrotubulusainak hiperkötegelését, a hiányos osztódási orsót, az osztódási orsó mellett megjelenő további mikrotubuláris (orsó) struktúrát és az anafázis egyenlítői síkjában megjelenő kinetokor szálkötegeket egy protein foszfatáz gátló hatására (5. táblázat). Összességében úgy tűnik, hogy a MCY-LR sokkal szélesebb körű osztódási orsó rendellenességet indukál, mint más protein foszfatáz gátlók, amely a protein foszfatázok komplex hatásával lehet kapcsolatban. A MCY-LR közel egyenlő mértékben gátolja a PP1 és a PP2A aktivitását (MacKintosh és Diplexcito, 2003).

Mint minden eukarióta sejtben, a növényekben is fontos szerepet játszanak a mikrotubulus asszociált fehérjék (MAP-ok) a mikrotubulusok

nukleációjának, stabilitásának, kötegelésének és orientációjának szabályozásában (Hamada, 2007). Régóta ismert, hogy a MAP-ok hiperfoszforilációja megváltoztatja a mikrotubulusok organizációját az eukarióta sejtekben (Maccioni and Cambiazo, 1995; Komis és mtsai, 2011), ami igaz a mitotikus és nem mitotikus növényi sejtekre is. A MAP65 fehérjecsald hiperfoszforilációja során károsodnak a mikrotubulusok által kialakított kapcsolatok, a mikrotubulusok kötegelése valamint organizációja is a mitózis alatt (Sasabe és mtsai, 2006; Smertenko és mtsai, 2006). Szerintünk a MCY-LR mint protein foszfatáz gátló befolyásolja azon MAP-ok foszforilációs állapotát, amelyek részt vesznek a mitotikus orsó összeszerelésében és ezáltal nagyszámú mitotikus orsó rendellenességet indukálnak a *V. faba* gyökércsúcs merisztéma szövetekben. Ismert az is hogy a protein foszfatáz gátlás megváltoztatja az osztódási orsó polaritását az eukarióta sejtekben. Schlaitz és mtsai (2007) leírták, hogy állati sejtekben a MCY-LR gátolja a centroszóma replikációját a mitózis elején. Ebből adódóan feltételezzük, hogy a MCY-LR megakadályozza az MTOC-k megfelelő működését, amely az osztódási orsó polaritásának kialakításában igen fontos szerepet tölt be. Ezáltal a MCY-LR által indukált monopoláris és multipoláris orsók kialakulásában szerepet játszhatnak a MAP-ok és MTOC-k működésében bekövetkezett változások is.

A mitotikus orsó dezorganizációja során a testvérkromatidák szegregációja sem lesz teljes (Kline-Smith and Walczak, 2004). Kutatócsoportunk egy régebbi tanulmányban leírta, hogy a MCY-LR késlelteti a metafázis-anafázis átmenetet, valamint monopoláris/multipoláris osztódási orsót és késlekedő kromoszómák képződését indukálja (Beyer és mtsai, 2012). A mitotikus orsó újabb kutatásai azt mutatják, hogy mind a kinetokor, mind pedig a poláris mikrotubulusok kiterjedt elágazásai részt vesznek az osztódási orsó stabilizálásában (Ambrose és Cyr, 2008). Ebből

adódóan a MCY-LR jelenlétében kialakuló poláris mikrotubulus kötegek és a kinetokor mikrotubulusok hiperkötegelése a metafázisos és anafázisos sejtekben befolyásolhatja az osztódási orsó stabilitását és megváltoztathatja a mitotikus osztódást. Valamint az anafázisban az egyenlítői síkon maradt kinetokor mikrotubulus kötegek késlekedő kromoszómákat eredményeznek (8. c ábra). Ezen túlmenően a monopoláris és hiányos orsók kialakulását gyakran kíséri a kromoszómák rozetta-szerű elrendeződése metafázisban, amikor is a centromerek központi irányultságúak, a kromoszóma karok pedig a periféria felé orientálódnak (7. d ábra). A kromoszómák rozetta-szerű elrendeződése gyakran együtt jár a kromoszómák hiperkondenzációjával, illetve a hibás testvérkromatida szegregációval (Nagele és mtsai, 1998; Beyer és mtsai, 2012).

A gyulai Bárdos-tavon kialakuló cianobakteriális vízvívágásból vett növényi minták vizsgálata bebizonyította, hogy a MCY-LR jelenléte a felszíni vizekben nem elhanyagolható még alacsony koncentrációban sem. Jelen esetben a toxin koncentrációja a vízben  $5,92 \mu\text{g L}^{-1}$ , míg a növényekben  $1,04 \mu\text{g g}^{-1}$  volt száraztömegre viszonyítva. A *C. submersum* minták vizsgálata során mind szövettani mind pedig citológiai vizsgálatokat is végeztünk. A szövettani vizsgálatok során kimutattuk a hajtáscsúcsok hosszának rövidülését, radiális duzzanatát valamint az oldalrügyek korai kialakulását a víztérben jelenlévő MCY-LR hatására. Máthé és munkatársai (2007) laboratóriumi körülmények között  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR kezelés hatására detektáltak nekrotikus foltokat *Phragmites australis* növények gyökereiben, amely a terepi *Ceratophyllum* mintákban is megfigyelhető volt a szárban (jelen munka). A laboratóriumi körülmények között észlelt nekrózis magas, míg a terepi mintákban észlelt nekrózis alacsony toxin koncentrációnál jelentkezett. A nekrotikus sejtekre jellemző volt a DNS tartalom teljes hiánya és egyes esetekben megfigyelhető volt a sejtmag

degradációja is. A citológiai vizsgálatok során vizsgáltuk a H3S10ph foszforilációs fokát a mitotikus fázisokban külön-külön. A H3S10ph hiperfoszforilációját csak a metafázisos sejtekben figyeltük meg, ami hibás testvérkromatida szegregációt eredményezhet. A pH3-Ser 10 foszforilációs foka a metafázisos sejtekben a kontrollhoz képest körülbelül 1,5-szeresére emelkedett. A kutatócsoportunk korábbi munkáiban igazolta, hogy a MCY-LR hatására bekövetkező H3 hiperfoszforiláció a kromatidák rendellenes szétválását eredményezi laboratóriumi körülmények között is *Vicia faba* modellnövényben (Beyer és mtsai, 2012). Ezek alapján feltételezhető, hogy a hosszú ideig tartó alacsony toxinkoncentráció hatására hasonló rendellenességek jelentkeznek, mint a rövid ideig tartó, de magas MCY-LR koncentrációnak kitett növényekben.

## 5.2. CYN

Az edényes növények növekedési válasza igen eltérő lehet CYN hatására. A CYN alacsony koncentrációban ( $0,1-0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) serkenti a növekedést vagy az oldalgöyökér fejlődést vízi makrofítákban és *Sinapis alba*-ban (Kinneer és mtsai, 2008; Beyer és mtsai, 2009; Máthé és mtsai, 2013). *V. faba* csíranövények esetében folyamatos megvilágítás mellett detektáltuk a CYN növekedésre gyakorolt átmeneti serkentő hatását különösen a göyökér növekedése során 6 napos kezeléseknél  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  toxin koncentráció mellett. Ez a tendencia mindkét általunk használt fajtában megfigyelhető volt. A  $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN koncentráció környezetvédelmi szempontból igen lényeges, mivel CYN termelő cianobaktérium fajok okozta vízvirágzások kapcsán mutattak ki ilyen koncentrációt édesvizekben (Kinneer és mtsai, 2008; Kinneer, 2010). A magasabb cianotoxin koncentrációk okozta növekedésgátló hatást a 11. ábra szemlélteti. A CYN kiváltotta növekedés serkentés egyfajta stresszválasznak is tekinthető, mivel a növény vagy szerv

(gyökér) növeli a biomassza tömegét a CYN detoxifikációs kapacitásának növelése érdekében. Feltételezik ugyanis, hogy a növényi szövetek képesek CYN konjugátumokat létrehozni, amelyek a szabad cianotoxinnál kevésbé mérgezőek (Kinneer és mtsai, 2008; Beyer és mtsai, 2009). A CYN növekedésre gyakorolt hatása függ a megvilágítástól, a kezelés időtartamától és a használt *V. faba* fajtától („Standard” és „ARC Egypt Cross”) is. 6 napos kezeléseknél sokkal intenzívebb és hangsúlyosabb növekedésre gyakorolt hatást detektáltunk, mint 3 napos kezeléseknél. A sötétben nevelt növények esetén a CYN növekedés serkentő hatása nem volt megfigyelhető az epikotilon és a főgyökéren a „Standard” fajta esetében (11. ábra). Ebből adódóan a CYN növekedésre gyakorolt hatása nagymértékben függ a használt genotípustól és a növekedési körülményektől.

A nekrotikus sejthalált számos biotikus és abiotikus stresszfactor indukálhatja. A CYN hatására bekövetkező nekrotikus gyűrűk kialakulása nem specifikus hatás, mert nem kapcsolódik közvetlenül a cianotoxin biokémiai hatásaihoz. *Phragmites australis* szövettenyészetek gyökereiben a CYN nektrózt váltott ki, de a *Sinapis alba* csíranövényeken CYN hatására nem mutattak ki szöveti nektrózt (Beyer és mtsai, 2009, Máthé és mtsai, 2013). A CYN nektrózt indukáló hatása a növényekben tehát fajfüggő. A nektrózis általában egy védelmi mechanizmus, amely a patogének elkülönítésére vagy azok toxinjainak a szállító szövetekbe való bejutását akadályozza meg (Kosslak és mtsai, 1997). *V. faba* esetében a nekrotikus mintázat kialakulása dózisfüggő volt. Alacsonyabb CYN koncentrációban ( $0,1-5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) nekrotikus foltok voltak jellemzőek a gyökérszövetekben ( $0,1-1 \mu\text{g ml}^{-1}$  a természetes környezetben relevánsnak tekinthető koncentráció). Magasabb CYN koncentrációk esetében ( $10-20 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) két folyamatos nekrotikus gyűrű volt jellemző, az egyik a kortexben, a másik pedig a rizodermiszben (12. b és c ábra). Így lehetséges, hogy a CYN indukálta

nekrózis csak egy védelmi mechanizmus a növény részéről, mivel a növény így akadályozza meg a toxin bejutását a szállítószövetbe. Az ezzel párhuzamosan jelentkező CYN indukálta sejtmag morfológia változás („nuclear blebbing”) és fragmentáció további bizonyítékkal szolgál a toxin okozta sejthalálra *V. faba* csíranövényekben (12. e, g és h ábra). Ezek a változások összefüggésben vannak egy nekrozistól eltérő folyamattal, a programozott sejthalállal (PCD) (Drew és mtsai, 2000). A PCD során a sejtmag fragmentációja magában foglalja a duplaszálú DNS (dsDNS) hasítását (van Gent és mtsai, 2001). Kísérleteink során megfigyeltünk CYN okozta kromoszóma töréseket is *V. faba* sejtekben (13. j ábra), ami arra utal, hogy a cianotoxin dsDNS törést indukál. A CYN indukálta PCD-t már több szerző is tárgyalta emberi és állati sejtekben (Bazin és mtsai, 2010; Štraser és mtsai, 2011).

Környezetvédelmi szempontból releváns alacsony CYN koncentráció (0,01-0,1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) 6 napos kezelés során a mitotikus aktivitás serkentését idézi elő, de magasabb koncentrációban (2,5-20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) már gátolja a sejtek osztódását *V. faba* csíranövényekben. Ez nemcsak a mitózis egészére, de az egyes mitotikus fázisokra is igaz (14. ábra). Ez azt sugallja, hogy a CYN befolyásolja a sejtciklust anélkül, hogy bizonyos osztódási fázisban megállítaná azt. A mitózis átmeneti stimulálása kimutatható volt *Phragmites australis*-ban is (Beyer és mtsai, 2009), de *Sinapis alba* csíranövényekben nem volt megfigyelhető (Máthé és mtsai, 2013). A mitózis stimuláló hatása ellenére a CYN rendellenes mitózist indukált alacsony koncentrációban is (Beyer és mtsai, 2009). Állati sejtekben szintén megfigyelték a CYN által okozott mitózis serkentést és gátlást egyaránt (Kinneer és mtsai, 2007; Lankoff és mtsai, 2007). A CYN indukálta mitotikus hatások azt jelzik, hogy a cianotoxin egy komplex mechanizmus által fejt ki hatását a sejtosztódásra. Eredményeink azt mutatják, hogy a mitózis serkentése mindkét *V. faba*

fajtában hasonló volt. Ez magában foglalja a mitózisba való belépés stimulálását is, ami valószínűleg bizonyos fehérjék aktivitásának a gátlása révén valósul meg a sejtciklus egyes időszakában. Rövidebb, 3 napos tesztek során a CYN-nek nincs szignifikáns hatása a mitotikus aktivitásra nézve (14. ábra), viszont magasabb koncentrációban ( $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) 1 napos tesztek során késlelteti a mitózist szinkronizált sejtekben. Ez a hatás megfigyelhető volt *Sinapis alba* csíranövényeken is, ahol ezzel párhuzamosan késleltette a *de novo* fehérjeszintézist a vizsgálati időtartamban (43 óra) (18. ábra). Így az egyik lehetséges oka az indukált mitotikus változásoknak a CYN fehérjeszintézis gátló hatása. A CYN növeli a késői mitózisnak az időtartamát is *V. faba* csíranövényekben (18. ábra), ezáltal viszont a mitózisból való kilépést is késlelteti (de nem blokkolja). A fenti adatok azt mutatják, hogy a CYN hatékony eszköze lehet a növények vagy más eukarióta sejtek sejtciklus szabályozásának vizsgálatához. 1 órás  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  cikloheximid (eukarióta fehérjeszintézis gátló-CH) kezelés hatása eltérő a CYN-étől szinkronizált *V. faba* sejtekben. A CH kimosása után jelentős és reverzibilis gátlást figyeltek meg a fehérjeszintézisben és a metafázis/anafázis átmenet késleltetésében (Olszewska és mtsai, 1990).

A CYN okozta rendellenes PPB-k kialakulása minden esetben megfigyelhető volt függetlenül a kezelés időtartamától, a fajtától és a megvilágítástól *V. faba* csíranövényekben (15. ábra). Beyer és mtsai, (2009) is megfigyelték a rendellenes PPB-k kialakulását *Phragmites australis* növényekben. A CYN indukálta dupla, hasadt és aszimmetrikus PPB-k általánosnak mondhatók növényekben, ami közvetlenül kapcsolódik a fehérjeszintézis változásához. Így ez a hatás a CYN specifikus hatásának tekinthető növényekben. Az abnormális PPB formációk kialakulása általában a fehérjeszintézis vagy a fehérjék funkciójának változásához kapcsolható. Mineyuki (1999) hagyma gyökércsúcs sejtekben számolt be CH kezelés

hatására dupla PPB kialakulásáról. Az auxin transzport megváltozása beleértve a specifikus transzport fehérjét, dupla PPB kialakuláshoz vezet dohány BY-2 sejtekben, ami az osztódási sík orientációjának a változását eredményezi (Dhonukshe és mtsai, 2005). Az aszimmetrikus PPB-k kialakulása az anyasejt egyenlőtlen szétválását fogja előidézni (Mineyuki, 1999). *V. faba* merisztéma sejtek esetében nekünk nem sikerült kimutatni eltérő méretű utódsejteket. A PPB funkcióját tekintve az osztódási síkot jelöli ki. A PPB kialakulásának zavara rendellenes citokinezist, osztódási síkot és sejtfal kialakulást eredményez (Wright és mtsai, 2009). Granger és Cyr (2001) is észlelt dupla, aszimmetrikus és hasadt PPB-t dohány BD2-5 sejtvonalakban latrunculin B hatására. Saját megfigyelésünk szerint a dupla PPB-k kialakulása egybeesett a citokinesis rendellenességeivel, sőt még a sejtosztódási sík rendellenes kialakulásával is CYN kezelések hatására *V. faba* gyökércsúcsokban (15. f ábra).

Szinkronizált *V. faba* gyökércsúcs hosszmeteszetekben megfigyeltük, hogy a CYN gátolja a sejtek mitózisba való belépését. Ezekből az eredményekből azt feltételeztük, hogy a CYN esetleg a DNS szintézis gátlásával eredményezi ezt a jelenséget. Mivel a CYN tartalmaz egy uracil származékot, elméletileg könnyen interferálhat a sejtciklus S fázisával. A BrdU jelöléseket  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  CYN kezelt növényekben végeztük el. Eredményeinket tekintve a CYN *in vivo* körülmények között gátolja az S fázisba való belépését a sejteknek, mivel a kezelt növények esetében még 12 óra után sem volt szignifikáns emelkedés az S fázisos sejtek számában a kontroll növényekhez képest, ahol már 8 óra után elkezdődött az S fázisos sejtek számának emelkedése. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a CYN nemcsak a mitózis elindulását, hanem az S fázis elindulását is késlelteti, aminek oka lehet a G1/S átmenet gátlása. Ezzel szemben *in vitro* körülmények között a CYN nem gátolta a DNS szintézist sem alacsony (0,1

$\mu\text{g ml}^{-1}$ ), sem pedig nagyon magas ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) koncentrációban. Ezen eredmények tudatában érdekes lehet tovább vizsgálni, hogy a CYN milyen más módon okozhatja a mitózis, illetve az S fázis elindulásának késleltetését.

## 6. Összefoglalás

A MCY-LR nagyszámú osztódási orsó rendellenességet indukált idő- és dóziszfüggő módon a *V. faba* merisztéma sejtekben. Sőt ez a toxin sokkal változatosabb osztódási orsó rendellenességeket indukált, mint más ismert protein foszfatáz gátlók (5. táblázat). Megállapíthatjuk, hogy minden osztódási orsó rendellenesség -amelyek 2 és 6 napos kezelések után megjelentek, de 24 órás kezelések után nem- a hosszú távú MCY-LR kezelés által indukált protein foszfatáz gátlással hozható kapcsolatba: a cianotoxin rövid (24 h) és hosszú távon (48 h és 6 nap) egyaránt gátolta a PP1 és a PP2A aktivitást. Ugyanakkor a ROS felhalmozódását nem figyeltük meg. Így a *V. faba* egy jó modellnövény a MCY-LR által kiváltott protein foszfatáz gátlás és a mitotikus mikrotubulusok zavara közötti kapcsolat tanulmányozására, mivel a cianotoxin ROS indukáló hatása nem érvényesül ebben a rendszerben. A MCY-LR által indukált egyes mitotikus orsó rendellenességet elsőként publikáltuk, mint például az osztódási orsóban kialakuló további poláris mikrotubulus kötegek, az egyenlítői mikrotubulusok túlzott kötegelését, a hiányos osztódási orsót, a C- és S-alakú orsókat és az osztódási orsó mellett kialakuló további mikrotubuláris (orsó) struktúrát. A mi véleményünk szerint a MCY-LR egy hatékony eszköz lehet a mitotikus orsó összeszerelődés szabályozásának megértésében. Eredményeink új betekintést nyújtanak a protein foszfatázok szubcelluláris folyamatokban betöltött szerepébe a növényi sejtekben és általánosan az eukariótákban. Természetes körülmények között MCY-LR tartalmú cianobaktérium tömegnek kitett *Ceratophyllum submersum* populáció vizsgálatával bizonyítottuk, hogy a MCY-LR képes olyan mértékben felhalmozódni a felszíni vizekben, amely komoly elváltozásokat tud indukálni az érintett terület növényvilágában mind szöveti mind pedig sejtszinten. Szöveti elváltozások közé tartozik például a

nekrózis indukálása, az oldalrügyek korai kialakulása illetve a hajtás rövidülése. Sejtszinten megfigyelhető volt a DNS degradációja a nekrotikus szövetekben, illetve a hiszton H3-nak a Ser10 pozícióban (pH3-Ser10) történő hiperfoszforilációja a metafázisos sejtekben.

A CYN tranziens növekedés serkentést indukált, ami főleg a gyökér biomasza növekedésében volt jelentős. A gyökér szöveteiben kialakuló nekrotikus foltok és gyűrűk valószínűleg az általános stresszválasz részei a *V. faba* detoxifikációja során, hogy elkerülje a toxin bejutását a közvetlenül a toxinnal nem érintkező szövetekbe (szállítószövet). Ezek a változások nem sorolhatóak a CYN specifikus hatásai közé, mivel sokféle stressz által indukálhatóak. CYN hatására a bekövetkezett kromatin változások (részleges vagy teljes sejtmag fragmentáció) a nekrozissal együtt azt jelezték, hogy a CYN a PCD-t és a nekrozist egyaránt indukálja a cianotoxinnal kezelt *V. faba* sejtekben. A toxin indukálta a mitózis tranziens növekedését is hosszú távú (6 napos) kezelések során, valamint késleltette a sejtosztódást rövidtávú tesztek során szinkronizált oldalgyökércsúcs merisztéma sejtekben. Szinkronizált *V. faba* oldalgyökér merisztéma sejtekben a CYN gátolta a sejtek S fázisba való belépését is, mivel a szinkronizálás után 12 órával sem volt jelentős emelkedés megfigyelhető az S fázisos sejtek számában. Az *in vitro* DNS szintézis vizsgálatok során nem tapasztaltunk változást a PCR és qPCR vizsgálatok során a keletkező DNS mennyiségében sem alacsony, sem pedig magas toxin koncentráció jelenlétében. Az S fázisba történő belépés késleltetése tehát valószínűleg nem a CYN-DNS direkt interakció eredménye. A mitotikus elváltozások részben a CYN által okozott fehérje szintézisben bekövetkezett változásnak tulajdoníthatóak. A PPB-ben bekövetkezett változások összefüggésben lehetnek a CYN specifikus fehérje szintézis gátló hatásával növényekben. Ebből adódóan ezt a mikrotubuláris elváltozást, mint indikátort lehetne használni a CYN kimutatására felszíni vizekben olyan

helyeken, ahol ez a cianotoxin az egyedüli fehérjeszintézis gátló vegyület. Környezetvédelmi szempontból lényeges CYN koncentrációk ( $\leq 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) befolyásolják a növekedést és citotoxikus hatásuk is van. Ilyen például a nekrosis, ezen kívül nem mitotikus kromatin elváltozásokat okoznak illetve kromoszóma rendellenességeket és abnormalis PPB-k kialakulását indukálja. Ezek az eredmények felvetik a CYN citotoxikus hatását a növényekre nézve természetes környezetükben is. Mindenképp új eredménynek számítanak: (1) a CYN indukálta kromatin elváltozások detektálása, amelyek a PCD markerei növényekben, (2) van egy közvetlen bizonyíték a CYN okozta kromoszómaaberrációkra, (3) a CYN hatására bekövetkező mitózis késleltetése, amely kapcsolatban lehet a fehérjeszintézis késleltetésével, (4) illetve hogy a CYN indukálta aszimmetrikus PPB-k és PPB rendellenességek kialakulása befolyásolja az osztódási sík kialakulását is.

## **7. English summary: Investigation of subcellular events in plant cells with cyanotoxins**

### **7.1. Introduction**

Nowadays cyanobacterial water blooming in surface freshwaters causes major environmental problems. The water blooming is caused by cyanobacteria, which are colonizing due to the presence of organic substances in high quantities. Cyanobacteria are photosynthetic prokaryotic organisms, which occur worldwide. Water blooming can be observed mainly in summer, when the days are longer and sunny (Carmichael, 1992; Walker, 2014). Some species of Cyanobacteria have resulted water blooming in Hungary so far, for example *Anabaena spiroides*, *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis sp.* and *Aphanizomenon flos-aquae* (Vasas et al. 2004). Cyanobacterial toxins are enriched during the process of water blooming in freshwaters. Over the past few decades several medical and ecological risks emerged due to cyanobacterial toxins appearing during eutrophication (Carmichael, 1992; Walker, 2014). A wide range of metabolites produced by these photosynthetic organisms are known, and it is not uncommon that these metabolites have an impact on live organisms. Nevertheless, the functions of these substances are not completely understood. In this thesis we studied the cellular effects and their biochemical background of two cyanobacterial toxins in *Vicia faba* seedlings. One of the cyanobacterial toxins is the alkaloid cylindrospermopsin (CYN) and the other is the heptapeptide microcystin-LR. Both toxins are hepatotoxic (Chen and Xie, 2005; Kankaanpää et al. 2002). MCY-LR inhibits the functions of types 1 and 2A serine/threonine specific protein phosphatases (PP1 and PP2A), which leads to the alteration of phosphorylation/dephosphorylation equilibrium of proteins in the cells, and also induces oxidative stress. Thus,

MCY-LR causes both protein phosphatase inhibition and production of ROS, and these were detected equally in plant and animal cells (Pflugmacher, 2002; Gácsi et al. 2009, Campos and Vasconcelos, 2010; Jiang et al. 2011). Alterations of mitotic spindle organization induced by MCY-LR are not well studied in both plant and animal cells, but to clarify it we can get closer to understand the toxicity of MCY-LR.

In mammals, CYN has primarily an impact on liver, but it has also harmful effect on thymus, spleen, heart and kidney (Runnegar and Lu, 1994; Runnegar et al. 1995; Azevedo et al. 2002). Disorganization of microfilaments and microtubules was observed under the influence of CYN in animal cells by Gácsi et al. (2009). Furthermore, the cyanotoxin inhibits the synthesis of proteins in eukaryotic organisms, although the exact molecular mechanism of it is not known (Froscio et al. 2008).

## **7.2. Goals of the study**

- 1, Our purpose was to reveal all types of mitotic spindle alterations induced by MCY-LR in *V. faba*.
- 2, Exploration of the biochemical background of MCY-LR induced microtubule/ mitotic spindle alterations: as to whether protein phosphatase inhibition or the production of ROS induced by MCY-LR is the reason for the abnormal formation of mitotic microtubular structures.
- 3, Study of CYN's impact on the growth and development of *V. faba* seedlings.
- 4, Examination of CYN's impact on mitotic cell division, particularly the microtubular structures formed during the process of mitosis and chromatin organization of non-dividing cells.
- 5, Furthermore, our aim was the study of the short-term effect of CYN on mitosis as well as on the inhibition of protein synthesis.

### 7.3. Summary of results

In *V. faba* lateral root tip meristematic cells MCY-LR induced a large number of mitotic spindle abnormalities in a time and dose dependent manner. Moreover, this toxin induced much more types of mitotic spindle abnormalities than the other well-known protein phosphatase inhibitors (Table 5). MCY-LR inhibited PP1 and PP2A activities after 24 h of exposure, when no spindle anomalies were detected. At 48 h and 6 days of exposure these effects were more pronounced and occurred concomitantly with the induction of spindle anomalies. Since the accumulation of ROS was not detected by dichloro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) labeling, we can assume that all of the detected division spindle abnormalities are related to long-term protein phosphatase inhibition by MCY-LR exposure. Therefore *V. faba* is a good model plant for the study of the relationship between protein phosphatase inhibition induced by MCY-LR and the disorganization of mitotic microtubules, because the ROS inducer effect of the cyanotoxin does not prevail in this system. We were the first to publish several types of mitotic microtubule anomalies induced by MCY-LR, including the formation of additional polar microtubule bundles in the mitotic spindle, excessive bundling of the midplane microtubules, incomplete mitotic spindle, spindles with C- and S-shape and additional microtubular (spindle) structures. Our opinion is that MCY-LR can be an efficient tool for understanding the regulation of mitotic spindle assembly. Our results provide insights into the role of the protein phosphatases in the subcellular processes within the plants and generally the eukaryotes. By studying a *Ceratophyllum submersum* population naturally exposed to a MCY-LR containing cyanobacterial bloom, we also proved that during the toxic cyanobacterial water blooming process, MCY-LR can accumulate in such a quantity which can induce serious changes in the flora of the affected area both at cell and tissue levels. Among

tissue changes the most important are induction of necrosis, early development of lateral buds and shortening of shoots. At the cellular level, we observed the degradation of DNA in necrotic tissues and the hyperphosphorylation of histone H3 at the Ser 10 position (H3S10ph) in the metaphase cells of shoot tip meristems.

CYN generated transient increase of growth, with the highest impact on root biomass. Beside this, at long-term cyanotoxin exposures, plants avoid entering of the cyanotoxin into healthy tissues through vascular tissue by the formation of necrotic patches (0,1 - 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN) and rings (10 – 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN) formed in root tissues. These are part of the general stress response induced by the cyanotoxin resulting in *V. faba* detoxification. These alterations cannot be classified into the specific effects of CYN, because they can be induced by several other types of stress, too. Changes of chromatin - partial fragmentation of cell nucleus at 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN and complete fragmentation at 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  CYN and necrosis together indicated that CYN induces both programmed cell death (PCD) and necrosis of *V. faba* cells treated with cyanotoxin. At long-term treatments (six days) the toxin generated a transient stimulation of mitosis, but it delayed cell division under short-term treatments in synchronized lateral root tip meristematic cells. In synchronized *V. faba* lateral root meristem cells CYN also inhibited the cells to enter S-phase, because there was no significant growth in the number of cells which are in S-phase 12 hours after hydroxylurea washout. For *in vitro* DNA synthesis we did not experience changes in the amount of DNA formed during the PCR and qPCR reactions in the presence of both low and high CYN concentrations. That is, the retardation of entering S-phase, does not result from the direct interaction of CYN-DNA. The mitotic alterations observed are partially due to the changes in protein synthesis caused by CYN. The alterations in the preprophase band (PPB) organization (double PPB,

split PPB, asymmetric PPB) can correlate with the inhibition effect of CYN on specific proteins in plants. Therefore, this microtubular alteration can be used as an indicator of the presence of CYN in surface waters, where this cyanotoxin is the single protein synthesis inhibitor compound. Our results show that environmentally relevant concentrations of CYN ( $\leq 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) affect growth and have cytotoxic effects in *V. faba*. This involves necrosis and non-mitotic chromatin lesions, chromosome aberrations and abnormal formation of PPB. These results clearly show the cytotoxic effect of CYN on plants and raise the possibility of CYN toxicity in natural environments. The novelty of our results consists in: (1) the detection of chromatin alterations induced by CYN, which are markers for PCD in plants, (2) the first direct evidence for chromosome aberrations caused by CYN in plants, (3) the delay of mitosis resulted by CYN, which can be related to the delay of protein synthesis, (4) as well as the fact that the CYN induced alteration of cell division plane can be correlated to the alterations of PPB organization.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőnek Dr. Máthé Csaba egyetemi docensnek, hogy lehetővé tette, nyomon követte és szakmai tapasztalatával segítette, koordinálta munkámat az alapképzéstől kezdve.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Vasas Gábor tanszékvezető Úrnak, hogy lehetőséget biztosított arra, hogy a DE TTK Növénytani tanszékén készítsem doktori disszertációm, valamint hogy biztosította számunkra a kísérletek során felhasznált toxinokat.

Köszönet illeti Riba Milánt, akivel hosszú időn át dolgoztunk együtt.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Erdődi Ferencnek és Kónya Zoltánnak (DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet), a protein foszfatáz mérések kivitelezésében való közreműködésükért.

Köszönjük Dr. Vereb György, Dr. Roszik János és Dr. Beyer Dániel segítségét a konfokális mikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott felbecsülhetetlen segítségüket és a hasznos tanácsaikat.

A *Vicia faba* ARC Egypt Cross magokat Dr. Walid M El-Rodeny (Centre of Agricultural Research, Institute of Field Crops Research, Food Legumes Research Section, P.O. Box 33717, Sakha Agricultural Research Station, Kafr El-Sheikh, Egyiptom) bocsátotta rendelkezésünkre, amit ezúton is köszönünk.

Köszönet illeti Dr. Ceglédi Leventét és Simon Ádámot (DE-MÉK Állattenyésztési Tanszékének), hogy lehetővé tették számunkra a qPCR vizsgálatok kivitelezését.

Szeretnék köszönetet mondani a DE TEK TTK Növénytani Tanszék minden jelenlegi és volt dolgozójának, PhD hallgatójának, illetve szakdolgozójának, akik segítették a munkámat és köszönöm, hogy munkámat kellemes légkörben, barátok között végezhettem.

Külön köszönet illeti:

Dr. Jámbrik Katalint, Tándor Ildikót és Jambrovics Károlyt, akik segítségemre voltak a szakmai problémák megoldásában.

Fülöpné Barabás Évát, aki a metszetek elkészítésében nyújtott segítséget.

A kutatás a **TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001** Nemzeti Kiválóság Program című kiemelt projekt és az **NKFIH K120638** pályázat keretében zajlott. A TÁMOP projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Abdel-Rahman, S., El-Ayouty, Y. M., & Kamael, H. A. (1993). Characterization of heptapeptide toxins extracted from *Microcystis aeruginosa* (Egyptian isolate). *Chemical Biology & Drug Design*, 41(1), 1-7.
2. Aguirre-Portolés, C., Bird, A. W., Hyman, A., Cañamero, M., de Castro, I. P., & Malumbres, M. (2012). Tpx2 controls spindle integrity, genome stability, and tumor development. *Cancer research*, 72(6), 1518-1528.
3. Ahn, C. S., Han, J. A., Lee, H. S., Lee, S., & Pai, H. S. (2011). The PP2A regulatory subunit Tap46, a component of the TOR signaling pathway, modulates growth and metabolism in plants. *The Plant Cell*, 23(1), 185-209.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). Molecular biology of the cell, 5th edition. *Garland Science*, p. 965-1052.
5. Allen, M. M. (1968). Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of phycology*, 4(1), 1-4.
6. 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. *Toxicol*, 54(3), 283-294.
7. Ambrose, J.C., Cyr, R., 2008. Mitotic spindle assembly and function. In: Verma, D.P.S., Hong, Z. (Eds.), Cell Division Control in Plants, Plant Cell Monographs. Springer, Berlin-Heidelberg, pp. 141–167.
8. Austin, J. R., Seguí-Simarro, J. M., & Staehelin, L. A. (2005). Quantitative analysis of changes in spatial distribution and plus-end geometry of microtubules involved in plant-cell cytokinesis. *Journal of cell science*, 118(17), 3895-3903.
9. Axton, J. M., Dombrádi, V., Cohen, P. T., & Glover, D. M. (1990). One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell*, 63(1), 33-46.
10. Ayaydin, F., Vissi, E., Mészáros, T., Miskolczi, P., Kovács, I., Fehér, A., Dombrádi, V., Erdódi, 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. *The Plant Journal*, 23(1), 85-96.
11. Azevedo, S.M.F.O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw, G.R., Eaglesham, G.K. (2002). Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru—Brazil. *Toxicology*, 181, 441-446.
12. 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(4), 281-288.
13. Bannigan, A., Scheible, W.R., Lukowitz, W., Fagerstrom, C., Wadsworth, P., Somerville, C., Baskin, T.I. (2007). A conserved role for kinesin-5 in plant mitosis. *Journal of Cell Science*, 120(16), 2819-2827.
  14. Baskin, T.I. (2015). The Cytoskeleton. Buchanan, B. B., Grissem, W., Jones, R. L. (Eds). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 2nd Edition. UK: pp. 191-238.
  15. 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(3), 251-259.
  16. Beyer, D., Suranyi, G., Vasas, G., Roszik, J., Erdődi, F., M-Hamvas, M., Bácsi, I., Bátori, R., Serfőző, Z., Szigeti, M. Zs., Vereb, G., Demeter, Z., Gonda, S., Máthé, Cs. (2009). Cylindrospermopsin induces alterations of root histology and microtubule organization in common reed (*Phragmites australis*) plantlets cultured in vitro. *Toxicon*, 54(4), 440-449.
  17. Beyer, D., Tándor, I., Kónya, Z., Bátori, R., Roszik, J., Vereb, G., Erdődi, F., Vasas, G., M-Hamvas, M., Jambrovics, K., Máthé, C. (2012). Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*. *Annals of botany*, 110(4), 797-808.
  18. Binarová, P., Doležel, J., Draber, P., Heberle-Bors, E., Strnad, M., & Bögre, L. (1998). Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation. *The Plant Journal*, 16(6), 697-707.
  19. Boaru, D. A., Dragoş, N., & Schirmer, K. (2006). Microcystin-LR induced cellular effects in mammalian and fish primary hepatocyte cultures and cell lines: a comparative study. *Toxicology*, 218(2), 134-148.
  20. Bonness, K., Aragon, I.V., Rutland, B., Ofori-Acquah, S., Dean, N.M., Honkanen, R.E. (2006). Cantharidin-induced mitotic arrest is associated with the formation of aberrant mitotic spindles and lagging chromosomes resulting, in part, from the suppression of PP2A $\alpha$ . *Molecular cancer therapeutics*, 5(11), 2727-2736.
  21. Boruc, J., Zhou, X., & Meier, I. (2012). Dynamics of the plant nuclear envelope and nuclear pore. *Plant physiology*, 158(1), 78-86.
  22. Botes, D.P.; Wessels, P.L.; Kruger, H.; Runnegar, M.T.C.; Santikarn, S.; Smith, R.J.; Barna, J.C.J.; Williams, D.H. (1985). Structural studies on cyanoginosins-LR,-YR,-YA, and-YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 2747-2748.

23. Bouaï, 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(1), 53-63.
24. 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(1-2), 248-254.
25. Bryant, D. A. (Ed.). (1994). *The molecular biology of cyanobacteria* (Vol. 1). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
26. Byth, S. (1980). Palm Island mystery disease. *The Medical Journal of Australia*, 2(1), 40-42.
27. 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. *The Plant Cell*, 14(4), 833-845.
28. Campos, A., & Vasconcelos, V. (2010). Molecular mechanisms of microcystin toxicity in animal cells. *International journal of molecular sciences*, 11(1), 268-287.
29. Cao, L.Y., Wang, L.H., Zheng, M., Cao, H., Ding, L., Zhang, X.L., Fu, Y. (2013). Arabidopsis AUGMIN subunit8 is a microtubule plus-end binding protein that promotes microtubule reorientation in hypocotyls. *The Plant Cell*, 25(6), 2187-2201.
30. Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of applied bacteriology*, 72(6), 445-459.
31. Carmichael, W.W. (1994). Toxins of cyanobacteria. *Scientific American*: 270(1), 78-86.
32. Casamayor A, Pérez-Callejón E, Pujol G, Ariño J, Ferrer A. (1994). Molecular characterization of a fourth isoform of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 26(1), 523-528.
33. Cebolla, A., Vinardell, J. M., Kiss, E., Oláh, B., Roudier, F., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (1999). The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *The EMBO Journal*, 18(16), 4476-4484.
34. Chaudhry, F., Guérin, C., Von Witsch, M., Blanchoin, L., & Staiger, C. J. (2007). Identification of Arabidopsis cyclase-associated protein 1 as the first nucleotide exchange factor for plant actin. *Molecular biology of the cell*, 18(8), 3002-3014.
35. Chen, J., & Xie, P. (2005). Seasonal dynamics of the hepatotoxic microcystins in various organs of four freshwater bivalves from the large eutrophic Lake Taihu

- of subtropical China and the risk to human consumption. *Environmental toxicology*, 20(6), 572-584.
36. Chen, L., & Xie, P. (2016). Mechanisms of microcystin-induced cytotoxicity and apoptosis. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(13), 1018-1031.
  37. Cheng, A., Balczon, R., Zuo, Z., Koons, J. S., Walsh, A. H., & Honkanen, R. E. (1998). Fostriecin-mediated G2-M-phase growth arrest correlates with abnormal centrosome replication, the formation of aberrant mitotic spindles, and the inhibition of serine/threonine protein phosphatase activity. *Cancer Research*, 58(16), 3611-3619.
  38. Cohen, P., & Cohen, P. T. (1989). Protein phosphatases come of age. *Journal of Biological Chemistry*, 264(36), 21435-21438.
  39. Conklin, P. L. (2001). Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell & Environment*, 24(4), 383-394.
  40. Costas, C., de la Paz Sanchez, M., Sequeira-Mendes, J., & Gutierrez, C. (2011). Progress in understanding DNA replication control. *Plant science*, 181(3), 203-209.
  41. 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. *Toxicol*, 55(4), 827-837.
  42. Dashek, W. V., & Miglani, G. S. (Eds.). (2017). *Plant Cells and Their Organelles*. John Wiley & Sons.
  43. de Jager, S. M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S., & Murray, J. A. (2005, June). The developmental context of cell-cycle control in plants. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 16, No. 3, pp. 385-396). Academic Press.
  44. de la Cruz, A. A., Hiskia, A., Kaloudis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, M. G., He, X., Lofting, K., O'Shea, K., Zhao, C., Pelaez, M., Han, C., Lynch, T. J., Dionysiou, D.D. (2013). A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environmental science. Processes & impacts*, 15(11), 1979-2003.
  45. de la Paz Sanchez, M., Caro, E., Desvoyes, B., Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C. (2008, December). Chromatin dynamics during the plant cell cycle. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 6, pp. 537-546). Academic Press.
  46. De Pinto, M.C., Francis, D., De Gara, L. (1999). The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, 209(1), 90-97.
  47. Dewitte, W., & Murray, J. A. (2003). The plant cell cycle. *Annual review of plant biology*, 54(1), 235-264.
  48. 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(1), 11.

49. Ding, W.X., Shen, H.M., Ong, C.N. (2001). Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 64(6), 507-519.
50. Downing, K. H., & Nogales, E. (1998). Tubulin structure: insights into microtubule properties and functions. *Current opinion in structural biology*, 8(6), 785-791.
51. Dresselhaus T, Srilunchang KO, Leljak-Levanic D, Schreiber DN, Garg P. (2006). The fertilization-induced DNA replication factor MCM6 of maize shuttles between cytoplasm and nucleus, and is essential for plant growth and development. *Plant physiology*, 140(2), 512-527.
52. Drew, M. C., He, C. J., & Morgan, P. W. (2000). Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in plant science*, 5(3), 123-127.
53. Eckardt, N. A. (2008). High-Resolution Imaging of Cortical Microtubule Arrays. *The Plant Cell*, 20(4), 817-819.
54. El-Maksoud, H.A., Hussein, M.A., Kassem, A. (2013). Antioxidant activity of *Vicia faba L.* vicine and its o-deglycosylation product divicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 3, 316–323.
55. Eloy, N. B., Gonzalez, N., Van Leene, J., Maleux, K., Vanhaeren, H., De Milde, L., ... & Cromer, L. (2012). SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13853-13858.
56. Entz, G., & Sebenstyén, O. (1942). *A Balaton-Elete*. Kradja a Kiralyi Magyar Természettudományi Társulat.
57. Erdődi, F., Tóth, B., Hirano, K., Hirano, M., Hartshorne, D. J., & Gergely, P. (1995). Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and-2A in vivo. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 269(5), C1176-C1184.
58. Fache, V., Gaillard, J., Van Damme, D., Geelen, D., Neumann, E., Stoppin-Mellet, V., Vantard, M. (2010). Arabidopsis kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *The Plant Cell*, 22(11), 3804-3815.
59. Falconer, I. R., & Humpage, A. R. (2001). Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin. *Environmental toxicology*, 16(2), 192-195.
60. Fay, P. (1965). Heterotrophy and nitrogen fixation in *Chlorogloea fritschii*. *Microbiology*, 39(1), 11-20.

61. Fay, W.F., Van Baalen, C. (Eds.). (1987). *The Cyanobacteria*. Elsevier, Amsterdam.
62. Flores-Rojas, N. C., Esterhuizen-Londt, M., Pflugmacher, S. (2015). Antioxidative stress responses in the floating macrophyte *Lemna minor* L. with cylindrospermopsin exposure. *Aquatic Toxicology*, 169, 188-195.
63. Francis, G. (1878). Poisonous Australia lake. *Nature*, 18, 11-12.
64. Francois, J. M., Thompson-Jaeger, S., Skroch, J., Zellenka, U., Spevak, W., Tatchell, K. (1992). GAC1 may encode a regulatory subunit for protein phosphatase type 1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 11(1), 87.
65. Frangež, R., Žužek, M. C., Mrkun, J., Šuput, D., Sedmak, B., & Kosec, M. (2003). Microcystin-LR affects cytoskeleton and morphology of rabbit primary whole embryo cultured cells *in vitro*. *Toxicol*, 41(8), 999-1005.
66. Frank, M. J., Cartwright, H. N., Smith, L. G. (2003). Three Brick genes have distinct functions in a common pathway promoting polarized cell division and cell morphogenesis in the maize leaf epidermis. *Development*, 130(4), 753-762..
67. Freitas, M., Azevedo, J., Pinto, E., Neves, J., Campos, A., Vasconcelos, V. (2015). Effects of microcystin-LR, cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture on growth, oxidative stress and mineral content in lettuce plants (*Lactuca sativa* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 116, 59-67.
68. Froschio, 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. *Toxicol*, 51(2), 191-198.
69. Fuchs, J., Strehl, S., Brandes, A., Schweizer, D., Schubert, I. (1998). Molecular--cytogenetic characterization of the *Vicia faba* genome--heterochromatin differentiation, replication patterns and sequence localization. *Chromosome Research*, 6(3), 219-230.
70. Gácsi, M., Antal, O., Vasas, G., Máthé, C., Borbély, G., Saker, M.L., Gyiri, J., Farkas, A., Vehovszky, Á., Bánfalvi, G. (2009). Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicology in vitro*, 23(4), 710-718.
71. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K., (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.
72. Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell*, 54(3), 433-439.
73. Gilliland, L.U., Pawloski, L.C., Kandasamy, M.K. and Meagher, R.B. (2003). Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. *The Plant Journal*, 33(2), 319-328.

74. 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(6543), 745.
75. Goshima, G., & Kimura, A. (2010). New look inside the spindle: microtubule-dependent microtubule generation within the spindle. *Current opinion in cell biology*, 22(1), 44-49.
76. Goshima, G., Wollman, R., Goodwin, S.S., Zhang, N., Scholey, J.M., Vale, R.D., Stuurman, N. (2007). Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science*, 316(5823), 417-421.
77. Granger, C.L., Cyr, R.J. (2001). Use of abnormal preprophase bands to decipher division plane determination. *Journal of cell science*, 114(3), 599-607.
78. Guo, K., Xia, K., Yang, Z.M., (2008). Regulation of tomato lateral root development by carbon monoxide and involvement in auxin and nitric oxide. *Journal of experimental botany*, 59(12), 3443-3452.
79. Guo, L., Ho, C. M. K., Kong, Z., Lee, Y. R. J., Qian, Q., Liu, B. (2009). Evaluating the microtubule cytoskeleton and its interacting proteins in monocots by mining the rice genome. *Annals of botany*, 103(3), 387-402.
80. Gutiérrez-Praena, D., Jos, Á., Pichardo, S., Moyano, S., Blanco, A., Monterde, J.G., Cameán, A. (2012). Time-dependent histopathological changes induced in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after acute exposure to pure cylindrospermopsin by oral and intraperitoneal route. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76, 102-113.
81. Guzmán-Guillén, R., Manzano, I.L., Moreno, I.M., Prieto Ortega, A.I., Moyano, R., Blanco, A., Cameán, A.M. (2015). Cylindrospermopsin induces neurotoxicity in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to *Aphanizomenon ovalisporum*. *Aquatic Toxicology*, 161, 17-24.
82. Hamada, T. (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of plant research*, 120(1), 79-98.
83. Hamada, T. (2014). Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *Int Rev Cell Mol Biol*, 312, 1-52.
84. Healy, A. M., Zolnierowicz, S., Stapleton, A. E., Goebel, M., Depaoli-Roach, A. A., Pringle, J. R. (1991). CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Molecular and cellular biology*, 11(11), 5767-5780.
85. Heisler, J.P., Gilbert, J., Burkholder, J., Anderson, D., Cochlan, W., Dennison, W., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H., Sellner, K., Stockwell, D., Stoecker, D., Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful algae*, 8(1), 3-13.

86. Hepler, P. K., Vidali, L., Cheung, A. Y. (2001). Polarized cell growth in higher plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 17(1), 159-187.
87. Heroes, E., Lesage, B., Görnemann, J., Beullens, M., Van Meervelt, L., Bollen, M. (2013). The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *FEBS Journal*, 280(2), 584-595.
88. Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T., Hasezawa, S. (2008). Quantitative analysis of changes in actin microfilament contribution to cell plate development in plant cytokinesis. *BMC Plant Biology*, 8(1), 80.
89. Higaki, T., Sano, T., Hasezawa, S. (2007). Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Current opinion in plant biology*, 10(6), 549-556.
90. Ho, C. M. K., Hotta, T., Guo, F., Roberson, R. W., Lee, Y. R. J., Liu, B. (2011). Interaction of antiparallel microtubules in the phragmoplast is mediated by the microtubule-associated protein MAP65-3 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(8), 2909-2923.
91. Holding, D. R., Springer, P. S. (2002). The Arabidopsis gene PROLIFERA is required for proper cytokinesis during seed development. *Planta*, 214(3), 373-382.
92. Hotta, T., Kong, Z.S., Ho, C.M.K., Zeng, C.J.T., Horio, T., Fong, S., Vuong, T., Lee, Y.R.J., Liu, B. (2012). Characterization of the Arabidopsis augmin complex uncovers its critical function in the assembly of the acentrosomal spindle and phragmoplast microtubule arrays. *The Plant Cell*, 24(4), 1494-1509.
93. Humpage, A. R., Fontaine, F., Froscio, 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*, 68(9), 739-753.
94. Hush, J., Wu, L., John, P. C., HEPLER, L. H., & HEPLER, P. K. (1996). Plant mitosis promoting factor disassembles the microtubule preprophase band and accelerates prophase progression in Tradescantia. *Cell biology international*, 20(4), 275-287.
95. Jiang, J., Gu, X., Song, R., Wang, X., Yang, L. (2011). Microcystin-LR induced oxidative stress and ultrastructural alterations in mesophyll cells of submerged macrophyte Vallisneria natans (Lour.) Hara. *Journal of hazardous materials*, 190(1), 188-196.
96. Johnson, K., DeLong, A., Garbers, C., Simmons, C., Söll, D. (1995). Auxin physiology mutants rcn1 and rgr1. *Abstr. Int. Meet. Arabidopsis Res.*, 6th, Madison, Wis., p. 299.
97. Jonassen, E. M., Heidari, B., Nemie-Feyissa, D., Matre, P., & Lillo, C. (2011). Protein phosphatase 2A regulatory subunits are starting to reveal their functions in plant metabolism and development. *Plant signaling & behavior*, 6(8), 1216-1218.

- 98.** Jovanović, A. M., Durst, S., Nick, P. (2010). Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *Journal of experimental botany*, 61(3), 901-909.
- 99.** Kandasamy, M. K., McKinney, E. C., Meagher, R. B. (2002). Functional Nonequivalency of Actin Isovariants in Arabidopsis. *Molecular biology of the cell*, 13(1), 251-261.
- 100.** Kankaanpää, H., Vuorinen, P. J., Sipiä, V., Keinänen, M. (2002). Acute effects and bioaccumulation of nodularin in sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) exposed orally to *Nodularia spumigena* under laboratory conditions. *Aquatic toxicology*, 61(3), 155-168.
- 101.** Karahara, I., Suda, J., Tahara, H., Yokota, E., Shimmen, T., Misaki, K., Yonemura, S., Staehelin, L. A., Mineyuki, Y. (2009). The preprophase band is a localized center of clathrin-mediated endocytosis in late prophase cells of the onion cotyledon epidermis. *The Plant Journal*, 57(5), 819-831.
- 102.** Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Kurihara, D., Yoneda, A., Hasezawa, S., Uchiyama, S., Fukui, K. (2005). Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant molecular biology*, 58(1), 1-13.
- 103.** Kawamura, E., Himmelspach, R., Rashbrooke, M. C., Whittington, A. T., Gale, K. R., Collings, D. A., Wasteneys, G. O. (2006). MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the Arabidopsis root. *Plant physiology*, 140(1), 102-114.
- 104.** Kerk, D., Templeton, G., Moorhead, G. B. (2008). Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant physiology*, 146(2), 351-367.
- 105.** Kim, S. H., Arnold, D., Lloyd, A., Roux, S. J. (2001). Antisense expression of an Arabidopsis ran binding protein renders transgenic roots hypersensitive to auxin and alters auxin-induced root growth and development by arresting mitotic progress. *The Plant Cell*, 13(12), 2619-2630.
- 106.** Kinnear, S. (2010). Cylindrospermopsin: a decade of progress on bioaccumulation research. *Marine drugs*, 8(3), 542-564.
- 107.** Kinnear, S. H. W., Fabbro, L. D., Duivenvoorden, L. J. (2008). Variable growth responses of water thyme (*Hydrilla verticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(2), 187-194.
- 108.** Kirik, V., Grini, P. E., Mathur, J., Klinkhammer, I., Adler, K., Bechtold, N., Herzong, M., Bonneville, J.M., Hülskamp, M. (2002). The Arabidopsis TUBULIN-FOLDING COFACTOR A gene is involved in the control of the  $\alpha/\beta$ -tubulin monomer balance. *The Plant Cell*, 14(9), 2265-2276.

- 109.** Kline-Smith, S. L., Walczak, C. E. (2004). Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics. *Molecular cell*, *15*(3), 317-327.
- 110.** Kollman, J. M., Merdes, A., Mourey, L., Agard, D. A. (2011). Microtubule nucleation by  $\gamma$ -tubulin complexes. *Nature reviews Molecular cell biology*, *12*(11), 709-721.
- 111.** Komis, G., Illés, P., Beck, M., Šamaj, J. (2011). Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current opinion in plant biology*, *14*(6), 650-657.
- 112.** Kós, P. (1995). A *Microcystis aeruginosa* toxintermelése. Doktori értekezés, MTA SZBK Növénybiológiai Intézet.
- 113.** Kosslak, 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*(4), 729-745.
- 114.** Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). New York, NY, USA: John Wiley and Sons, pp. 115–175.
- 115.** Lankoff, A., Banasik, A., Obe, G., Deperas, M., Kuzminski, K., Tarczynska, 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*(3), 204-213.
- 116.** Lankoff, A., Wojcik, A., Lisowska, H., Bialczyk, J., Dziga, D., & Carmichael, W. W. (2007). No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin-treated CHO-K1 cells without and with metabolic activation. *Toxicol*, *50*(8), 1105-1115.
- 117.** Lee, Y. R. J., Liu, B. (2013). The rise and fall of the phragmoplast microtubule array. *Current opinion in plant biology*, *16*(6), 757-763.
- 118.** Luan, S. (2003). Protein phosphatases in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *54*(1), 63-92.
- 119.** Maccioni, R. B., Cambiazo, V. (1995). Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiological reviews*, *75*(4), 835-864.
- 120.** MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P., Codd, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS letters*, *264*(2), 187-192.
- 121.** MacKintosh, C., Diplexcito, J., 2003. Naturally occurring inhibitors of serine/threonine phosphatases. In: Wells, J., Hunter, T., Karin, M., Farquhar,

- M.,Thompson, B. (Eds.), Handbook of Cell Signaling, vol. 1. Elsevier, USA, pp.607–611.
- 122.** MacKintosh, C., MacKintosh, R. W. (1994). Inhibitors of protein kinases and phosphatases. *Trends in biochemical sciences*, 19(11), 444-448.
- 123.** MacKintosh, R. W., Dalby, K. N., Campbell, D. G., Cohen, P. T., Cohen, P., MacKintosh, C. (1995). The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS letters*, 371(3), 236-240.
- 124.** Manzanero, S., Rutten, T., Kotseruba, V., Houben, A. (2002). Alterations in the distribution of histone H3 phosphorylation in mitotic plant chromosomes in response to cold treatment and the protein phosphatase inhibitor cantharidin. *Chromosome Research*, 10(6), 467-476.
- 125.** Masuda, H. P., Ramos, G. B. A., de Almeida-Engler, J., Cabral, L. M., Coqueiro, V. M., Macrini, C. M. T., Ferreira, P.C.G., Hemerly, A. S. (2004). Genome based identification and analysis of the pre-replicative complex of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 574(1-3), 192-202.
- 126.** 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(3), 122-130.
- 127.** Máthé, C., Beyer, D., Vasas, G. (2016). The Effects of Microcystins (Cyanobacterial Heptapeptides) on the Eukaryotic Cytoskeletal System. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(13), 1063-1077.
- 128.** Mathe, C., M-Hamvas, M., Garda, T., Beyer, D., & Vasas, G. (2017). Cellular Effects of Cylindrospermopsin (Cyanobacterial Alkaloid Toxin) and its Potential Medical Consequences. *Current medicinal chemistry*, 24(1), 91-109.
- 129.** Máthé, C., Vasas, G., Borbély, G., Erdődi, F., Beyer, D., Kiss, A., Surányi, G., Gonda, S., Jámbrik, K., M-Hamvas, M. (2013). Histological, cytological and biochemical alterations induced by microcystin-LR and cylindrospermopsin in white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Acta Biologica Hungarica*, 64(1), 71-85.
- 130.** Máthé, C., Vasas, G., Surányi, G., Bácsi, I., Beyer, D., Tóth, S., ... & 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(4), 824-835.
- 131.** Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., Hülskamp, M. (2003). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15(7), 1632-1645.
- 132.** Mayer-Jaekel, R. E., Hemmings, B. A. (1994). Protein phosphatase 2A—a ‘menage a trois’. *Trends in cell biology*, 4(8), 287-291.

- 133.** Meagher, R. B., Fechheimer, M. (2003). The Arabidopsis cytoskeletal genome. *The Arabidopsis Book*, e0096.
- 134.** Mehnert, G., Leunert, F., Cirés, S., Jöhnk, K. D., Rücker, J., Nixdorf, B., Wiedner, C. (2010). Competitiveness of invasive and native cyanobacteria from temperate freshwaters under various light and temperature conditions. *Journal of Plankton Research*, 32(7), 1009-1021.
- 135.** Metcalf, J. S., Barakate, A., Codd, G. A. (2004). Inhibition of plant protein synthesis by the cyanobacterial hepatotoxin, cylindrospermopsin. *FEMS microbiology letters*, 235(1), 125-129.
- 136.** M-Hamvas, M., Máthé, C., Vasas, G., Jámbrik, K., Papp, M., Beyer, D., Mészáros, I., Borbély, G. (2010). Cylindrospermopsin and microcystin-LR alter the growth, development and peroxidase enzyme activity of white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings, a comparative analysis. *Acta Biologica Hungarica*, 61(Supplement 1), 35-48.
- 137.** M-Hamvas, M., Mathe, Cs., Molnar, E., Vasas, G., Grigorszky, I., Borbely, G. (2003). Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. *Aquatic toxicology*, 62(1), 1-9.
- 138.** Mineyuki, Y. (1999). The preprophase band of microtubules: its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *International review of cytology*, 187, 1-49.
- 139.** Molchan, T. M., Valster, A. H., Hepler, P. K. (2002). Actomyosin promotes cell plate alignment and late lateral expansion in *Tradescantia* stamen hair cells. *Planta*, 214(5), 683-693.
- 140.** Moorhead, G. B., De Wever, V., Templeton, G., & Kerk, D. (2009). Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochemical Journal*, 417(2), 401-409.
- 141.** Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- 142.** Müller, S. (2012). Universal rules for division plane selection in plants. *Protoplasma*, 249(2), 239-253.
- 143.** Müller, S., Han, S., & Smith, L. G. (2006). Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 16(9), 888-894.
- 144.** Nagele, R. G., Freeman, T., Fazekas, J., Lee, K. M., Thomson, Z., Lee, H. Y. (1998). Chromosome spatial order in human cells: evidence for early origin and faithful propagation. *Chromosoma*, 107(5), 330-338.
- 145.** Nakamura, M., Ehrhardt, D. W., Hashimoto, T. (2010). Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal Arabidopsis cortical array. *Nature Cell Biology*, 12(11), 1064.

- 146.** Nieuwland, J., Menges, M., Murray, J.A.H. (2008). The plant cyclins. Dirk Inse (Ed). *Annual Plant Reviews, Cell Cycle Control and Plant Development* (Vol. 32). John Wiley & Sons.
- 147.** Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asada, T., Irie, K., Ito, M., Terada, M., Banno, H., Yamazaki, Y. (2002). Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell*, 109(1), 87-99.
- 148.** Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W., Fujiki, H. (1992). Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 118(6), 420-424.
- 149.** Nübel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 63(8), 3327-3332.
- 150.** Oh, S. A., Pal, M. D., Park, S. K., Johnson, J. A., Twell, D. (2009). The tobacco MAP215/Dis1-family protein TMBP200 is required for the functional organization of microtubule arrays during male germline establishment. *Journal of experimental botany*, 61(4), 969–981.
- 151.** Ohtani, I., Moore, R. E., Runnegar, M. T. (1992). Cyindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cyindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*, 114(20), 7941-7942.
- 152.** Olszewska, M. J., Marciniak, K., Kuran, H. (1990). The timing of synthesis of proteins required for mitotic spindle and phragmoplast in partially synchronized root meristems of *Vicia faba* L. *European journal of cell biology*, 53(1), 89-92.
- 153.** Paradez, A. R., Somerville, C. R., Ehrhardt, D. W. (2006a). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, 312(5779), 1491-1495.
- 154.** Paradez, A., Wright, A., Ehrhardt, D. W. (2006b). Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Current opinion in plant biology*, 9(6), 571-578.
- 155.** Peters, J. M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular cell*, 9(5), 931-943.
- 156.** Peti, W., Nairn, A. C., Page, R. (2013). Structural basis for protein phosphatase 1 regulation and specificity. *FEBS Journal*, 280(2), 596-611.
- 157.** Pettkó-Szandtner, A., Mészáros, T., Horváth, G. V., Bakó, L., Csordás-Tóth, É., Blastyák, A., Zhiponova, M., Miskolczi, P., Dudits, D. (2006). Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase. *The Plant Journal*, 46(1), 111-123.

- 158.** Pflugmacher, S. (2002). Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems. *Environmental toxicology*, 17(4), 407-413.
- 159.** Pickett-Heaps, J., Forer, A. (2009). Mitosis: spindle evolution and the matrix model. *Protoplasma*, 235(1-4), 91-99.
- 160.** Prieto, A., Campos, A., Cameán, A., Vasconcelos, V. (2011). Effects on growth and oxidative stress status of rice plants (*Oryza sativa*) exposed to two extracts of toxin-producing cyanobacteria (*Aphanizomenon ovalisporum* and *Microcystis aeruginosa*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(7), 1973-1980.
- 161.** Puddick, J., Prinsep, M. R., Wood, S. A., Kaufononga, S. A., Cary, S. C., Hamilton, D. P. (2014). High levels of structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. *Marine drugs*, 12(11), 5372-5395.
- 162.** Rai, A. N. (1990). *Handbook of symbiotic cyanobacteria*. CRC Press.
- 163.** Rasmussen, C. G., Sun, B., Smith, L. G. (2011). Tangled localization at the cortical division site of plant cells occurs by several mechanisms. *J Cell Sci*, 124(2), 270-279.
- 164.** Rastogi, R. P., Sinha, R. P., Incharoensakdi, A. (2014). The cyanotoxin-microcystins: current overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(2), 215-249.
- 165.** 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(2), 620-627.
- 166.** Renshaw, M. J., Ward, J. J., Kanemaki, M., Natsume, K., Nédélec, F. J., & Tanaka, T.U. (2010) Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation. *Developmental Cell*, 19(2), 232-244.
- 167.** Reynolds, C. S., Walsby, A. E. (1975). Water-blooms. *Biological reviews*, 50(4), 437-481.
- 168.** Roberge, M., Tudan, C., Hung, S. M., Harder, K. W., Jirik, F. R., Anderson, H. (1994). Antitumor drug fostriecin inhibits the mitotic entry checkpoint and protein phosphatases 1 and 2A. *Cancer research*, 54(23), 6115-6121.
- 169.** Runnegar, M. T., Kong, S. M., Zhong, Y. Z., Lu, S. C. (1995). Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical pharmacology*, 49(2), 219-225.
- 170.** Runnegar, M. T., Xie, C., Snider, B. B., Wallace, G. A., Weinreb, S. M., Kuhlenkamp, J. (2002). In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicological Sciences*, 67(1), 81-87.

- 171.** Runnegar, M. T., Xinhua, W. E. I., Hamm-Alvarez, S. F. (1999). Increased protein phosphorylation of cytoplasmic dynein results in impaired motor function. *Biochemical Journal*, 342(1), 1-6.
- 172.** Runnegar, M.T., Lu, S.C. (1994). The role of glutathione (GSH) in the hepatotoxicity caused by the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin (CY). *FASEB. J.* 8, A419 A419.
- 173.** Sabelli, P. A., and Larkins, B. A. (2006). Grasses like Mammals? Redundancy and compensatory regulation within the retinoblastoma protein family. *Cell Cycle* 5, 352–355.
- 174.** Sabelli, P. A., Larkins, B. A. (2009). Regulation and function of retinoblastoma-related plant genes. *Plant Science*. 177(6), 540–548.
- 175.** Sakurada, K., Zheng, B., Kuo, J. F. (1992). Comparative effects of protein phosphatase inhibitors (okadaic acid and calyculin A) on human leukemia HL60, HL60/ADR and K562 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 187(1), 488-492.
- 176.** Sasabe, M., Kosetsu, K., Hidaka, M., Murase, A., Machida, Y. (2011). Arabidopsis thaliana MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant signaling & behavior*, 6(5), 743-747.
- 177.** Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T.J., Hidaka, M., Machida, Y. (2006). Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes & development*, 20(8), 1004-1014.
- 178.** Schlaitz, A.L., Srayko, M., Dammermann, A., Quintin, S., Wielsch, N., MacLeod, I., De Robillard, Q., Zinke, A., Müller-Reichert, T., Shevchenko, A., Oegema, K., Hyman, A.A. (2007). The *C. elegans* RSA complex localizes protein phosphatase 2A to centrosomes and regulates mitotic spindle assembly. *Cell*, 128(1), 115-127.
- 179.** Schlereth, A., Becker, C., Horstmann, C., Tiedemann, J., Müntz, K. (2000). Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 51(349), 1423-1433.
- 180.** Seifert, M., McGregor, G., Eaglesham, G., Wickramasinghe, W., Shaw, G. (2007). First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae*, 6(1), 73-80.
- 181.** Seifried, A., Schultz, J., Gohla, A. (2013). Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS journal*, 280(2), 549-571.

- 182.** Sents, W., Ivanova, E., Lambrecht, C., Haesen, D., Janssens, V. (2013). The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS Journal*, 280(2), 644-661.
- 183.** Shetty, P., Atallah, M. T., Shetty, K. (2002). Effects of UV treatment on the proline-linked pentose phosphate pathway for phenolics and L-DOPA synthesis in dark germinated *Vicia faba*. *Process Biochemistry*, 37(11), 1285-1295.
- 184.** Shultz, R. W., Lee, T. J., Allen, G. C., Thompson, W. F., Hanley-Bowdoin, L. (2009). Dynamic localization of the DNA replication proteins MCM5 and MCM7 in plants. *Plant physiology*, 150(2), 658-669.
- 185.** Sivonen, K., Jones, G. (1999). Cyanobacterial toxins. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*, 1, 43-112.
- 186.** Smertenko, A. P., Chang, H. Y., Sonobe, S., Fenyk, S. I., Weingartner, M., Bögre, L., Hussey, P. J. (2006). Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *Journal of Cell Science*, 119(15), 3227-3237.
- 187.** Smith, R. D., Walker, J. C. (1996). Plant protein phosphatases. *Annual review of plant biology*, 47(1), 101-125.
- 188.** Spinner, L., Pastuglia, M., Belcram, K., Pegoraro, M., Goussot, M., Bouchez, D., Schaefer, D. G. (2010). The function of TONNEAU1 in moss reveals ancient mechanisms of division plane specification and cell elongation in land plants. *Development*, 137(16), 2733-2742.
- 189.** Stark, M. J., Black, S., Sneddon, A. A., Andrews, P. D. (1994). Genetic analyses of yeast protein serine/threonine phosphatases. *FEMS microbiology letters*, 117(2), 121-130.
- 190.** 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 (BBA)-Molecular Cell Research*, 1449(1), 101-106.
- 191.** Štraser, A., Filipič, M., Žegura, B. (2011). Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line. *Archives of toxicology*, 85(12), 1617-1626.
- 192.** Sugiura, M., Takeda, Y., Waterhouse, P., Small, I., Curtin, S., Millar, T. (2015). Nucleic Acids. Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (Eds). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 2nd Edition. UK: pp. 240-506.
- 193.** Suorsa, M., Järvi, S., Grieco, M., Nurmi, M., Pietrzykowska, M., Rantala, M., Kangasjarvi, A., Paakkanen, V., Tikkanen, M., Jansson, S., Aro, E. M. (2012). PROTON GRADIENT REGULATION5 is essential for proper acclimation of Arabidopsis photosystem I to naturally and artificially fluctuating light conditions. *The Plant Cell*, 24(7), 2934-2948..

- 194.** Szigeti, Z.M.; Jámbrík, K.; Roszik, J.; M-Hamvas, M.; Tándo, 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(3), 179-184.
- 195.** Templeton, G. W., Nimick, M., Morrice, N., Campbell, D., Goudreault, M., Gingras, A. C., Takemiya, A., Simazaki, K.I., Moorhead, G. B. (2011). Identification and characterization of AtI-2, an Arabidopsis homologue of an ancient protein phosphatase 1 (PP1) regulatory subunit. *Biochemical Journal*, 435(1), 73-83.
- 196.** Thompson, J. E., Legge, R. L., Barber, R. F. (1987). The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*, 105(3), 317-344.
- 197.** Tonks, N. K. (2013). Protein tyrosine phosphatases—from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *Febs Journal*, 280(2), 346-378.
- 198.** Toya, M., Takeichi, M. (2016). Organization of non-centrosomal microtubules in epithelial cells. *Cell Structure and Function*, 41(2), 127-135.
- 199.** Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberger, J., Bouchez, D., Caboche, M. (1995). Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature*, 375(6533), 676-677.
- 200.** Tuteja, N., Tran, N. Q., Dang, H. Q., Tuteja, R. (2011). Plant MCM proteins: role in DNA replication and beyond. *Plant molecular biology*, 77(6), 537-545.
- 201.** Uhrig, R. G., Labandera, A. M., & Moorhead, G. B. (2013). Arabidopsis PPP family of serine/threonine protein phosphatases: many targets but few engines. *Trends in plant science*, 18(9), 505-513.
- 202.** Van Dolah, F. M., Ramsdell, J. S. (1992). Okadaic acid inhibits a protein phosphatase activity involved in formation of the mitotic spindle of GH4 rat pituitary cells. *Journal of cellular physiology*, 152(1), 190-198.
- 203.** van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H., Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Reviews Genetics*, 2(3), 196-206.
- 204.** Van Leene, J., Boruc, J., De Jaeger, G., Russinova, E., De Veylder, L. (2011). A kaleidoscopic view of the *Arabidopsis* core cell cycle interactome. *Trends in plant science*, 16(3), 141-150.
- 205.** Van Zyl, W., Huang, W. E. I. D. O. N. G., Sneddon, A. A., Stark, M., Camier, S., Werner, M., Marck, K., Sentenac, A., Broach, J. R. (1992). Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 12(11), 4946-4959.

- 206.** Vandre, D. D., Wills, V. L. (1992). Inhibition of mitosis by okadaic acid: possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase. *Journal of Cell Science*, *101*(1), 79-91.
- 207.** Vantard, M., Cowling, R., & Delichère, C. (2000). Cell cycle regulation of the microtubular cytoskeleton. In *The Plant Cell Cycle* (pp. 147-159). Springer Netherlands.
- 208.** Vasas, G., Gaspar, A., Pager, C., Surányi, G., Máthé, C., Hamvas, M. M., Borbély, G. (2004). Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, *25*(1), 108-115.
- 209.** Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, G., Batta, G., Gyémánt, G., M-Hamvas, M., Máthé, C., Grigorszky, I., Molnár, E., Borbély, G. (2002). Capillary electrophoretic assay and purification of cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (blue-green *Sinapis* test). *Analytical biochemistry*, *302*(1), 95-103.
- 210.** Velich, I. (Ed.), (2001) *Növénygenetika*. Mezőgazda Kiadó, Bp.
- 211.** Vos, J., Pieuchot, L., Evrard, J.-L., Janski, N., Bergdoll, M., de Ronde, D., Perez, L.-H., Sardon, T., Vernos, I., Schmit, A.-C. (2008). The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *The Plant Cell*, *20*(10), 2783-2797.
- 212.** Wadsworth, P., Lee, W. L., Murata, T., Baskin, T. I. (2011). Variations on theme: spindle assembly in diverse cells. *Protoplasma*, *248*(3), 439-446.
- 213.** Walker, H. W. (2014). *Harmful algae blooms in drinking water: Removal of Cyanobacterial Cells and Toxins*. CRC Press.
- 214.** Walker, K. L., Müller, S., Moss, D., Ehrhardt, D. W., Smith, L. G. (2007). *Arabidopsis* TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis. *Current Biology*, *17*(21), 1827-1836.
- 215.** Wang, C. Y., Liu, L. N., Zhao, Z. B. (2013). The role of ROS toxicity in spontaneous aneuploidy in cultured cells. *Tissue and Cell*, *45*(1), 47-53.
- 216.** Wasteneys, G. O. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order?. *Journal of Cell Science*, *115*(7), 1345-1354.
- 217.** Wasteneys, G. O., Ambrose, J. C. (2009). Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends in cell biology*, *19*(2), 62-71.
- 218.** 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. *The Plant Cell*, *13*(8), 1929-1943.
- 219.** Weydert, C. J., Cullen, J. J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*, *5*(1), 51-66.

220. Whittington, A. T., Vugrek, O., Wei, K. J., Hasenbein, N. G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M. C., Wasteneys, G. O. (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature*, *411*(6837), 610-613.
221. Whitton, B. A. (1992). Diversity, ecology, and taxonomy of the cyanobacteria. In *Photosynthetic prokaryotes* (pp. 1-51). Springer US.
222. Wickstrom, M. L., Khan, S. A., Haschek, W. M., Wyman, J. F., Eriksson, J. E., Schaeffer, D. J., & Beasley, V. R. (1995). Alterations in microtubules, intermediate filaments, and microfilaments induced by microcystin-LR in cultured cells. *Toxicologic pathology*, *23*(3), 326-337.
223. Wiegand, C., Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and applied pharmacology*, *203*(3), 201-218.
224. Wolkoff, A.W.; Cohen, D.E. (2003). Hepatic transport of bile acids. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *284*, 175-179.
225. 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*(4), 691-715.
226. Wright, A. J., Gallagher, K., Smith, L. G. (2009). discordial and alternative discordial function redundantly at the cortical division site to promote preprophase band formation and orient division planes in maize. *The Plant Cell*, *21*(1), 234-247.
227. 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.
228. Xu, X. M., Zhao, Q., Rodrigo-Peiris, T., Brkljacic, J., He, C. S., Müller, S., Meier, I. (2008). RanGAP1 is a continuous marker of the Arabidopsis cell division plane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(47), 18637-18642.
229. Yabuuchi, T., Nakai, T., Sonobe, S., Yamauchi, D., Mineyuki, Y. (2015). Preprophase band formation and cortical division zone establishment: RanGAP behaves differently from microtubules during their band formation. *Plant signaling & behavior*, *10*(9), e1060385.
230. Yasuhara, H., Oe, Y. (2011). TMBP200, a XMAP215 homologue of tobacco BY-2 cells, has an essential role in plant mitosis. *Protoplasma*, *248*(3), 493-502.
231. Zhang, K., Diederich, L., John, P. C. (2005a). The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells can be satisfied by yeast Cdc25 protein tyrosine phosphatase. Implications for mechanisms of cytokinin response and plant development. *Plant Physiology*, *137*(1), 308-316.

- 232.** Zhang, K., Tsukitani, Y., John, P. C. (1992). Mitotic arrest in tobacco caused by the phosphoprotein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Plant and cell physiology*, 33(6), 677-688.
- 233.** Zhang, X., Li, X., Marshall, J. B., Zhong, C. X., Dawe, R. K. (2005b). Phosphoserines on maize CENTROMERIC HISTONE H3 and histone H3 demarcate the centromere and pericentromere during chromosome segregation. *The Plant Cell*, 17(2), 572-583.
- 234.** Zheng, B., Chen, X., & McCormick, S. (2011). The anaphase-promoting complex is a dual integrator that regulates both MicroRNA-mediated transcriptional regulation of cyclin B1 and degradation of Cyclin B1 during Arabidopsis male gametophyte development. *The Plant Cell*, 23(3), 1033-1046.
- 235.** Zhou, H. W., Nussbaumer, C., Chao, Y., DeLong, A. (2004). Disparate roles for the regulatory A subunit isoforms in Arabidopsis protein phosphatase 2A. *The Plant Cell*, 16(3), 709-722.
- 236.** Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whitwill, S., Keller, W., Fowke, L. C. (2002). Control of petal and pollen development by the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 in transgenic Brassica plants. *Planta*, 215(2), 248-257.

## 10. Függelék

### 10.1. A szerző fontosabb közleményei

#### a, Az értekezés alapját képező közlemények

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

**Impakt faktor: 3,698**

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

**Impakt faktor: 2,971**

#### b, Egyéb közlemények

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

**Impakt faktor: 3,455**

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

#### c, Konferencia előadások és poszterek:

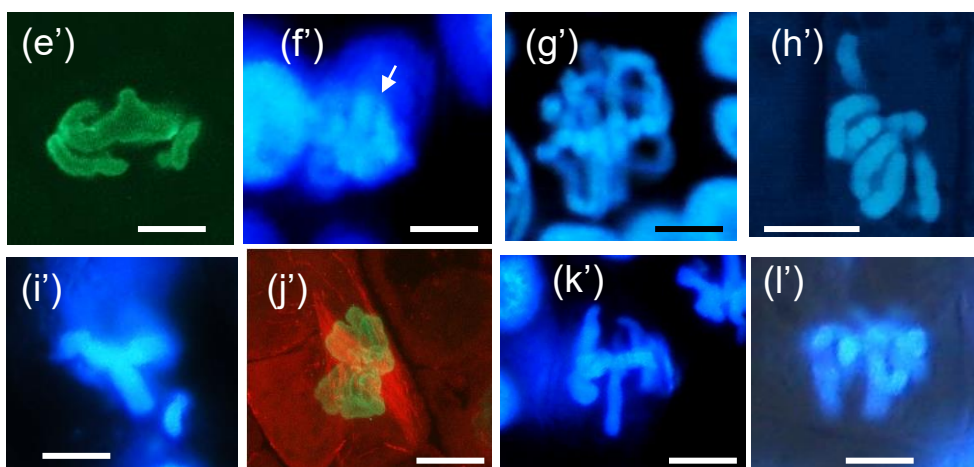
Máthé Cs., Beyer D., Hamvas M.M., **Garda T.**, Jambrovics K., Vasas G. (2015). The effect of microcystin\_LR on plant developmental events. Signalling in plant development (EMBO conference), Brno. Poster.

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

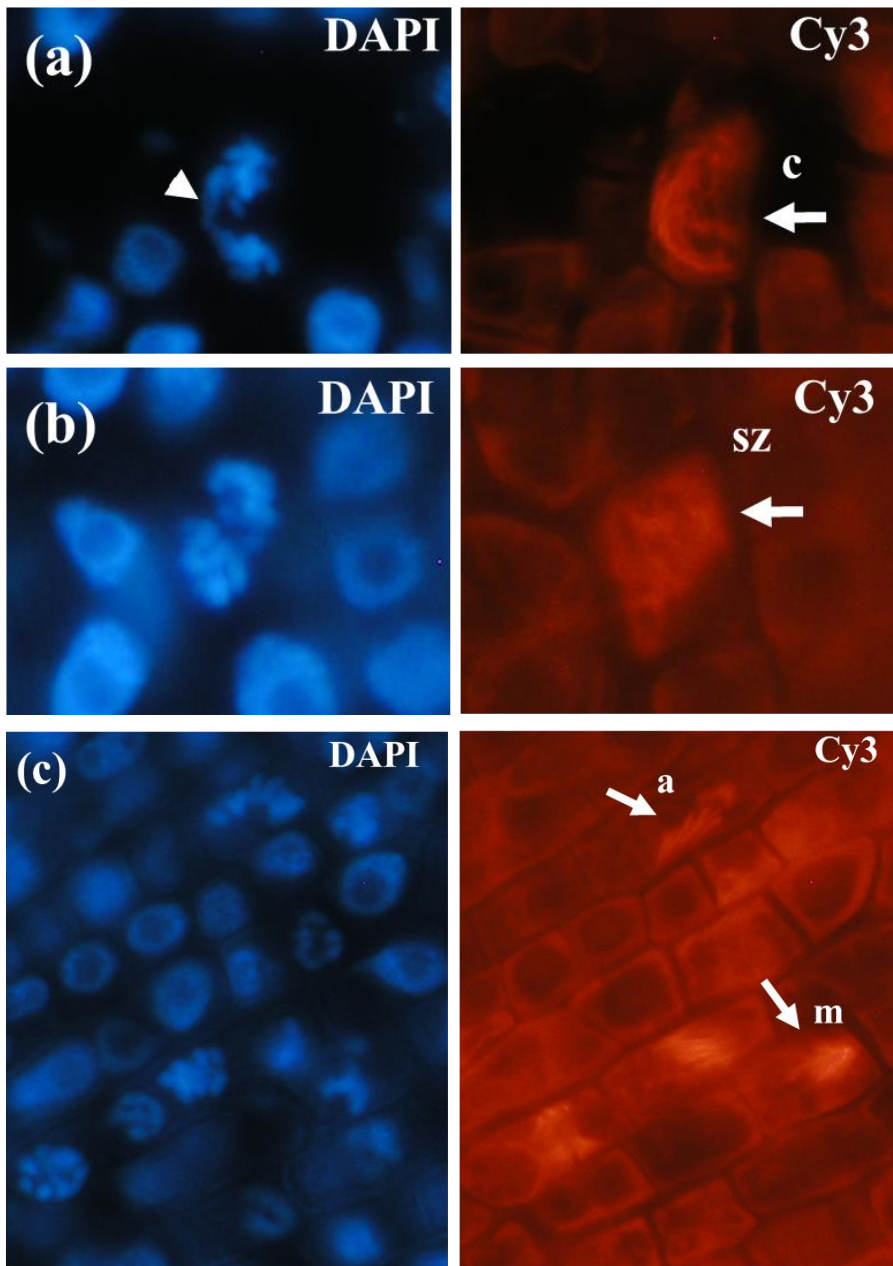
**Garda, T.**, Riba, M., Máthé, C., Beyer, D., Vasas, G. (2013). A cilindrospermopszin hatásmechanizmusának vizsgálata *Vicia faba* gyökérmerisztéma sejtekben. II. Növénybiológiai Workshop, Debrecen. Előadás.

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

## 10.2. Függelék ábra



**Függelék, 1. ábra:**A disszertáció 7. e-l ábrájához tartozó kromatin jelölések. (e') foszfohiszton H3S10ph jelölés. (f'-i') és (k', l') DAPI jelölés. (j') S-alakú orsó Z-stack projekciója (LSM mikroszkópia), foszfohiszton H3S10ph jelölés (zöld) és Mikrotubulusok (piros). A kromation szerveződés azt mutatja, hogy minden sejt metafázisban van, kivéve (k') amely metafázis-korai anafázisban van. Az (f') ábra esetében több sejt kromatin állománya látható, a nyíl a metafázisos sejtre mutat. Skála: 5  $\mu$ m.



**Függelék, 2. ábra:** Kombinált aszkorbinsav + 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$  MCY-LR kezelés hatására bekövetkező osztódási orsó rendellenességek *V. faba* oldalgyökér merisztéma szövetben. Anti- $\beta$ -tubulin jelölés mutatja a mikrotubulusokat (cy3), a kromoszómák hisztokémiai jelölése DAPI-val történt. „c” - C-alakú orsó; „sz” - Szétesett orsó; „a” – Aszimmetrikus orsó; „m” - Monopoláris orsó (nyilak). (a) Lemaradó kromoszóma (nyílhegy) Konvencionális fluoreszcens mikroszkópos képek:a, b, c, d.