



**A PP2A PROTEIN FOSZFATÁZOK SZEREPE A
SEJTOSZTÓDÁS SZABÁLYOZÁSÁBAN *ARABIDOPSIS
THALIANA* GYÖKÉRCSÚCS MERISZTÉMA SEJTEKBN**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Kelemen Adrienn

Témavezető:

Prof. Dr. Máthé Csaba
egyetemi tanár

Külső konzulens:

Dr. Martine Pastuglia
Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech,
Institut Jean-Pierre Bourgin for Plant Science (IJPB),
Versailles, Franciaország

DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2025

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi és Műszaki Tudományi Doktori Tanács, Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Növénybiológia és biotechnológiai programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi/műszaki doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Nyilatkozom arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Debrecen, 2025.

.....
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Kelemen Adrienn doktorjelölt 2021 - 2025 között a fent megnevezett Doktori Iskola Növénybiológia és biotechnológiai programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Nyilatkozom továbbá arról, hogy a tézisekben leírt eredmények nem képezik más PhD disszertáció részét.

Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 2025.

.....
a témavezető aláírása

**A PP2A PROTEIN FOSZFATÁZOK SZEREPE
A SEJTOSZTÓDÁS SZABÁLYOZÁSÁBAN
ARABIDOPSIS THALIANA GYÖKÉRCSÚCS
MERISZTÉMA SEJTEKBEN**

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

Írta: **Kelemen Adrienn** okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál doktori iskolája
(Növénybiológia és biotechnológiai programja) keretében

Témavezető: **Prof. Dr. Máthé Csaba**

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök:

Dr.

tagok:

Dr.

Dr.

Dr.

Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 2025.

Tartalomjegyzék

1.	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	1
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1.	A növényi protein foszfatázok	5
2.1.1.	<i>A protein foszfatázok általános jellemzői és csoportosítása</i>	5
2.1.2.	<i>A foszfoportein foszfatáz család részletesebb jellemzése</i>	5
2.1.3.	<i>Az 1-es típusú szerin/treonin specifikus foszfoportein foszfatázok (PP1)</i>	6
2.1.4.	<i>A 2A típusú szerin/treonin specifikus foszfoportein foszfatázok (PP2A)</i>	7
2.2.	Hiszton foszforiláció	11
2.2.1.	<i>A hiszton fehérjék általános jellemzői</i>	11
2.2.2.	<i>A hiszton H3 foszforiláció jellemzése, szerepe és szabályozása</i>	13
2.3.	Mikrotubulusok szerveződése és szabályozása a sejtosztódás alatt	17
2.3.1.	<i>Dinamikus mikrotubulus szerveződés a mitózisban</i>	17
2.3.2.	<i>A TTP komplex funkciója a növényi mikrotubulusok szabályozásában</i>	19
2.4.	Áttekintés a PP2A szabályozó szerepéről a sejtciklus folyamata során	21
2.5.	<i>Arabidopsis thaliana</i> modellnövény sajátosságai	25
2.5.1.	<i>A modellnövény általános jellemzése</i>	25
2.5.2.	<i>Arabidopsis thaliana</i> mutáns növények jellemzése.....	25
2.6.	A mikrocisztin-LR (MCY-LR) hatásairól	29
2.7.	ImageJ és Fiji szoftver alkalmazása mikroszkópos felvételek feldolgozására ... 32	
3.	ANYAG ÉS MÓDSZER	36
3.1.	A kísérletekhez használt csíranövények, nevelésük és toxinkezelés	36
3.1.1.	<i>Vizsgált <i>Arabidopsis thaliana</i> genotípusok</i>	36
3.1.2.	<i>Nevelési körülmények és toxinkezelés</i>	37
3.1.3.	<i>A mikrocisztin-LR tisztítása</i>	38
3.1.4.	<i>A toxin kezelési koncentrációk megválasztása</i>	39
3.2.	Protein foszfatázok (PP1 és PP2A) aktivitásának meghatározása	39
3.2.1.	<i>Fehérje kivonás</i>	39
3.2.2.	<i>Izotópos aktivitás mérés</i>	40
3.3.	Hisztokémiai és immunhisztokémiai jelölések	41
3.4.	Mikroszkópos felvételek készítése	44
3.4.1.	<i>Zeiss LSM 880 és Nikon Ti-E (Debreceni Egyetem)</i>	44
3.4.2.	<i>Leica SP8 (INRAE Kutatóközpont)</i>	45
3.5.	A mitotikus aktivitások elemzése	46
3.6.	A foszforilált hiszton H3 szint meghatározása	46
3.6.1.	<i>A fluoreszcens jelintenzitás 2D elemzése</i>	46
3.6.2.	<i>A fluoreszcens jelintenzitás 3D elemzése</i>	48
3.7.	Grafikai ábrázolások és statisztika	50

4.	EREDMÉNYEK	51
4.1.	A protein foszfatáz aktivitás (PP2A + PP1) változásai a különböző genotípusokban és toxinkezelés hatására	51
4.1.1.	<i>A kontroll genotípusokban mért protein foszfatáz aktivitások</i>	51
4.1.2.	<i>MCY-LR által kifejtett hatások a protein foszfatáz aktivitásokra</i>	53
4.2.	Mitotikus aktivitás változások a különböző genotípusok gyökerében és toxinkezelések következtében	57
4.2.1.	<i>A kontroll genotípusok mitotikus aktivitásának változása</i>	57
4.2.2.	<i>MCY-LR hatása a mitotikus aktivitásokra</i>	59
4.3.	A különböző PP2A mutációk és toxinkezelések hatása a reverzibilis hiszton H3 foszforilációra	62
4.3.1.	<i>A kontroll genotípusokban mért foszfo-hiszton H3 szintek</i>	62
4.3.2.	<i>MCY-LR hatása a reverzibilis hiszton H3 foszforilációra</i>	63
4.4.	A hiszton H3 foszforilációs jelek kvantifikálása félautomata 3D módszerrel	65
4.4.1.	<i>Az osztódó sejtek automata szegmentálása és felismerése</i>	65
4.4.2.	<i>A jelerősség csökkenés korrigálása a Z-mélységgel („HisCorrect”)</i>	68
4.4.3.	<i>A foszforilált hiszton H3 fluoreszcens jel intenzitás 3D mérése („HisMeasure”)</i> ..	71
4.4.4.	<i>A pH3S10 jel 3D eloszlása az Arabidopsis thaliana gyökércsúcs merisztéma sejtekben és az egyes mitotikus fázisok meghatározása („HisAnnot”)</i>	72
4.4.5.	<i>A makró program tesztelése PP2A és TTP komplex alegység mutáns növények foszfo-hiszton H3 szintjének vizsgálatával</i>	74
4.4.6.	<i>A makró program hatékonyságának tesztelése Col0 hesperadin kezelések következtében</i>	77
5.	DISZKUSSZIÓ	79
5.1.	A FASS és C3/C4 alegységek hozzájárulnak a protein foszfatáz 2A (PP2A) aktivitásához, valamint szabályozzák a mitotikus eseményeket	79
5.2.	A hiszton H3 foszforiláció félautomata kvantifikálása 3D-ben további és még pontosabb szabályozó folyamatot tár fel a sejtosztódás alatt	89
6.	ÖSSZEFOGLALÁS ÉS TOVÁBBI TERVEK	95
7.	ENGLISH SUMMARY	100
8.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108
9.	TÁMOGATÓK	109
10.	IRODALOMJEGYZÉK	110
11.	FÜGGELÉK	119
11.1.	Függelék ábrák	119
11.2.	A diquat (DQ) kezelések PP2A mutánsokon történő alkalmazása rávilágít a PP2A és az oxidatív stressz közötti összefüggésekre a sejtosztódás során az Arabidopsis thaliana gyökércsúcs merisztéma sejtekben	120
11.3.	Az értekezés témájában született publikációk	122

Rövidítések jegyzéke

γ H2A.X	hiszton H2A.X variáns foszforilált formája a szerin 129-es aminosavnál
γ TuRC	γ -tubulin gyűrű komplex
[³² P]-MLC20	³² P izotóppal jelzett 20 kDa molekulatömegű pulyka miozin könnyű lánc
<i>a1a2 (pp2aa1 pp2aa2)</i>	PP2A protein foszfatáz A „scaffolding” alegység mutáns növény, A1 és A2 izoforma dupla mutáció
<i>a1a3 (pp2aa1 pp2aa3)</i>	PP2A protein foszfatáz A „scaffolding” alegység mutáns növény, A1 és A3 izoforma dupla mutáció
<i>a2a3 (pp2aa2 pp2aa3)</i>	PP2A protein foszfatáz A „scaffolding” alegység mutáns növény, A2 és A3 izoforma dupla mutáció
ABA	abszcizinsav
Adda	3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-diénsav
AIOD	terület integrált optikai denzitása (<u>A</u> rea <u>I</u> ntegrated <u>O</u> ptical <u>D</u> ensity), a lemért fluoreszcens jelintenzitások átlaga 2D-ben
AOTF	akusztó-optikusan hangolt szűrő (<u>A</u> cousto- <u>O</u> ptic <u>T</u> unable <u>F</u> ilter)
APC/C	anafázis-promóteáló komplex
AtAUR1/AtAUR2/AtAUR3	<i>Arabidopsis thaliana</i> modellben azonosított Aurora kináz homológok
BSA	borjú szérum albumin
BY-2	dohányból (<i>Nicotiana tabacum</i>) származó szuszpenziós sejttenyészet (<u>B</u> right <u>Y</u> ellow)
C/LSM	konfokális /lézer pásztázó mikroszkópia (<u>C</u> onfocal <u>L</u> aser <u>S</u> canning <u>M</u> icroscopy)
<i>c3c4 (pp2ac3 pp2ac4)</i>	PP2A protein foszfatáz C katalitikus alegység mutáns növény, C3 és C4 izoforma dupla mutáció
CDK	ciklin-függő kináz
CDZ	kortikális osztódási zóna
CENH3	centromerikus hiszton H3 variáns
CI95	átlag 95%-os konfidencia intervallum
Col0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia ökotípus, vad-típusú modellnövény
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DCFH-DA	dikloro-dihidro-fluoreszcein diacetát
DMSO	dimetil-szulfoxid
DQ	diquat (1,1'-etilén-2,2'-bipiridilium)
DSP	kettős specificitású foszfatáz

EMS	etil-metán-szulfonát mutagenézis
FASS	PP2A foszfatáz B'' regulátor alegysége izoforma
<i>fass-15</i>	PP2A protein foszfatáz B'' regulátor alegység (FASS) mutáns növény, a mutáció enyhébb fenotipikus elváltozásokat váltott ki (gyengébb <i>fass</i> mutáns)
<i>fass-5</i>	PP2A protein foszfatáz B'' regulátor alegység (FASS) mutáns növény, a mutáció erősebb fenotipikus elváltozásokat váltott ki (erősebb <i>fass</i> mutáns)
HeZ	heterozigóta domináns mutánsok a B'' regulátor alegység (FASS) mutációjára nézve
HisAnnot	az egyes fázisokban lévő sejtek félautomata detektálásához használt ImageJ makró program
HisCorrect	a jelerősség csökkenés korrigálásához használt ImageJ makró program
HisMeasure	a pH3S10 jelintenzitás 3D mérésére használt ImageJ makró program
HPLC	magas nyomású folyadékkromatográfia
HZ	homozigóta recesszív mutánsok a B'' regulátor alegység (FASS) mutációjára nézve
I-1/I-2	Inhibitor-1/Inhibitor-2; természetes PP1 gátló szer
ICMT	interfázisos kortikális mikrotubulus hálózat
IntDen	<u>I</u> ntegrált <u>O</u> ptikai <u>D</u> enzitás, a lemért fluoreszcens jelintenzitások összege 3D-ben
K	kontroll, kezeletlen minta
KO	knock-out, vagyis teljes funkcióvesztéses mutáció
MAP	mikrotubulus-asszociált fehérje
MBD	mikrotubulus kötő domén a TRM fehérjékben
MCorr	metafázisos sejteken alapuló jelerősség csökkenés korrekciós módszer a Z-mélységben
MCY-LR	mikrocisztin-LR
Mdha	N-metildehidroalanin
MES	2-morfolino-etánszulfonsav puffer
MI	mitotikus index
MS*	szacharóz tartalmú módosított Murashige-Skoog táptalaj, Gamborg vitaminokkal
MT	mikrotubulus
MTOC	mikrotubulus organizáló központ
MTSB	mikrotubulus stabilizáló puffer
PBS	foszfáttal puffereelt sóoldat
PFA	paraformaldehid

Phg	fragmoplaszt
phH3S10	foszforilált hiszton H3 a szerin 10-es aminosavnál
phH3S28	foszforilált hiszton H3 a szerin 28-as aminosavnál
phH3T11	foszforilált hiszton H3 a treonin 11-es aminosavnál
phH3T3	foszforilált hiszton H3 a treonin 3-as aminosavnál
phH3T32	foszforilált hiszton H3 a szerin 32-es aminosavnál
PIN	auxin efflux transzmembrán fehérje
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PMT	fotoelektron-sokszorozó cső
PP1	1-es típusú szerin/treonin specifikus foszfoprotein foszfatáz
PP2A	2A típusú szerin/treonin specifikus foszfoprotein foszfatáz
PP2A-A1/A2/A3	PP2A foszfatáz A „scaffolding” alegység izoformái
PP2A-C3/C4	PP2A foszfatáz C katalitikus alegység izoformái
PPB	preprofázisos köteg
PPM	fémion-függő foszfatáz
PPP	foszfoprotein foszfatáz
PTM	poszttranszlációs módosítás
PTP	tirozin specifikus foszfatáz
PVP	poli-vinil-pirrolidon
RAM	gyökércsúcs merisztéma sejt
Raw	korrekció nélküli jelintenzitás mérése a Z-mélységben
Rb/RBR	retinoblasztóma fehérje/ növényi retinoblasztóma-rokon fehérje
RCN1	PP2A-A1 „scaffolding” alegység izoforma
ROS	reaktív oxigén formák
SE	standard hiba
Sp	mitotikus osztódási orsó
STP	szerin/treonin specifikus foszfatáz
T-DNS	(<i>Agrobacterium</i>) transzfer DNS
TOPP	<i>Arabidopsis thaliana</i> típusú PP1
TRM	<u>T</u> ON1 <u>R</u> ecruiting <u>M</u> otif
<i>trm678 (trm6 trm7 trm8)</i>	TTP komplex TRM fehérje alegység mutáns növény, TRM6 TRM7 és TRM8 izoforma tripla mutáció
TTP komplex	<u>T</u> ON1- <u>T</u> RM- <u>P</u> P2A fehérje komplex

1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A fehérjéken történő poszttranszlációs módosítások, mint például a foszforiláció univerzális szabályozó szerepet játszik a különböző élőlények számtalan biológiai folyamatában. A protein foszfatázok defoszforiláció révén kulcsszerepet töltenek be a sejten belüli jelátviteli folyamatok finomhangolásában, gyakran a kinázokkal ellentétes hatást kifejtve, amelyek pedig a fehérjék foszforilációját végzik (Smith & Walker, 1996). A sejtosztódás szabályozásának bonyolult folyamataiban számos fehérje vesz részt, ezek közül a kinázok és foszfatázok játsszák a legmeghatározóbb szerepet. A kezdeti sejtciklus kutatások a kinázokat helyezték fókuszba, újabban pedig egyre nagyobb figyelmet kap a protein foszfatázok vizsgálata is a sejtciklus szabályozásában betöltött specifikus szerepük miatt (Wlodarchak & Xing, 2016).

A kutatásaink legfőbb célja a 2A típusú foszfoprotein foszfatáz (PP2A) szabályozó szerepének a vizsgálata a sejtosztódás során *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) gyökércsúcs merisztéma sejtekben. Vizsgáltuk a PP2A szabályozó szerepét a mitózis és a testvérkromatida szegregáció pontos időzítésében és lefolyásában (Kelemen *et al.*, 2025a,b).

A PhD kutatómunkám középpontjában a szomatikus testi sejtek osztódása (mitózis) során a reverzibilis hiszton H3 foszforiláció szabályozás vizsgálata állt. A hiszton fehérjék számos poszttranszlációs módosításokon mehetnek keresztül, reverzibilisen foszforilálódhatnak a protein kinázok és foszfatázok által szabályozott módon, befolyásolva a kromoszóma kondenzációt és testvérkromatidák szétválását szabályozó folyamatokat (Houben *et al.*, 2007). Egy foszfo-specifikus hiszton H3 ellenanyag segítségével (Henzel *et al.*, 1997), valamint konfokális mikroszkópia alkalmazásával vizsgálhatjuk a foszforiláció mértékét különböző *A. thaliana* genotípusokban. A pontos folyamat megértése kulcsfontosságú, hisz a kromoszóma szegregáció pontos időzítése nagy befolyással lehet a sejtosztódás sikeres lefolyásában, bármi hiba vagy befolyásoló tényező súlyos következményeket válthat ki a növény fejlődése során.

Az Aurora kináz szerepe már jól ismert ebben a szabályozási folyamatban (Houben *et al.*, 2007), azonban, hogy pontosan melyik foszfatáz defoszforilálja a hiszton H3-at a testvérkromatida szegregáció után még nem teljesen ismert. Különböző protein foszfatáz gátlók alkalmazásával végzett kísérletek arra utalnak, hogy feltételezhetően a PP2A játszik kulcsfontosságú szerepet (Beyer *et al.*, 2012; Máthé *et al.*, 2013b; Garda *et al.*, 2016). A PP2A holoenzim három alegységet tartalmaz: C katalitikus alegység, A „scaffolding” alegység és az igen változatos B regulátor alegység. Mindegyik alegységnek több izoformája ismert, melyek

különböző kombinációkban határozzák meg az enzim szubsztrát specificitását és a különböző biológiai folyamatokban betöltött szerepét (Luan, 2003). Az *in vivo* protein foszfatáz aktivitás meghatározására radioizotópos biokémiai eljárásokat alkalmaztunk.

Elsőként genetikai megközelítést alkalmaztunk és az *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcs merisztéma sejteket vizsgáltunk Columbia ökotípus esetében, vad-típusú és PP2A mutáns háttérrel rendelkező növényekben, beleértve egy dupla mutánst a C3 és C4 katalitikus alegységre (*pp2ac3 pp2ac4*), valamint a FASS regulátor alegység két mutáns vonalát is (*fass-15* és *fass-5*), amelyek különböző mértékű fejlődési rendellenességeket mutattak. Azért választottuk a PP2A-C3 és C4 katalitikus alegységek tanulmányozását, mert döntően ez a két izoforma határozza meg a teljes PP2A aktivitást lúdfüben és szabályozzák a kortikális mikrotubulusok dinamikáját a FASS regulátor alegységgel kölcsönhatásban (Spinner *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2018). A PP2A lokalizációjában és szubsztrát specificitásában betöltött szerepük mellett több B alegység is befolyásolja a holoenzim aktivitását (Máthé *et al.*, 2023). A FASS szabályozó alegységről már ismert, hogy kulcsszerepet játszanak a sejtosztódás szabályozásában a mikrotubulusok szerveződésében, azonban más funkciója még nem ismert a sejtciklus szabályozása során (Spinner *et al.*, 2013). További mitotikus szabályozási mechanizmusa (kölcsönhatásban a C3/C4 alegységekkel) a feltételezéseink szerint az lehet, hogy modulálja a sejtciklus szabályozó fehérjék, így a hiszton H3 foszforilációs állapotát.

Ezután farmakológiai megközelítést alkalmaztunk és mikrocisztin-LR (MCY-LR) cianotoxinnal kezeltük a mintákat, amely egy specifikus PP2A/PP1 gátló (MacKintosh & Diplexcito, 2010; Máthé *et al.*, 2013a). Az MCY-LR által indukált protein foszfatáz aktivitásbeli vizsgálatok kimutatták a PP2A/PP1 és egyéb mitotikus folyamatok (pl. mitotikus orsó változások, hiszton H3 hiperfoszforiláció) közötti összefüggéseket több modellnövényben (Beyer *et al.*, 2012; Máthé *et al.*, 2013b; Garda *et al.*, 2016). A PP2A mutánsok és PP2A inhibitor kombinált használatával még pontosabb betekintést nyerhetünk a protein foszfatáz aktivitás szabályozásába, valamint tanulmányozhatjuk a szerepét a mitotikus aktivitásokban és a hiszton H3 reverzibilis foszforilációjában. A toxinkezelés következtében nemcsak egy specifikus PP2A komplex funkciója gátolt, hanem az összes PP2A és PP1 katalitikus alegység izoformája gátlás alá kerül (MacKintosh & Diplexcito, 2010), így potenciális kapcsolatokat és kompenzációkat is vizsgálhatunk a különböző protein foszfatázok között.

A PhD képzésem alatt együttműködést alakítottam ki a versailles-i INRAE Kutatóközpont, Jean-Pierre Bourgin for Plant Science (IJPB) Intézetének SPACE

(Spatial Control of Cell Division) kutatócsoportjával Franciaországban. Ennek a kollaborációnak két fő célja volt: egyrészt tudományos szempontból közös kutatási célokat szolgált, mivel ez a kutatócsoport a TTP foszfatáz komplex (TON1-TRM-PP2A komplex) sejtosztódás szabályozásában betöltött szerepét vizsgálja; másrészt technikai oldalról lehetőséget adott arra, hogy mélyebb betekintést nyerjek a mikroszkópos képelemzés és kvantifikáció magas szintű, fejlett módszereinek alkalmazásába. A kutatások alatt vizsgáltuk, hogy milyen összefüggés van a hiszton H3 foszforiláció szabályozása és a TTP komplex szerepe között ebben a folyamatban. A három hónapos versailles-i tartózkodásom alatt és miután visszatértem Magyarországra, részt vettem egy fejlett félautomata 3D képelemző módszer kidolgozásában a Fiji szoftverben (Schindelin *et al.*, 2012) Dr. Martine Pastuglia irányításával, amellyel pontosabban vizsgálhattuk a hiszton H3 foszforilációs szabályozását különböző TTP komplex mutáns növényekben.

Az elérhető genetikai bizonyítékok alátámasztják a PP2A kulcsfontosságú szerepét számos fiziológiai folyamatban. Érdekes módon a PP2A viselkedhet pozitív vagy negatív regulátorként ugyanabban a folyamatban, illetve egy szimpla alegység is már számos folyamatot szabályozhat. Ez a hatalmas funkcióbeli változatosság a PP2A strukturális tulajdonságaiból ered. Bár számos információ áll rendelkezésre a különböző PP2A alegységek szerepéről a különféle élettani folyamatokban, a mögöttes molekuláris mechanizmusokról – néhány kivételtől eltekintve – még keveset tudunk. Ehhez meg kell határozni, hogy pontosan melyek azok a fehérjék, amit a PP2A defoszforilál és fontos meghatározni a PP2A komplex pontos összetételét különböző élettani körülmények között (Cortelezzi *et al.*, 2025).

Ezek alapján kísérleteink az alábbi kérdések tanulmányozására irányultak:

- 1.) A C3/C4, illetve a FASS alegység funkcióinak a kiesése hogyan befolyásolja a teljes protein foszfatáz aktivitását?
- 2.) Milyen szerepet játszanak ezek az alegységek a mitotikus aktivitás szabályozásában, illetve hogyan befolyásolják a folyamat megfelelő végbemenetelét? Vajon ezek a PP2A komplex alegységek, amelyek közvetlenül vesznek részt a hiszton H3 defoszforilációjában a kromoszóma szegregáció után?
- 3.) Van-e összefüggés a PP2A protein foszfatáz aktivitás megváltozása és a mitózist szabályozó folyamatok, nevezetesen a reverzibilis hiszton H3 foszforilációja között?

- 4.) A FASS és a C3/C4 alegység mellett milyen szerepet játszik a PP2A-A strukturális alegysége a hiszton H3 foszforiláció szabályozásában?
- 5.) A FASS a TTP komplex egyik alegysége, melyről ismert, hogy kulcsfontosságú szerepet tölt be a sejtosztódás szabályozásában, nevezetesen a kortikális mikrotubulus kötegek kialakításában és a sejtosztódás irányának meghatározásában. Milyen más TTP komplex alegység vehet részt a reverzibilis hiszton H3 foszforiláció szabályozásában, ezáltal befolyásolva a mitózis pontos végbemenetelét nemcsak a mikrotubulusokon keresztül, hanem a kromoszóma szegregációval összefüggésben is?

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A növényi protein foszfatázok

2.1.1. A protein foszfatázok általános jellemzői és csoportosítása

A fehérje foszforiláció egy jelentős reverzibilis poszttranszlációs módosítás, amely során protein kinázok az ATP molekulából származó γ -foszfátcsoportot a célfehérjék oldalláncaira viszik át. Ezzel szemben a protein foszfatázok eltávolítják ezeket a foszfátcsoportokat a foszforilált fehérjékről (defoszforilálják). A szubsztrát specificitásuk, katalitikus mechanizmusuk és inhibitorokra való érzékenységük alapján az eukarióta protein foszfatázokat négy fő csoportba sorolhatjuk: foszfoprotein foszfatázok (PPP), fémion-függő foszfatázok (PPM), tirozin (Tyr) specifikus foszfatázok (PTP), valamint aszparaginsav (Asp)-függő foszfatázok (Bheri *et al.*, 2021). A PPP és PPM szerin/treonin specifikusak (STP), míg a PTP és Asp-függő enzimek lehetnek tirozin-, szerin/treonin-, vagy kettős specificitású foszfatázok (DSP). (Corteleezi *et al.*, 2025). A PPP család tagjai az eukarióták körében erősen konzerváltak, képviselői a PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 és PP7. A PPM foszfatázok mangán (Mn^{2+}) vagy magnézium (Mg^{2+}) ionoktól függenek, úgymint a PP2C és a piruvát-dehidrogenáz-foszfatáz (Shi, 2009). A PPP és PPM családok hasonló térszerkezeti felépítéssel rendelkeznek, ami egy közös katalitikus mechanizmusra utal, azonban szekvenciahasonlóságot nem mutatnak, így külön evolúciós úton fejlődhettek (Uhrig *et al.*, 2013; Bheri *et al.*, 2021). A PTP-k egyedi szerkezete és eltérő katalitikus mechanizmusa, illetve a szekvencia homológia hiánya azt jelzi, hogy ezek az STP-éktől függetlenül fejlődtek (Bheri *et al.*, 2021). Érdekes, hogy a legtöbb élőlényben a protein foszfatázok katalitikus alegységeinek száma jóval elmarad a protein kinázoké mögött. Lúdfű esetében például több mint 1000 kinázzal szemben mindössze 150 protein foszfatáz katalitikus alegységet találunk. Mégis a foszfatázok szubsztrát specificitása vetekszik a kinázokéval, főként a rendkívül változatos szabályozó alegységeknek köszönhetően (Uhrig *et al.*, 2013; Corteleezi *et al.*, 2025).

2.1.2. A foszfoprotein foszfatáz család részletesebb jellemzése

Az eukarióta sejtek fehérje defoszforilációját az esetek 80%-ban a PPP család tagjai katalizálják (Corteleezi *et al.*, 2025), központi szerepet játszanak számos celluláris folyamatban, beleértve az anyagcsere, sejtciklus, fejlődés, valamint stressz- és hormonális jelátviteli útvonalak szabályozását (Farkas *et al.*, 2007). A PPP családba tartozó enzimek katalíziséhez két fémion szükséges,

jellemzően mangán (Mn^{2+}) vagy vas (Fe^{2+}) (Bheri *et al.*, 2021). Az *A. thaliana* genom 26 PPP katalitikus alegységet kódol, ami a PP1, PP2A és több növény specifikus enzimhez is kapcsolódik (Farkas *et al.*, 2007). A PP2B fontos kalcium (Ca^{2+})-függő foszoprotein foszfatáz gombákban és állatokban (Bheri *et al.*, 2021), de a növényekben még nem teljesen tisztázott a jelenlétük (Uhrig *et al.*, 2013; Bheri *et al.*, 2021). Azonban további növény specifikus protein foszfatázokat is azonosítottak, amelyek állati szervezetben hiányoznak. Ezek közé tartozik Kelch-szerű ismétlődő doméneket tartalmazó protein foszfatázok (PPKL-k), valamint a Shewanella-szerű foszfatázok (SLP-k) (Uhrig *et al.*, 2013). A PPP család erősen konzervált központi „core” katalitikus doménje mellett egyes protein foszfatázok jellegzetes motívumokkal rendelkeznek a szekvenciájukban, például a mikrocisztin gátlást lehetővé tevő dokkoló motívum, amelyben egy reaktív cisztein (Cys) teszi lehetővé a mikrocisztin kovalens kötődését (Uhrig *et al.*, 2013).

A főbb szerin/treonin protein foszfatázokat eukarióta szervezetekben legelőször a biokémiai tulajdonságuk alapján osztályozták emlős sejtekben. Az 1-es típusú (PP1) protein foszfatázok közé azok az enzimek sorolhatók, melyek hőstabilak és az Inhibitor-1 (I-1) és Inhibitor-2 (I-2) – természetes PP1 gátló fehérjék – gátolják az aktivitásukat. Ha az I-1 és I-2 nem gátolta az enzimaktivitásukat, akkor 2-es típusú protein foszfatázokról beszélhetünk. A 2-es típusú protein foszfatázokat tovább osztották aszerint, hogy milyen feltételek mellett működnek: 2A típusú foszfatázok (PP2A) nem igényelnek kétértékű kationokat; 2B típusúak aktivitásukat a kalcium serkenti; illetve 2C típusúak működése magnézium-függő (Uhrig *et al.*, 2013).

2.1.3. Az 1-es típusú szerin/treonin specifikus foszoprotein foszfatázok (PP1)

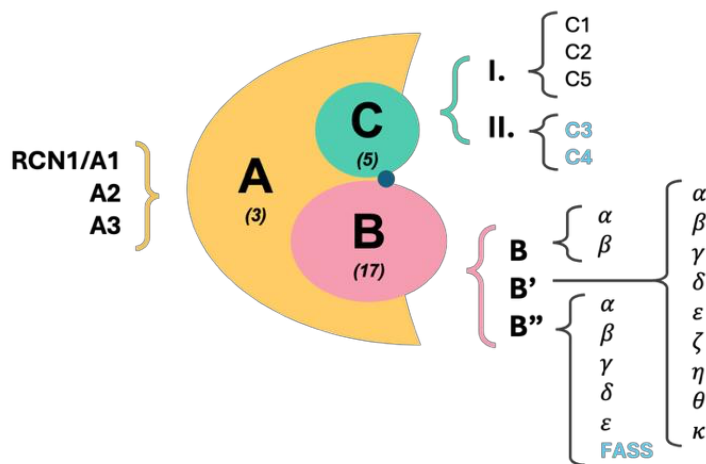
Az 1-es típusú protein foszfatázok (PP1) számos celluláris folyamatban kulcsszerepet játszanak mind állati és növényi sejtekben, többek között a meiózisban és a mitotikus sejtosztódásban, apoptózisban, fehérjeszintézisben, anyagcsere folyamatokban, citoskeleton organizációban, illetve membrán receptorok és ionszatórnák szabályozásában. A sokféle funkciójának megfelelően széles szubsztrát specifitást mutatnak, amelyek a specifikus biológiai válaszokat idézik elő (Shi, 2009). Erősen konzervált szekvenciával és struktúrával rendelkeznek az eukarióták körében; az állati és növényi PP1-k 70%-os azonosságot mutatnak a központi katalitikus doménben. A PP1 katalitikus alegysége (~37 kDa) egy szabályozó alegységgel (R alegység) komplexet alkot, így működőképes enzim jön létre. Legalább 100 feltételezett PP1-kötő R alegységet azonosítottak már. A katalitikus aktivitásukat, szubcelluláris lokalizációjukat és a

szubsztrát specificitásukat a szabályozó alegység határozza meg (Shi, 2009; Bheri *et al.*, 2021). Az elsődleges szubsztrát kötő hely a PP1 katalitikus helye, amely három szubsztrát kötő régió (a savas, a hidrofób és C-terminális árkok) metszéspontjánál helyezkedik el. Ezek a katalitikus központban egy jellegzetes Y-alakú aktív centrumot hoznak létre (Moura & Conde, 2019). A katalitikus alegység és a szabályozó fehérjék közötti legtöbb interakciót egy szabályozó fehérje-kötő motívum, az úgynevezett RVxF motívum biztosítja (Uhrig *et al.*, 2013), ahol néhány szubsztrát is kötődhet (Bheri *et al.*, 2021). A kölcsönhatások másodlagos motívumokon is létrejöhetnek, mint például miozin foszfatáz N-terminális eleme (MyPhoNE), a spinophilin kötő helye a C-terminális árokban (SpiDoC) vagy az Inhibitor-2 (I-2) kötő helye a hidrofób és a savas árkokban (IDoHA) (Bheri *et al.*, 2021). Számos növényfajban is azonosították a PP1-et (Farkas *et al.*, 2007), például lúdfűben kilenc PP1 (TOPP) izoforma található, melyek a sejtmagban és a citoszólban lokalizálódnak, azonban hiányoznak a plasztiszokból (Uhrig *et al.*, 2013). A TOPP-ok képesek számos fehérjével kölcsönhatásba lépni. Szerepet játszhatnak a sejtciklus szabályozásában, például a TOPP3 és a TOPP6 fehérjék tartalmaznak CDK kötő helyet (Farkas *et al.*, 2007). Ezenkívül részt vehetnek több jelátviteli útvonal szabályozásában. Például a TOPP1 negatív regulátora az abszcizinsav (ABA) jelátviteli útvonalaknak, míg a TOPP4 több jelátviteli útvonalban is szerepet játszik: elősegíti a giberellin (GA)-függő fehérjebomlást, gátolja az ubiquitin-mediált degradációt a fotomorfofenetikus jelátvitelben, szabályozza a PIN1 (auxin efflux transzmembrán fehérje) polaritását, részt vesz a növény epidermisz sejtek fejlődésében, valamint a MAPK-mediált immunválasz szabályozásában (Bheri *et al.*, 2021).

2.1.4. A 2A típusú szerin/treonin specifikus foszfoprotein foszfatázok (PP2A)

A minden eukariótában megtalálható 2A típusú protein foszfatáz (PP2A) számos kulcsfontosságú celluláris útvonalat szabályoz, beleértve az elsődleges és másodlagos metabolikus útvonalakat, a poláris auxin transzportot PIN fehérjék által, hormonális jelátviteli útvonalak, úgymint a brassinoszteroid (BR)- és ABA-jelátviteli útvonalak szabályozása, ezáltal a növényi fejlődés befolyásolása az embriogenezistől a vegetatív szervek morfogeneziséig. Továbbá a PP2A részt vesz a biotikus és az abiotikus stresszre adott válaszreakciókban, valamint a gombák és baktériumok ellen adott immunválaszban, illetve a levéltetvekkel szembeni rezisztenciában. Állati sejtekben már több szempontból bebizonyított a PP2A szerepe a sejtciklus szabályozásában (Wlodarchak & Xing, 2016), növényi sejtekben is egyre több kutatás mutatja a PP2A szerepét a sejtciklus szabályozásával

összefüggésben (Máthé *et al.*, 2023). A PP2A egy heterotrimer enzimkomplex, amely három alegységből áll (1. ábra): a 36 kDa-os C katalitikus alegységből, a 65 kDa-os A „scaffolding” vagy strukturális alegységből és a változatos, különböző molekulatömegű (54-130 kDa) B regulátor alegységből. A C és A alegységek alkotják a központi „core” enzimet, amelyhez különböző B regulátor alegységek kapcsolódhatnak. Ez a kölcsönhatás határozza meg a szubsztrát specificitást, a sejten belüli elhelyezkedést és az enzimaktivitást (Bheri *et al.*, 2021; Cortelezzi *et al.*, 2025). Emellett a PP2A oligomer komplexekké is össze tud állni különböző szabályozó molekulák kapcsolódása révén, beleértve aktivátorokat vagy inhibitorokat (Cortelezzi *et al.*, 2025).



1. ábra: A szerin/treonin foszfoprotein foszfatáz PP2A holoenzim szerkezeti felépítése és az alegységek csoportosítása

Sárga: A „scaffolding” strukturális alegység, melynek három különböző izoformája ismert (A1-3); **Zöld:** C katalitikus alegység, mely további két alcsaládba osztható, összesen öt izoforma ismert (C1-5); **Rózsaszín:** B regulátor alegység, mely növények esetében további három különálló alcsaládra osztható (B, B', B''), összesen 17 izoformája ismert *Arabidopsis thaliana* esetében. **Kékkel** jelölve láthatóak a kutatásunk során alaposabban vizsgált alegységek. Zárójelben az alegységeket kódoló gének száma lúdfüben. (Elshobaky *et al.*, 2023 alapján)

A C katalitikus alegység igen konzervált számos fajban a gombáktól kezdve az emlősökig. *A. thaliana* esetében a C katalitikus alegység két alcsaládba sorolható: I-es alcsaládban található a C1, C2 és C5 alegység, míg a II-es alcsaládba sorolható a C3 és C4 (Yoon *et al.*, 2018; Bheri *et al.*, 2021; Máthé *et al.*, 2023; Cortelezzi *et al.*, 2025). A két alcsalád között a szekvencia hasonlóság több mint 80%, alcsaládon belül pedig a tagok >95%-os szekvencia azonossággal rendelkeznek, számos konzervált doménnel és aminosav maradvánnyal, melyek a B szabályozó alegység kapcsolódásában vesznek részt. A két alcsalád az A strukturális alegység kötődéséért felelős doménben különbözik, mely régiók

kulcsfontosságúak a funkcionálisan eltérő PP2A holoenzimek kialakításában (Bheri *et al.*, 2021; Cortelezzi *et al.*, 2025). Az I-es katalitikus alegység alcsaládnak fontos szerepe van a stresszválaszok szabályozásában, míg a II-es alcsaládba tartozó katalitikus alegységgel rendelkező PP2A enzimek a mikrotubulusok szerveződésében, a PIN auxin efflux transzport fehérjék defoszforilációjában vagy a fényfüggő nitrát-reduktáz szabályozásában vesznek részt (Máthé *et al.*, 2023). A PP2A C alegységeinek aktív helye erősen konzervált aminosav maradékot tartalmaz, amelyek kelát kötést képeznek két, a katalitikus működéshez nélkülözhetetlen fémionnal. A C alegység katalitikus doménje homológiát mutat a PP1 katalitikus doménjével. Ezenkívül a katalitikus domén tartalmaz egy egyedi motívummal (TPDYFL) ellátott C-terminális farki véget. A C-terminálison egy leucin aminosav karboxil csoportjának metilálása szükséges a B szabályozó alegységek A-C dimerhez való kötődéséhez, elősegítve a működőképes PP2A holoenzimek összeállítását (Bheri *et al.*, 2021; Cortelezzi *et al.*, 2025).

Az A „scaffolding” alegység 15 tandem ismétlődő α -hélixes HEAT (huntingtin-elongation-A subunit-TOR) motívumból áll, amelyek mindegyike 39 aminosavat tartalmaz és ezek együtt egy patkó alakú vázaszerkezetet alkotnak. A HEAT ismétlődésekben található konzervált hurkok fontos szerepet játszanak mind a C, mind a B alegységek kötődésében. *A. thaliana* esetében három különböző A alegység izoformát azonosítottak: ROOTS CURL IN NAPHTHYLPHTHALAMIC ACID 1 (RCN1)/A1, A2 és A3 (Bheri *et al.*, 2021; Cortelezzi *et al.*, 2025). Az A alegység izoformák között 86%-os hasonlóság tapasztalható, és a legtöbb aminosav maradvány erősen konzervált az eukariótákban, azonban növény specifikus aminosav maradékok is megtalálhatóak. Az RCN1 pozitívan szabályozza a PP2A aktivitást a csíranövényekben és az RCN1 izoformát tartalmazó PP2A enzimkomplexek specifikus szabályozó funkciókat látnak el. Bár a PP2A-A2 és PP2A-A3 génexpressziós mintázatai hasonlóak, ezen gének működésének kiesése nem befolyásolja jelentősen a foszfatáz gátlókkal szembeni érzékenységet és nem eredményez markánsan eltérő mutáns fenotípusokat sem. Ezzel szemben az *rcn1* mutánsok erőteljes fejlődési rendellenességei arra utalnak, hogy ez az alegység kulcsfontosságú a foszfatáz aktivitás szabályozásában, míg a másik két izoforma funkciója főként RCN1 hiányában érvényesül (Zhou *et al.*, 2004; Bheri *et al.*, 2021).

A változatos B szabályozó alegységek felelősek a PP2A komplexek különböző lokalizációjáért, az enzim aktivitásáért és szubsztrát specifikusáért (Máthé *et al.*, 2023). A B alegységeket egymástól független és szerkezetileg különböző géncsalád kódolja. Növények esetében három alcsalád jellemző: B, B' és B''. Ez a három konzervált a növények és állatok között, azonban állatok esetében

még megtalálható a B''' alcsalád. Az *Arabidopsis thaliana* genomja kettő, kilenc, illetve hat gént tartalmaz a B, B' és B'' alegységekhez (részletesen az *1. ábrán*), vagyis a B regulátor alegységnek 17 izoformája ismert lúdfüben, így ~255 különböző PP2A heterotrimer enzimkomplex jöhet létre (Bheri *et al.*, 2021; Máthé *et al.*, 2023; Cortelezzi *et al.*, 2025). Az alcsaládok számos tagjai között minimális homológia figyelhető meg (Máthé *et al.*, 2023). Az összes eukarióta B szabályozó alegység család a központi régiójukban két jól konzervált A alegység kötő doménnel (ASBD1 és ASBD2) rendelkezik, ami szükséges az A-C dimerral való kölcsönhatáshoz (Bheri *et al.*, 2021; Máthé *et al.*, 2023; Cortelezzi *et al.*, 2025). A konzervált régiókon kívül a családok egyedi strukturális jellemzőket is mutatnak. A B alegység család izoformái számos WD40 ismétlődő szakaszt tartalmaznak, a B' család tagjai nyolc HEAT ismétlést tartalmazó B56 doménnel rendelkeznek és variabilitást mutatnak az N- és C-terminális régiójukban. A B'' család tagjaira kalcium (Ca²⁺) kötő motívumok, az EF motívumok jellemzőek (Bheri *et al.*, 2021; Cortelezzi *et al.*, 2025).

A B'' regulátor alegység családba tartozik a FASS/TON2, ami széles körben tanulmányozott lúdfüben. A FASS képes kölcsönhatásba lépni mind a három A strukturális alegység izoformával, illetve a TTP komplex részeként (lásd [2.3.2 alfejezet](#)) a C3 és C4 katalitikus alegységekkel alkot komplexet. A TTP komplex tagjaként a FASS regulátor alegységet tartalmazó holoenzim a kortikális mikrotubulusokhoz lokalizálódik és szerepet játszik a sejtsztódás szabályozásában. A növényi mikrotubuláris (MT) citoskeleton dinamikájának szabályozása egyértelműen magában foglalja a fehérjék foszforilációját és defoszforilációját; az MT-PP2A kölcsönhatáshoz szükség van a B'' regulátor alegységre (Camilleri *et al.*, 2002; Spinner *et al.*, 2013; Schaefer *et al.*, 2017; Máthé *et al.*, 2023). A katalitikus alegység II-es alcsaládba tartozó tagjai a FASS-al kapcsolódva így szintén a kortikális mikrotubulus szabályozásában töltenek be szerepet (Yoon *et al.*, 2018).

A PP2A alegységeinek *in silico* lokalizációs vizsgálata azt mutatta, hogy a C katalitikus alegység leginkább a citoszólban lokalizálódik, míg az A „scaffolding” és a B szabályozó alegységek elhelyezkedése a sejten belül igen változatos lehet. Az A „scaffolding” alegység tagjai megtalálhatóak a citoszólon kívül a plazma membránban, Golgi készülékben, az endoplazmatikus retikulumban vagy a kloroplasztban. A B regulátor alegység család tagjai ezen kívül még felfedezhetők a nukleuszban, citoskeletonhoz kötötten, plasztiszokban vagy a mitokondriumokban. Az A és B alegységek változatossága alapvetően meghatározza a holoenzim különböző sejten belüli elhelyezkedését és szubsztrát specifikitását (Cortelezzi *et al.*, 2025). A lehetséges holoenzim kombinációk által

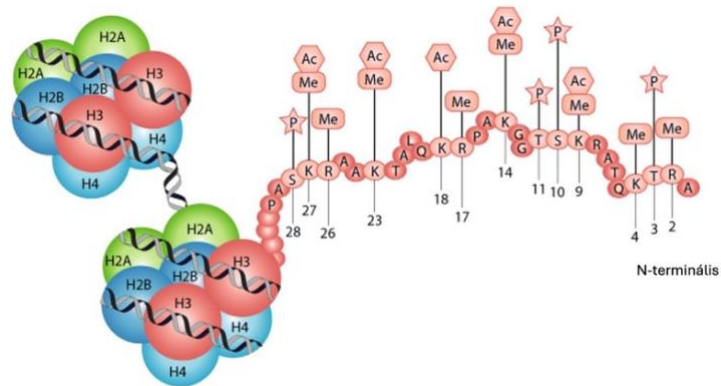
biztosított funkcionális sokféleségen túl a PP2A aktivitását posztranzlációs módosítások és szabályozó fehérjék is tovább befolyásolják, például a katalitikus alegység TPDYFL motívum metilációja, ami megkönnyíti a B alegységek kötődését a „core” dimerhez, vagy a TAP46 (46 kDa-os foszfatáz-asszociált fehérje) szabályozó fehérje kötődése a C alegységhez enzimátikus gátlást okoz búzában (Cortelezzi *et al.*, 2025).

2.2. Hiszton foszforiláció

2.2.1. A hiszton fehérjék általános jellemzői

A kromatin egy rendkívül jól szervezett eukarióta DNS-fehérje komplex, amelyekben a DNS gyöngysorhoz hasonlóan szabályosan elhelyezkedő nukleoszómákra csavarodik (Nunez-Vazquez *et al.*, 2022). A DNS kromatinná tömörülése dinamikusan szabályozza a genetikai információ kifejeződését és fenntartását (Fuchs *et al.*, 2006). Minden nukleoszómában ~147 bázispárnyi DNS szakasz csavarodik fel egy nyolc hiszton fehérjéből álló oktamer köré. A központi „core” hisztonok – H2A, H2B, H3 és H4 – két H2A-H2B dimert, illetve egy H3-H4 tetramert alkotnak (Nunez-Vazquez *et al.*, 2022). A „linker” hiszton H1 kapcsolatot teremt a nukleoszóma központi fehérjei és a linker DNS között, elősegítve a nukleoszómák közötti kölcsönhatásokat és a kromatin kondenzációt (Foroozani *et al.*, 2022). Az evolúció során a központi hiszton fehérjék fokozatosan fejlődtek ki archeális (ösbaktérium) őseikből és négy különálló alegységgé alakultak, amelyek a nukleoszóma jellemző oktamerét alkotják (Nunez-Vazquez *et al.*, 2022). Érdekes módon a hiszton H1 és annak variánsai eltérő evolúciós eredetűek, mint a „core” hisztonok: ezek nem archeális, hanem eubaktériális fehérjékből alakultak ki az evolúció során (Foroozani *et al.*, 2022). A központi hisztonok mindegyike egy globuláris doménnel rendelkezik, ami biztosítja a különböző hisztonok közötti kölcsönhatásokat az oktameren belül. Emellett a nukleoszóma felületéről kinyúlik egy ~20-35 aminosav hosszúságú terminális szakasz, amelyet „hiszton farkaknak” (N-terminális farkak) nevezünk (Zhang *et al.*, 2014). A hiszton-hiszton és hiszton-DNS kölcsönhatások biztosítják a nukleoszóma stabilitását, míg a hiszton farkakon számos posztranzlációs módosítások (PTM) mehetnek végbe és különböző fehérjék kötőhelyét biztosítják (Foroozani *et al.*, 2022). A hisztonok N-terminális farki végeiken, különösen a H3 és H4 esetében, számos reverzibilis PTM történhet, többek között foszforiláció, acetiláció, metiláció, ubiquitináció, sumoiláció stb. (2. ábra). A hisztonok posztranzlációs módosításainak kombinációja alkotja a „hiszton kódot”, amely nemcsak a hisztonok és a DNS közötti kölcsönhatások biofizikai tulajdonságait képesek

megváltoztatni, hanem közvetlenül szabályozza a különféle fehérjék hozzáférését, és információt szolgáltat a kromatin transzkripció állapotáról (aktív vagy gátolt) (Sawicka & Seiser, 2012).



2. ábra: Posztranszlációs módosítások a hiszton H3 N-terminális farki végén

Rövidítések: Ac – acetiláció; Me – metiláció; P – foszforiláció

(Bode & Dong, 2005)

A hiszton család egyes paralóg (nem-allélikus) génjei kódolhatnak teljesen azonos fehérjéket, vagy egymáshoz hasonló, de eltérő fehérje izoformákat is, amelyeket általában „hiszton variánsoknak” nevezünk. A hiszton variánsok kulcsszerepet töltenek be számos különféle biológiai folyamatban: transzkripció, kromoszóma szegregáció, DNS javítás és rekombináció, kromatin átrendeződés, stb. Az úgynevezett kanonikus hisztonok – vagyis a fő, szabályosan előforduló, „klasszikus” hiszton fehérjék, amelyek általánosan jelen vannak és alapvető funkciókat látnak el – szintézise és kromatinba történő beépülése az állatok és növények esetében is összefügg az S fázis során zajló DNS szintézissel, ahol a replikációs villa mögött ezek a hisztonok nukleosómákká szerveződnek. Ezzel szemben a hiszton variánsok a sejtciklus bármely szakaszában, a DNS szintézistől függetlenül épülhetnek be a kromatinba és számos különféle szerepet és funkciót látnak el. A H2A és a H3 egyes variánsainak specializált funkciói már jól ismertek, a H1 és H2AB variánsok viszonylag gyakoriak, azonban a funkcionális szerepük kevésbé ismert, a H4 variánsok pedig rendkívül ritkák (Talbert *et al.*, 2012). Néhány hiszton variáns konzervált az eukarióták körében, míg mások egy-egy leszármazási vonalra jellemzőek, például a virágos növényekre specifikus H2A.W variáns, vagy szövet specifikusak, mint például az *Arabidopsis thaliana* H3.10 és H2B.8 variánsai (Nunez-Vazquez *et al.*, 2022; Foroozani *et al.*, 2022)

2.2.2. A hiszton H3 foszforiláció jellemzése, szerepe és szabályozása

A hiszton foszforiláció legtöbb esetben szerepet játszik a kromoszóma kondenzációban és kohézióban, a testvérkromatida szegregáció szabályozásában, transzkripció aktivációban, apoptózisban, valamint DNS károsodások javításában (Houben *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014). Növényekben a hiszton H3 foszforilációját leginkább a 10-es és 28-as szerin, valamint a 3-as, 11-es, és 32-es treonin pozíciókban tanulmányozták, mind dinamikus módosítások, amelyek a profázis szakaszában kezdődnek és a kései anafázis vagy telofázis során fejeződnek be (Loginova & Silkova, 2017).

A különböző hiszton módosítások közül a hiszton H3 mitotikus foszforilációja a szerin 10-es aminosavnál (phH3S10) széles körben tanulmányozott számos eukarióta szervezetben (Sawicka & Seiser, 2012; Wang & Higgins, 2013), köztük növényekben is (Houben *et al.*, 1999; Kaszás & Cande, 2000; Gernand *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2014). Ehhez a poszttranszlációs módosításhoz számos funkció köthető, beleértve kromoszóma kondenzációt, kromatin módosító fehérjék toborzását vagy kizárását, transzkripció aktivációt vagy a testvérkromatidák kapcsolódásának szabályozását (Kaszás & Cande, 2000; Houben *et al.*, 2007; Sawicka & Seiser, 2012). Több növényfaj esetében is kimutatták, hogy a hiszton H3 foszforilációja a szerin 10-es aminosavnál az interfázisos sejtekben minimális, először a korai profázisban figyelhető meg. A kései profázistól a metafázisig éri el csúcspontját, a metafázis-anafázis átmenetnél csökkenni kezd a foszforiláció mértéke, lehetővé téve a testvérkromatidák szétválását. A foszforiláció mértékének a csökkenése folytatódik a kései mitotikus fázisokban a mitotikus kromatin relaxációjával párhuzamosan, majd a kromoszómák dekonzenzációjával a telofázisban eltűnik (Houben *et al.*, 1999; Manzanero *et al.*, 2002; Houben *et al.*, 2007; Beyer *et al.*, 2012). A rendkívül specifikus phH3S10 ellenanyagoknak (Hendzel *et al.*, 1997) köszönhetően állati sejtekben kimutatták, hogy a H3S10 foszforilációja a pericentromer régióban kezdődik, majd mitózis és meiózis folyamata során kiterjed a teljes kromoszóma mentén. Azonban mind egyszikű és kétszikű növényeknél a mitózis során a kromoszóma hiszton H3 foszforilációja heterogén módon történik. A foszforiláció mértéke a pericentromer régiókban igen magas, míg a kromoszóma karokon alacsony a mitózis alatt. A meiózis során is eltérő mintázatot mutat a hiszton phH3S10 foszforilációs mintázata: az első meiotikus osztódásban a kromoszómák teljes hosszában intenzív foszforilációs jel detektálható, míg a második meiotikus osztódásban, hasonlóan a mitózishoz, a foszforiláció főként a pericentromer régiókra koncentrálódik, a kromoszóma karokon pedig csak alacsonyabb szintű foszforiláció mutatható ki (Houben *et al.*, 1999; Kaszás & Cande, 2000; Manzanero

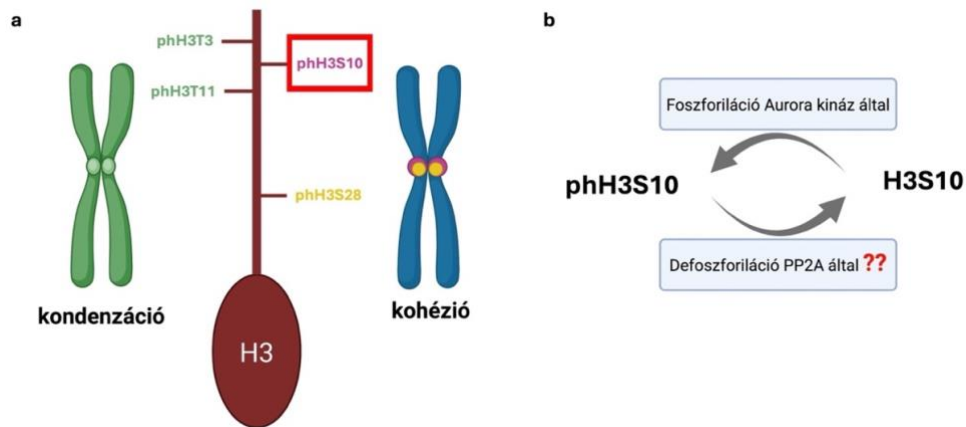
et al., 2002; Gernand *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2014). Azonban néhány esetben a H3S10 foszforilációja a metafázis-anafázis során az egész kromozómán megfigyelhető, például *Arabidopsis thaliana* esetében, osztódó BY-2 dohány sejtekben, vagy dohány növény (*Nicotiana tabacum*) leveléből izolált protoplasztokban. Más esetekhez hasonlóan a foszforiláció a profázisban indult, és a metafázis, illetve korai anafázis szakaszaiban csak a centromer régióban volt jelen, kései anafázisban azonban kiterjed a kromoszóma karokra is, majd fokozatosan eltűnik a telofázis során. Lehetséges, hogy ez a foszforilációs mintázat fajspecifikus (Loginova & Silkova, 2017).

Állati sejtekben mutatták ki először, hogy a mitózis alatt nemcsak a 10., hanem a 28. szerin aminosavnál is foszforilálódik a hiszton H3 fehérje (pH3S28). Immuncitokémiai vizsgálatok pH3S28 elleni antitestekkel kimutatták, hogy emlősökben ez a foszforiláció elsősorban a mitózis korai szakaszában történik, a kromoszóma kondenzációval összefüggésben (Gernand *et al.*, 2003). Növények esetében mindkét szerin aminosavnál történő foszforiláció dinamikája a mitózis és meiózis során igen hasonló, azonban a foszforilált H3S28 elsősorban a „core” centromer területén lokalizálódik (Gernand *et al.*, 2003; Loginova & Silkova, 2017). Mono- és policentrikus kromozómákat tartalmazó növényfajok összehasonlítása során kimutatható, hogy a hiszton H3 időbeli foszforilációs mintázata megegyezik. Azonban a policentrikus kromozómával rendelkező *Luzula luzuloides* (fehér perjeszittyó) esetében, ahol a kinetokór régiók a kromoszóma teljes mentén helyezkednek el és az orsó mikrotubulusok a kromoszóma teljes hosszán tudnak kapcsolódni, a H3S10/S28 foszforilációja szintén a teljes kromoszóma mentén megfigyelhető a monocentrikus kromozómákat tartalmazó növényekkel ellentétben (pl. *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*), ahol a hiszton H3 foszforilációja főként a jól meghatározott pericentromer régiókban történik. Ez a foszforilált hiszton H3 mintázat összefügg az aktív centromerek elhelyezkedésével a kromozómákon (Gernand *et al.*, 2003).

Növények esetében a hiszton H3 fehérjék négy csoportba sorolhatók: a kanonikus hiszton H3.1, a H3.3 variáns, a centromerikus H3 variánsok (CENH3), illetve H3-szerű hisztonok. A kanonikus és a H3.3 variánsok között csupán néhány aminosav különbség figyelhető meg, kettő az N-terminálisán, kettő pedig a hiszton doménben. A centromerikus H3 specifikusan meghatározza a centromer régiót, ami nélkülözhetetlen a kinetokór kapcsolódásában és a megfelelő sejtosztódás szabályozásában, míg a H3-szerű variánsok funkciója nagyrészt még ismeretlen (Foroozani *et al.*, 2022). A hiszton H3S10 foszforilációja a pericentromerikus heterokromatinban kezdődik, ami egy adeninben és timinben (A/T) gazdag, szatellita DNS-ből álló régió, amely szorosan kapcsolódik a centromerikus DNS-

hez. Maga a centromerikus DNS speciális fehérjékkal van becsomagolva, köztük egy különleges H3 variánssal. Ez az evolúciósan konzervált CENH3 variáns elsősorban az egyedi N-terminális farki részében tér el, ahol lizin helyett az összes pozitív töltésű oldalláncot arginin aminosavak alkotják. Ezenkívül a CENH3 N-terminális farki vége számos szerin és treonin aminosavat tartalmaz, ami valószínűvé teszi, hogy ez a variáns is, akárcsak a kanonikus H3, foszforilálódik a mitózis alatt (Strahl & Allis, 2000). Immunfestés és pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján pH3S10 jel hiánya figyelhető meg a központi centromer régióban. Ez az immunszignál hiány határozza meg a „core” centromer régiót, amelyet párhuzamos kromatin szálak, alacsonyabb DNS tartalom és megnövekedett mennyiségű fehérjék jellemeznek a kromoszóma karokhoz képest. A specifikus pH3S10 immunjel hiánya összefüggésbe hozható azzal, hogy ebben a régióban a centromer specifikus CENH3 variáns van jelen (Houben *et al.*, 2007; Loginova & Silkova, 2017).

A hiszton H3 szerin aminosavnál történő foszforilációja mellett számos tanulmány foglalkozik a hiszton H3 treonin aminosavnál történő foszforilációjával. Ellentétben a H3S10 és H3S28 foszforilációjával a hiszton H3 treonin 3-as (pH3T3), 11-es (pH3T11) és 32-es (pH3T32) pozíciójú aminosavnál történő foszforiláció a teljes kromoszómára kiterjed a mitózis, illetve a meiózis első osztódási szakaszában. A meiózis második szakaszában azonban a pH3T3 kizárólag a centromer régiókra korlátozódik, míg a pH3T11/T32 esetében szintén kiterjed a kromoszóma karokra. Növényekben ez a hiszton módosítás a kromoszóma kondenzációval hozható összefüggésbe, például a pH3T11 szignálként szolgálhat más, a kromoszóma kondenzációban részt vevő fehérjék számára, ellentétben a szerin 10-es és 28-as aminosavnál történő foszforilációval, ami inkább a kromoszóma kohéziójában játszik szerepet (3/a. ábra) (Fuchs *et al.*, 2006; Houben *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014; Loginova & Silkova, 2017). Habár a sejtciklus függő foszforiláció a szerin és treonin aminosavaknál konzervált az eukarióták körében, mégis ellentétes funkció figyelhető meg állati és növényi sejtek esetében. A növényekkel ellentétben állati sejtekben a kromoszóma kondenzációval inkább a teljes kromoszóma mentén kiterjedő szerin aminosavnál történő foszforiláció hozható összefüggésbe, míg a kromoszómák kapcsolódásában inkább a pericentromer régió specifikus treonin aminosavaknál történő hiszton foszforiláció játszik szerepet (Fuchs *et al.*, 2006).



3. ábra: Sejtciklus függő hiszton H3 foszforiláció növényi sejtekben

(a) A H3T3/11 foszforilációja (zöld) a kromoszóma kondenzációban játszik szerepet és az egész kromoszóma karokra kiterjed, míg a foszforilált H3S10/28 (lila és sárga) a testvérkromatida kohéziójában vesz részt a pericentromer régióban. Pirossal bekeretezve a kísérleteinkben vizsgált hiszton H3 10. szerin aminosav csoportja (és foszforilált formája a pH3S10) van feltüntetve. (b) A hiszton H3 szerin 10-es aminosav foszforilációjáért az Aurora kináz a felelős, míg a defoszforilációs folyamatban részt vevő foszfatázok pontosan még nem ismertek (piros kérdőjelekkel illusztrálva). (Biorender-ben szerkesztve, Fuchs *et al.*, 2006 és Houben *et al.*, 2007 alapján)

Állati sejtekben a hiszton H3 foszforilációját főként az Aurora B kináz végzi a mitózis kezdetén, míg a mitózis végén a Repo-man/PP1 komplex távolítja el a foszfátcsoportokat (Gil & Vagnarelli, 2019). Az Aurora és PP1 közötti finom egyensúly fenntartása elengedhetetlen a hiszton H3 reverzibilis foszforilációjának szabályozásához, valamint a kromoszómák megfelelő kondenzációjához és szegregációjához (Hush *et al.*, 1990; Demidov *et al.*, 2005). Az *A. thaliana* esetében három különböző Aurora homológot is azonosítottak (AtAUR1, AtAUR2 and AtAUR3), melyek mindhárman képesek *in vitro* foszforilálni a hiszton H3-at a szerin 10-es aminosavnál, de csak az AtAUR3 esetében figyeltek meg a H3S10 foszforilációjához hasonló lokalizációs mintázatot a kromoszómákon (3/b. ábra). Az AtAUR1 és AtAUR2 a mitózis alatt inkább a növény specifikus citoskeletális struktúrákhoz lokalizálódik (Demidov *et al.*, 2005; Kawabe *et al.*, 2005). *In vitro* vizsgálatok alapján a hesperadin nevű kináz gátló blokkolja az AtAUR3 által katalizált H3S10 és H3S28 foszforilációt, amit dohány BY-2 sejtekben is megfigyeltek (Kurihara *et al.*, 2006). A H3S10 foszforilációját továbbá befolyásolhatják a szomszédos aminosavakon végbemenő módosítások, ami szoros kölcsönhatásokra utal a hiszton H3 N-terminális farki végén történő PTM-ek között (Demidov *et al.*, 2009). Bár állati sejtekben az Aurora B további funkciókat is betölt, például a kinetokór összeszerelésének és a mikrotubulus dinamika szabályozásának irányítását (Demidov *et al.*, 2005), növényi sejtek esetében még nem pontosan tisztázott, hogy a kinetokór-lokalizált CENH3 foszforilációját az

Aurora kináz szabályozza-e (Houben *et al.*, 2007). A növényekben egyelőre nem teljesen ismert, hogy melyik az a protein foszfatáz, amely felelős a pH3S10 defoszforilációjáért a mitózis kései fázisaiban (3/b. ábra). A PP1 és PP2A foszfatázok gátlásával (pl. kantharadin, mikrocisztin-LR) végzett vizsgálatok alapján ezek fontos szerepet játszhatnak ebben a folyamatban, mert gátlásuk jelentősen megváltoztatta a foszforilációs mintázatot, kiterjesztve azt a pericentromer régiókról az egész kromoszómára vagy a pH3S10 hiperfoszforilált állapotát okozta (Manzanero *et al.*, 2002; Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018; Ujvárosi *et al.*, 2019).

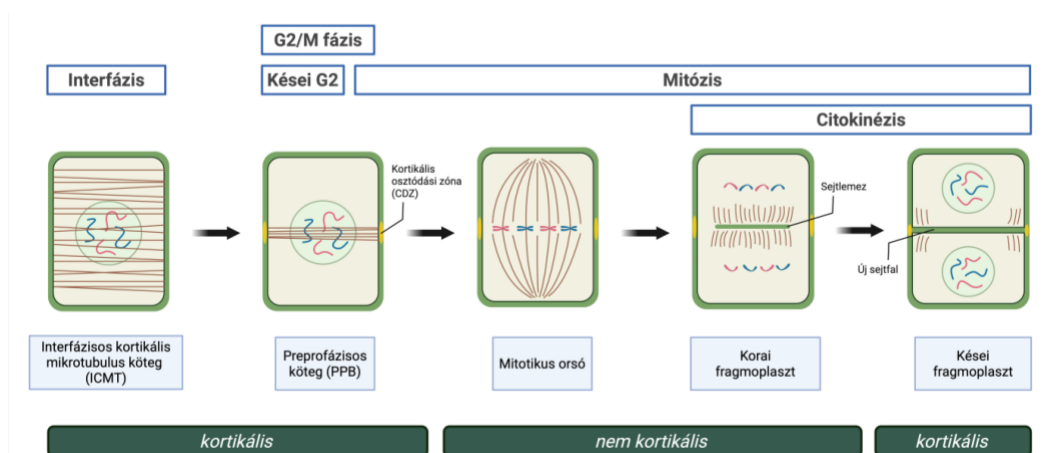
2.3. Mikrotubulusok szerveződése és szabályozása a sejtosztódás alatt

2.3.1. Dinamikus mikrotubulus szerveződés a mitózisban

A növényi citoskeleton, amely aktin filamentumokból (AF) és mikrotubulusokból (MT) épül fel, egy rendkívül dinamikus struktúra, amely alapvető szerepet játszik a növények növekedésében, fejlődésében és a stresszhatásokra adott válaszreakciókban is. A ~25 nm átmérőjű mikrotubulusok tubulin heterodimerekből (α és β tubulin) épülnek fel, amelyek lineáris polimereket, úgynevezett protofilamentumokat alkotnak. Ezekből jellemzően 13 rendeződik hengeres struktúrává (Horio & Murata, 2014; Wang *et al.*, 2022). Ezzel szemben az aktin filamentumok ~7 nm átmérőjű csavart láncot alkotnak aktin monomerekből. Az MT-k és az AF-k rendkívül dinamikusak, és folyamatos polimerizációs és depolimerizációs folyamatokon mennek keresztül (dinamikus instabilitás). Ezeket a folyamatokat általában citoskeletonhoz kötődő fehérjék szabályozzák, ideértve a mikrotubulus-asszociált fehérjéket (MAP) és az aktin kötő fehérjéket (ABP), amelyek többek között a filamentumok nukleációját, polimerizációját, kötegelését, darabolását és depolimerizációját irányítják (Wang *et al.*, 2022). Más eukariótákkal ellentétben a növényi sejtekben nincs jól meghatározható mikrotubulus organizáló központ (MTOC), mint például a centroszóma az állati sejtek esetében (kivéve egyes növények ostoros hímivar-sejtjeinek képződése során) (Azimzadeh *et al.*, 2008; Drevensek *et al.*, 2012; Spinner *et al.*, 2013). Ezzel szemben a mikrotubulusok nukleációja diffúzan, például a sejtmag felszínén, az orsó pólusokon vagy a kortexen, gyakran a már meglévő mikrotubulusokhoz kapcsolódva történik (Azimzadeh *et al.*, 2008; Drevensek *et al.*, 2012). Bár a pontos mechanizmus még vitatott, azonban a γ -tubulin szerepe már tisztázott ebben a folyamatban (Drevensek *et al.*, 2012). A mikrotubulusok nukleációjában elsősorban egy γ -tubulin gyűrű komplex (γ TuRC) vesz részt. Ez a struktúra a konzervált γ -tubulint és γ -tubulin gyűrű motívummal

rendelkező fehérjéket (GCP-eket) tartalmaz. Interfázisban a növényi sejtek nem rendelkeznek jól meghatározott mikrotubulus szervező központtal ezért az MT-k a már meglévő kortikális mikrotubulusokról képződnek. A γ TuRC komplex a meglévő MT kötegekhez kapcsolódva segíti a nukleációt az augmin komplexel kölcsönhatásban. Az új MT szál nukleációja után az Msd1-Wdr8 komplex (Msd1: mitotic spindle disanchored 1; Wdr8: WD40 repeat-containing protein) biztosítja az elágazó mikrotubulusok stabilizálását a nukleációs helyen és a katanin komplex toborzását, amely az új mikrotubulus leválasztásában játszik szerepet. A kialakult és levált MT-k mínusz végéhez a MAP SPIRAL2 (SPR2) fehérje kapcsolódik, ami védelmet biztosít a gyors depolimerizáció ellen (Yagi *et al.*, 2024).

A citoszkeleton precíz szabályozása elengedhetetlen a sejtosztódás zavartalan lefolyásához, különösen a mikrotubuláris hálózat irányítása, mely kulcsszerepet játszik a kromoszóma szegregáció és a leánysejtek szétválasztása alatt (Motta & Schnittger, 2021). A sejtciklus során négy térben és időben elkülönülő mikrotubulus struktúra különböztethető meg növényi sejtekben (4. ábra): az interfázisos kortikális mikrotubulus hálózat (ICMT), a preprofázisos köteg (PPB), a bipoláris mitotikus osztódási orsó (Sp) és a fragmoplaszt (Phg) (Bouchez *et al.*, 2014).



4. ábra: Mikrotubuláris hálózat szerveződése a sejtciklus különböző fázisaiban

Dinamikus instabilitásuknak köszönhetően a mikrotubulusok sejtfázisra jellemző szerkezeti elrendeződést mutatnak. **Barna:** mikrotubulusok; **Kék** és **Rózsaszín:** kromoszómák (Biorender-ben szerkesztve; Dr. Martine Pastuglia személyes közlése alapján)

Az interfázisban párhuzamos mikrotubulus kötegek hálózák be a sejtet a plazma membrán alatt kortikális hálózatot alkotva. Az ICMT szerepet játszik a sejtnövekedésben és irányítják a cellulóz mikrofibrillumok lerakódását a plazma membrán külső felületén. Az interfázisos mikrotubulusok általában merőlegesen

rendeződnek a növekedési tengelyre. A G2/M átmenet során az interfázisos mikrotubulusok átrendeződésével kialakul a növény specifikus preprofázisos köteg (PPB), amely a sejtosztódás iránti elköteleződés első jele. Ez a struktúra a központi pozícióban kondenzálódik a kortexben, körülveszi a sejtmagot és kapcsolatot teremt a sejtmag és a kortex között. A PPB a kései profázis során fokozatosan lebomlik és teljesen eltűnik a prometafázisra, azonban jelet hagy a sejtkeregben, meghatározva az úgynevezett kortikális osztódási zónát (CDZ), amelyhez a növekvő sejtlemmez fog kapcsolódni a citokinézis végén. Bár a növényi sejtekben nincs centriólum, a PPB funkcionális hasonlóságot mutat az állati centroszómákkal, hiszen segíti az orsó tengelyének meghatározását és annak a sejtkereghez való rögzítését. A metafázisban a kromoszómák az egyenlítői síkba rendeződnek, a kinetokór mikrotubulusok a centromerhez kapcsolódva az anafázis során a bipoláris mitotikus osztódási orsók a testvérkromatidákat az ellentétes pólusok felé húzzák. Az anafázis végén az osztódási orsó lebomlik, de néhány mikrotubulus köteg megmarad a középsíkban, melyekből a telofázisban kialakul a fragmoplaszt. Ez a növényi sejtekre jellemző struktúra vezikula transzporttal irányítja az új sejtlemmez képződését a két leánysejt között a citokinézis alatt. A fragmoplaszt az osztódási síkban, a sejt középső részén képződik és centrifugálisan nő kifelé a sejtkereg felé, ahol korábban a PPB meghatározta a CDZ-t (Bouchez *et al.*, 2014; Motta & Schnittger, 2021)

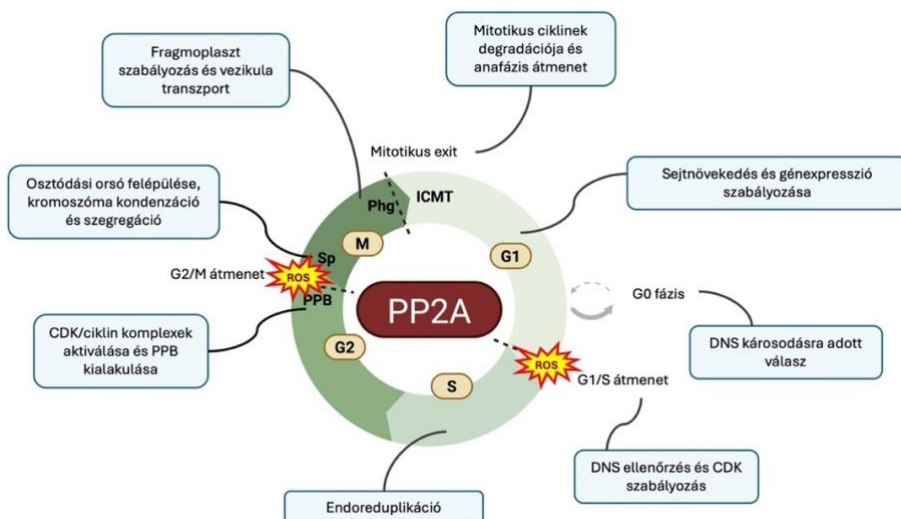
2.3.2. A TTP komplex funkciója a növényi mikrotubulusok szabályozásában

A TTP (TON1-TRM-PP2A) komplex egy olyan foszfatáz aktivitással bíró multiprotein komplex, amely kulcsfontosságú szerepet játszik a kortikális mikrotubulusok (ICMT és PPB) elrendeződésében és a sejtosztódás térbeli irányának a szabályozásában (Rasmussen *et al.*, 2013; Spinner *et al.*, 2013; Schaefer *et al.*, 2017; Motta & Schnittger, 2021). A TTP komplex három alegységből áll, amelyek a komplex szabályozásában (TON1), az összeszerelésben és célhelyre történő eljuttatásában (TRM), illetve a foszfatáz aktivitásában (PP2A) vesznek részt (5. ábra) (Bouchez *et al.*, 2014; Schaefer *et al.*, 2017). A PP2A heterotrimer enzim a komplexben a FASS nevű specifikus B” szabályozó alegységet tartalmazza. Ez az alegység biztosítja a komplex enzimátikus aktivitását és azoknak a foszforilációs kaszkádoknak a szabályozásában vesz részt, amelyek a kortikális mikrotubulusok dinamikáját irányítják, így szabályozzák a PPB kialakulását (Camilleri *et al.*, 2002; Spinner *et al.*, 2013; Schaefer *et al.*, 2017). A TON1 elengedhetetlen a komplex működéséhez és konzervált a szárazföldi növényekben. Ez az alegység képes kölcsönhatásba lépni a centrinnel és ciklinfüggő kinázokkal ezzel centroszóma-szerű funkciót biztosítva a komplexnek,

minden más azonosított komponens több izoformában fordul elő a komplexben, beleértve a TON1-et (a és b), a PP2A-C katalitikus alegységet (C3 és C4), a PP2A-A strukturális alegységet (A1, A2, A3), valamint a TRM család számos tagját. Ez a jelentős sokféleség teszi lehetővé, hogy a TTP komplex különféle, sokrétű funkciókat lásson el (Spinner *et al.*, 2013).

2.4. Áttekintés a PP2A szabályozó szerepéről a sejtciklus folyamata során

A sejtciklus egymást követő események sorozata, amelynek célja két genetikailag azonos utódsejt létrehozása. Ennek a bonyolult folyamatnak a fő szabályozó mechanizmusa a fehérjék reverzibilis foszforilációja, amelyet különféle kinázok és foszfatázok végeznek. A kinázok szerepe már jól ismert, különösen a ciklin-függő kinázok (CDK) szerepe a folyamatban, melyek aktivációja a sejtciklus egyik fázisából a másikba való átmenet hajtóereje (Jiang, 2006). A PP2A sokoldalú és alapvető szerepet játszik a sejtciklus szabályozásában. Több mint 300 ismert szubsztrátot képes defoszforilálni a sejtciklusban, ezáltal befolyásolva szinte az összes alapvető mechanizmust és ellenőrző pontot (6. ábra). A PP2A a különböző funkcióit a szerkezetileg eltérő holoenzim komplex formájában fejt ki, amelyeket térben és időben szigorúan meghatároznak a specifikus regulátor fehérjék (Wlodarchak & Xing, 2016). Bár a PP2A sejtciklussal kapcsolatos szerepét eddig főként állati és humán sejtekben tárták fel (Nowak *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005), egyre több kutatás világít rá a foszfatáz pontos működésére növényi sejtekben is (Máthé *et al.*, 2009; Beyer *et al.*, 2012; Máthé *et al.*, 2013b; Garda *et al.*, 2016, 2018).



6. ábra: Összefoglalás a PP2A foszfatáz és a ROS eddig ismert szerepéről a sejtciklusban
 Rövidítések: PPB – preprofázisos köteg; Sp – mitotikus osztódási orsó; Phg – fragmoplaszt; ICMT – interfázisos kortikális mikrotubulus hálózat. (Biorender-ben szerkesztve)

Az alábbiakban pontokba szedtem a PP2A ismert szerepeit:

- 1. Sejtciklus iniciációja:** A G1 fázisban a sejtciklust elindító jelátviteli útvonalak serkentik a sejtnövekedést, a sejtosztódáshoz szükséges alkotóelemek felhalmozódását és olyan szabályozó fehérjék transzkripcióját, mint a ciklin D1, amelyek a sejtciklus előrehaladását irányítják. A PP2A több ponton is beavatkozhat ezekbe a jelátviteli útvonalakba, egyes lépéseknél aktiválva, másoknál gátolva annak működését a különböző regulátor alegység izoformák függvényében (Wlodarchak & Xing, 2016).
- 2. G1/S átmenet:** Mielőtt a sejt az S fázisba léphetne át kell haladnia a G1/S ellenőrző ponton, amely biztosítja, hogy készen áll a DNS replikációra. Ennek az ellenőrző pontnak a központi szabályozója a retinoblasztóma fehérje (Rb). A Rb fehérje az E2F transzkripció faktorokon keresztül gátolja az S fázisba lépéshez és a sejtciklus előrehaladásához szükséges gének kifejeződését, mint például ciklinek, CDK-k, vagy a DNS szintézisét serkentő gének. A Rb aktivitását sejtciklus-függő foszforiláció és defoszforiláció szabályozza, amit számos CDK/ciklin komplex és protein foszfatáz végez. Az S fázisban a Rb hiperfoszforilált állapotban van, míg a foszforilációja csökken a mitózisból való kilépéskor. Állati sejtekben a PP1 közvetlenül defoszforilálja a Rb-t a G2/M átmenetnél, míg a PP2A főként azoknak a CDK-k szabályozásában vesz részt, amelyek koordinálják a G1/S átmenetet. A sejtciklus szabályozásának elemei részben konzerváltak a növényekben is, ahol növényi retinoblasztóma-rokon fehérjék (RBR) hasonló funkciót töltenek be. A növényi CDK-k szerepe jól ismert, számos célfehérjét foszforilálnak a G1/S és G2/M átmenetekenél, ezzel elindítva a DNS replikációt, illetve a mitózist. Azonban a folyamatban részt vevő protein foszfatázokról kevesebb információ áll rendelkezésre (Inzé & De Veylder, 2006; Ábrahám *et al.*, 2015; Wlodarchak & Xing, 2016).
- 3. Endoreduplikáció:** A mitotikus (vagy testi sejtek) osztódása során a DNS csak egyszer replikálódik, amelyet elsősorban a replikációs origók egyszeri aktiválása biztosít. A folyamatban részt vevő fehérjék foszforilációval aktiválódnak, majd a replikáció végén a PP2A végzi defoszforilációjukat, így inaktiválódnak és lebontásra kerülnek (Wlodarchak & Xing, 2016). Állati sejtekben a PP2A-B56δ transzkripció faktorok foszforilációs állapotának a szabályozásán keresztül vesz részt az endociklusban, azaz a mitózis nélküli DNS replikációban (Martindill & Riley, 2008). Növényi sejtekben az endoreduplikáció, ami poliploid sejtek kialakulásához vezet igen elterjedt, és fontos szerepe van számos folyamatban, például sejtosztódás és sejt differenciálódás közötti váltásban, vagy segítheti az alkalmazkodást kedvezőtlen körülmények között (Inzé & De

Veylder, 2006). Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a PP2A, különösen a B'γ és B'ζ alegységek, szabályozzák az endoreduplikációra való átállást *Arabidopsis thaliana* levelekben (Winter, 2018).

- 4. G2/M átmenet és mitózisba lépés:** A G2 fázisból az M fázisba történő átmenet kulcsfontosságú eseménye a CDK1 aktiválása, ami egybeesik a PP2A-B55 holoenzim inaktiválásával állati sejtekben (Boudolf *et al.*, 2006; Wlodarchak & Xing, 2016). Magasabb rendű eukarióták körében a PP2A negatívan szabályozza a mitózisba lépést: inaktiválása fokozza a CDK aktivitást, ami a mitózisba lépést eredményezi (Jiang, 2006). Míg állatoknál a CDK aktivációja a centroszómában kezdődik, növényeknél a centroszóma hiánya miatt a G2/M átmenet a preprofázisos köteg (PPB) kialakulásával történik. A PPB nemcsak kijelöli az osztódási síkot, hanem számos centroszóma szerű funkciót is betölt, például az orsó kialakulását és a prometáfázis/metáfázis átmenet időzítését szabályozza. Ezenkívül a PPB-ben több CDK komplex is jelen van az aktivitásukat szabályozó fehérjékkel együtt. Eddig csak néhány gént azonosítottak, aminek szerepe van a PPB kialakításában, köztük PP2A-B'' alegység FASS izoformája, amely a PPB helyén felhalmozódik egészen a metafázisig. A TTP komplex és a hozzá kapcsolódó PP2A aktivitás ismeretlen célfehérjék defoszforilálásán keresztül szabályozza a kortikális mikrotubulusok szerveződését és a PPB kialakulását (Bouchez *et al.*, 2014).
- 5. Mitózisban:** A mitózis során a PP2A kulcsfontosságú szerepet játszik a különböző celluláris struktúrák átrendeződésében. A maghártya lebomlását CDK-k foszforilációja, míg újraépítését a PP2A és PP1 segíti a mitózis végén. A PP2A szerepet játszik a kondenzin komplex kromoszómákhoz való juttatásában, elősegítve a megfelelő kromoszóma kondenzációt. A kinetokór és mikrotubulusok közötti kapcsolatok megfelelő kialakítását szorosan szabályozza az Aurora B által végzett foszforiláció és a PP1/PP2A által végzett defoszforiláció (Wlodarchak & Xing, 2016). Emellett a hiszton H3 reverzibilis foszforilációja is kulcsszerepet játszik a kromoszóma kondenzáció és a testvérkromatida szegregáció szabályozásában Aurora B kinázok és PP1/PP2A protein foszfatázok által (lásd [2.2.2. alfejezet](#)).
- 6. Citokinézis:** A mikrotubulusok megfelelő összeszerelését különböző mikrotubulus-asszociált fehérjék (MAP-ok) reverzibilis foszforilációja befolyásolja. A PP2A defoszforilálja a MAP65 fehérjét, elősegítve kötődésüket a mikrotubulusokhoz, ezáltal stabilizálva a fragmoplasztot a citokinézis során. Ez a folyamat szabályozza a vezikulák célzott szállítását és összeolvadását a sejtlemmez régiójában, így hozzájárul az újonnan képződő sejtfal felépítéséhez a két leánysejt között (Máthé *et al.*, 2021).

- 7. Mitotikus kilépési ellenőrző pont:** A mitózis végén az anafázis-promóteáló komplex (APC/C) a mitotikus ciklinek ubiquitinációját és proteozóma általi degradációját váltja ki, ezáltal elindítva a mitózisból történő kilépést. Ezt a PP2A negatívan szabályozza, mind a metafázis/anafázis átmenetet, mind a kilépést a mitózisból. A PP2A késlelteti az anafázis kezdetét azzal, hogy gátolja az APC/C aktiválódását. Emellett megakadályozza a mitózis befejezését bizonyos szabályozó útvonalak visszaszorításával (Jiang, 2006; Sablowski & Carnier Dornelas, 2014).
- 8. DNS károsodásra adott válasz:** A DNS replikációs hibák és oxidatív stressz DNS károsodást okozhatnak, amelyre a sejtek a sejtciklus leállításával reagálnak, időt biztosítva a hibák kijavítására. A DNS károsodások érzékelése hasonló módon történik állati és növényi sejtekben, a további jelátviteli utak eltérnek (Shimotohno *et al.*, 2021). Állati sejtekben a sejtciklus leállhat a G1 fázisban, illetve a G1/S és G2 fázisokban is (Reichheld *et al.*, 1999; Shimotohno *et al.*, 2021). A növények esetében a sejtciklus leállása leginkább a G2 fázisban történik (Shimotohno *et al.*, 2021). A DNS károsodásra adott válasz során nemcsak kinázok, hanem több foszfatáz, köztük a PP2A is fontos szerepet tölt be. A foszfatázok szerepet játszanak mind a DNS károsodás utáni válasz aktiválásának szabályozásában – jelátviteli kaszkádokat indítanak el protein kinázok aktivitásának szabályozásán keresztül – mind annak leállításában, miután a sérülés kijavításra került (Ramos *et al.*, 2019).
- 9. Reaktív oxigén (ROS) formák szerepe a sejtosztódásban:** Ezenkívül fontos megjegyezni, hogy a reaktív oxigén formák (ROS) közvetlenül befolyásolják a sejtciklusban részt vevő ciklinek és ciklin-függő kinázok aktivitását redox folyamatokon keresztül. Ez leállíthatja a sejtciklust a G1/S és G2/M ellenőrzőpontokon. A ROS által okozott DNS károsodás aktiválja azokat a transzkripciós faktorokat, amelyek gátolják a G2/M ciklinek kifejeződését. Emellett a ROS elősegíti a sejtciklusból való kilépést, az endociklusra való áttérést és a differenciálódást is (Considine & Foyer, 2021). A sejtciklus leállása a G1/S és G2/M ellenőrzőpontokon a ciklin-függő kinázok aktivitásának gátlásával, a sejtciklus gének expressziójának csökkenésével és az oxidatív stressz elleni védekező gének egyidejű aktiválásával jár együtt (Reichheld *et al.*, 1999; Shimotohno *et al.*, 2021; Considine & Foyer, 2021). A ROS homeosztázis felborulása késlelteti a profázisból prometafázisba történő átmenetet, megzavarja a maghártya lebomlásának dinamikáját és a mikrotubulusok szerveződését, befolyásolja a kromoszómák mozgását a prometafázisban és anafázisban és késlelteti a kilépést a telofázisból, ezenkívül a citokinézis is erősen érintett (Livanos *et al.*, 2012). Emellett az oxidatív jelátviteli útvonalak

hatékony működéséhez elengedhetetlen a fehérjék reverzibilis foszforilációja, így különféle protein kinázok és foszfatázok kulcsfontosságú szerepet töltenek be ezen folyamatok szabályozásában (Considine & Foyer, 2021).

2.5. *Arabidopsis thaliana* modellnövény sajátosságai

2.5.1. *A modellnövény általános jellemzése*

A kísérleteink modellnövénye a káposztafélék (*Brassicaceae*) családjába tartozó *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. volt. Minden földrészen elterjedtek, azonban a legnagyobb számban a Földközi-tenger mediterrán medencéjében, Közép- és Élő-Ázsiában, illetve Észak-Amerikában fordulnak elő. Az *Arabidopsis thaliana* (lúdfű) számos ökotípusa közül a Columbia és a Landsberg a leggyakrabban használt genetikai és molekuláris kutatásokban. Kis mérete, rövid, kb. 6 hetes életsiklusa és önbeporzó virágzása miatt ideális modellszervezet. Apró fehér, a keresztesvirágúak rendjére jellemző virágai hosszabb nappali megvilágítás mellett virágoznak; becőterméssel rendelkezik, egy-egy becő kb. 40-60 magot tartalmazhat. Az érett növények elérik a 15-20 cm magasságot és gyakran több száz becőtermést hoznak, több mint 5000 maggal. A növényeket *in vitro* Petri-csészében vagy földben is lehet nevelni melegházban vagy fluoreszcens lámpák alatt. A gyökerek szerkezete egyszerű és nem hoznak létre szimbiotikus kapcsolatot nitrogénkötő baktériumokkal (Rédei, 1970, 1974; Meinke *et al.*, 1998).

Korlátozott mezőgazdasági értéke ellenére a lúdfű kiemelkedő jelentőségű modellorganizmus a növénybiológiában. Nagy népszerűségnek örvend fiziológiai, biokémiai, genetikai és molekuláris vizsgálatokban kompakt, jól jellemzett genomja, könnyű termesztetősége, rövid életsiklusa és bőséges magtermése miatt (Peer *et al.*, 2006; Ferjani *et al.*, 2023). Diploid genommal rendelkezik, ami csupán 125-150 Mb, ezenkívül 5 kromoszómapárja van kevesebb mint 30000 fehérjét kódoló génnel. Az *Arabidopsis thaliana* volt az első olyan növény, amelynek 2000-ben a teljes genom szekvenciáját meghatározták (Weigel & Mott, 2009). Ezzel a modellnövényvel végzett átfogó nemzetközi kutatások jelentős mértékben hozzájárultak a növénybiológia tudományának fejlődéséhez, számos innovatív elméletet, valamint korszerű módszertanokat eredményezve (Ferjani *et al.*, 2023).

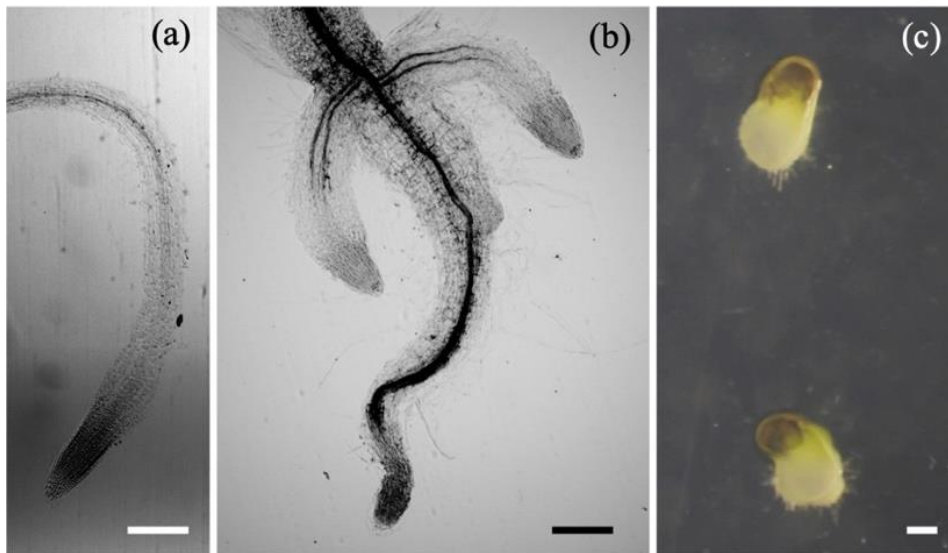
2.5.2. *Arabidopsis thaliana* mutáns növények jellemzése

Számos eszköz és módszer áll rendelkezésre az *Arabidopsis thaliana* genetikai manipulációjához, ami tovább növeli a kutatásokban betöltött jelentőségét (Peer *et al.*, 2006; Ferjani *et al.*, 2023). Az öröklődő mutációk előidézésének egyik leghatékonyabb módszere a magok EMS-sel (etil-metán-

szulfonát) történő kezelése, amely alkilezéssel okoz bázisváltozásokat és nukleotid mutációkat. Ez leggyakrabban funkcióvesztéses mutációt okoz, például korai STOP kodon, splice hely megszakadás vagy káros aminosav csere által (Page & Grossniklaus, 2002; Chen *et al.*, 2023). Emellett a kémiai mutagenézis allél sorozatot is eredményezhet, lehetővé téve egy gén különböző erősségű alléljának a vizsgálatát (Østergaard & Yanofsky, 2004). Az *A. thaliana* könnyen transzformálható *Agrobacterium*-mediált géntranszferrel. Az *Agrobacterium* által közvetített transzformáció egy DNS szekvencia (T-DNS) véletlenszerű és stabil beépülését eredményezi a növény nukleáris genomjában. A nagy hatékonyságú T-DNS transzformációs módszerek, mint például a „floral dipping” (a lúdfű növények virágait olyan *Agrobacterium* oldatba mártják, amely T-DNS-e tartalmazza a bejuttatni kívánt génszakaszt), elérhetősége lehetővé tette több tízezer transzformáns viszonylag egyszerű előállítását (Page & Grossniklaus, 2002). Széles körben alkalmazott módszer növényi transzformációhoz, amelyek változatos genotípusú mutáns növényeket biztosítanak a genetikai kutatásokhoz (Raabe *et al.*, 2024). A CRISPR/Cas9-mediált mutagenézis egyre szélesebb körben alkalmazott módszer, amelyben egy úgynevezett „guide” RNS irányításával a Cas9 fehérje egy rövid szekvencián hasítja a DNS-t. A kialakult kettős szálú DNS törés különböző mechanizmusokon keresztül javítható, aminek eredményeként különböző specifikus mutációk, beleértve inszerciók, deléciók vagy pontmutációk indukálhatók az egyes DNS javító folyamatok megfelelő alkalmazásával (Weiss *et al.*, 2022).

Számos PP2A mutáns növény érhető el, részletesen az általunk használt mutáns növények tulajdonságait mutatom be. A PP2A dupla katalitikus alegység mutánsok esetében először külön-külön *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS inszerciós mutagenézissel hozták létre a *pp2ac3* és *pp2ac4* szimpla mutánsokat, majd ezeket keresztezték. Ezek nem knock-out mutánsok, vagyis a gén jelen van, csupán hibás funkcióval rendelkezik. A mutáció megszakítja a PP2A-C gént null mutációt eredményezve, vagyis megáll a gén expressziója (Alonso *et al.*, 2003; Ballesteros *et al.*, 2013). A PP2A-C3 mutáció részleges hatású, mert a mutáció nem szüntette meg teljesen a C3 expresszióját, mivel alacsony mennyiségben kimutatható volt a transzkriptum. A szimpla *pp2ac3* vagy *pp2ac4* mutánsok morfológiailag nem térnek el jelentősen a vad-típustól, míg a *pp2ac3 pp2ac4* dupla mutánsok törpék, vastag levelekkel, axiális szervek fejlődési rendellenességei figyelhetők meg, radiális sejtnövekedés erőteljesebb (7/b. ábra), azonban a fejlődési rendellenességek ellenére képesek virágot hozni és magot termelni. A T-DNS inszerciót qPCR és RT-PCR analízissel detektálták a szekvenciában, valamint megerősítették a tandem ismétlődő T-DNS inszerciók jelenlétét mindkét vonalban.

A *pp2ac3 pp2ac4* dupla mutánsokban a detektált PP2A-C3 és PP2A-C4 szintek jóval alacsonyabbak voltak, mint a vad-típusban. A dupla mutánsokban a PP2A-C4 expressziója erőteljesebben csökkent, mint a PP2A-C3 expressziója. Az RT-PCR elemzés kimutatta, hogy a PP2A-C3 teljes hosszúságú mRNS-e még részlegesen kifejeződik, míg a PP2A-C4 teljes hosszúságú mRNS-e a *pp2ac3 pp2ac4* kettős mutánsban nem volt jelen (Spinner *et al.* 2013). A T-DNS inszerció a PP2A-C3 esetében az At2g42500 génben, PP2A-C4 esetében pedig a At3g58500 génben található (Ballesteros *et al.* 2013). A *fass B*” regulátor alegység mutánsok esetében kémiai eljárással, EMS mutagenézissel rontották el a gén funkcióját. A *fass-5* mutánsban nonszensz mutáció jött létre, amely egy STOP kodont iktatott a gén szekvenciájába a Leu-267 után (Gln-268 → STOP). Ennek következtében a fehérje N-terminális része (267 aminosavig) valószínűleg önmagában nem elegendő a helyes fehérje transzlációhoz és/vagy működéséhez, és így teljes funkcióvesztést (knock-out) okozott. A *fass* gén 12 exont és 11 intront tartalmaz. A *fass-5* nonszensz mutáció a VIII. exonban történik. RNS-gél blot kísérletek és RT-PCR analízisek alapján a *fass-5* mutánsban nem íródik át a teljes hosszúságú mRNS a mutáns allélról. A mutáció egy restriktions enzim (PstI) hasítóhelyét érintette (Camilleri *et al.*, 2002). A *fass-5* HZ erősen megváltozott fenotípust mutat, a mutáció szélsőségesebb hatást váltott ki, ahol teljesen hiányoznak a differenciált axiális szervek, úgymint a hajtás és a gyökér (7/c. ábra). Ezzel szemben a *fass-15* esetében egy misszensz mutáció történik a gén utolsó exonjában. A pontmutáció a FASS C-terminálisának nem konzervált aminosav szekvenciáján történt, amit szekvenálással azonosítottak. A pontmutáció enyhébb fenotípust eredményezett: megkülönböztethető növényi szervekkel (hajtás, gyökér) rendelkezik, csupán törpe és zömök növésű a vad-típusú növényhez képest, akárcsak a *pp2ac3 pp2ac4* dupla mutáns (7/b. ábra). A *fass-15* mutáns növények virágoznak ugyan, de nem hoznak magot, így teljesen sterilek. Bár a *fass-15* allél mutációja súlyos növekedési és fejlődési rendellenességeket mutat ez nem null mutáció. A teljes funkcióvesztés még drasztikusabb elváltozásokat eredményezhet (Kirik *et al.*, 2012). A B” regulátor alegység mutációjára nézve megkülönböztetünk heterozigóta (HeZ) és homozigóta recesszív (HZ) mutáns genotípusokat. A *fass* heterozigóta mutánsok (HeZ) látszólag normális fenotípust mutatnak, morfológiai eltérés nem figyelhető meg a vad-típusú egyedektől (Camilleri *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2003; Kirik *et al.*, 2012; Ballesteros *et al.*, 2013; Spinner *et al.*, 2013).



7. ábra: A kísérleteinkhez felhasznált *Arabidopsis thaliana* genotípusok gyökér fenotípusa (öt napos csíranövények): (a) vad-típusú *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col0) ökotípus; (b) PP2A-C3/C4 katalitikus alegység dupla mutáns (*pp2ac3 pp2ac4*): törpe, zömök növekedésű, oldalirányú sejtnövekedés erőteljesebb, oldalgyökerek hamarabb megjelennek (hasonló fenotipikus megjelenés jellemző *fass-15* HZ gyengébb fenotípusú B” regulátor alegység mutáns esetében is); (c) *fass-5* HZ erősebb fenotípusú B” regulátor alegység mutáns: vastag gumószerű növény, normálisan differenciált hajtás és gyökér szervek teljesen hiányoznak.

A felvételeket Prof. Dr. Máthé Csaba (Debreceni Egyetem, TTK, BÖI, Növénybiológiai Tanszék) készítette Olympus SZX7 típusú sztereo mikroszkóppal. Használt objektív és kamera: Olympus DF PLAPO 1X-4; Canon EOS 2000D

Méret skála: 200 μ m

A PP2A-A „scaffolding” strukturális alegység esetében a T-DNS inszercióval előállított mutánsok mindegyikében hiányzik az adott A alegység izoforma, ami arra utal, hogy a mutációk erős funkcióvesztésű allélek vagy knock-out-ok. Fenotípusosan az RCN1/A1 izoforma mutációt tartalmazó növények (pl. *pp2aa1 pp2aa2*, *pp2aa1 pp2aa3* dupla mutánsok) jelentős fejlődési rendellenességeket mutatnak, beleértve az abnormális embriogenezist, sugárirányú sejttágulást vagy a törpe növekedést, míg az *pp2aa2 pp2aa3* dupla mutáns viszonylag normális fenotípust mutat, morfológiailag hasonlít a vad-típushoz. Az *pp2aa1 pp2aa2*, illetve *pp2aa1 pp2aa3* dupla mutáns növények esetében a PPB hiánya is tapasztalható (Zhou *et al.*, 2004).

A TTP komplex komponenseinek mutációi a PPB hiányához, az osztódási síkok rossz elhelyezkedéséhez és az interfázisos mikrotubulus kötegek rendezetlenségéhez vezethetnek (Azimzadeh *et al.*, 2008; Drevensek *et al.*, 2012; Schaefer *et al.*, 2017). Az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS inszerciós mutagenézissel előállított *trm6*, *trm7* és *trm8* szimpla mutánsok keresztezésével állították elő a dupla majd a tripla *trm6 trm7 trm8* mutánsokat. A TRM6 TRM7 és

TRM8 fehérje izoformák kulcsszerepet játszanak a megfelelő osztódási sík kialakításában, a *trm6 trm7 trm8* tripla mutánsban a PPB kialakulásának a hiánya figyelhető meg. Emellett a PPB hiányában az orsó orientációja kevésbé stabil, a metafázisos orsók megnövekedett rotációját eredményezi a mutáció, ami befolyásolja a sejtosztódás robusztusságát. Azonban a PPB károsodása nem befolyásolja a *trm6 trm7 trm8* mutánsok gyöker anatómiai szerveződését és csupán enyhe méretbeli különbség (~20%) figyelhető meg a Col0-hoz képest (Schaefer *et al.*, 2017).

Az előbb említett mutáns genotípusokon túl ma már rengeteg különböző célra előállított *Arabidopsis thaliana* mutáns áll rendelkezésre, amelyeket nemzetközi magbankok – mint az *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC; USA), a *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC; UK), a *Sendai Arabidopsis Seed Stock Center* (SASSC; Japán), vagy a *Versailles Arabidopsis Stock Center* (VASC; Franciaország) – gyűjtenek, őriznek és osztanak meg a kutatókkal (Scholl *et al.*, 2000; Ricou *et al.*, 2025).

2.6. A mikrocisztin-LR (MCY-LR) hatásairól

A cianobaktériumok világszerte elterjedt fotoautotróf baktériumok, amelyek eutróf vizekben tömegesen elszaporodva vízvirágzást okozhatnak. Ez a jelenség egyre gyakoribb és súlyosabb az emberi tevékenységek következtében és a klímaváltozás hatására. A cianobaktériumok toxikus másodlagos metabolitokat termelnek, amelyek felhalmozódhatnak a vizekben, és az öntözővizeken keresztül bekerülhetnek a táplálékláncba. Ennek következtében a cianotoxikus vízvirágzások súlyos egészségügyi és ökológiai kockázatot jelentenek (Campos & Vasconcelos, 2010).

A cianotoxinokat hatásmechanizmusuk alapján négy fő csoportba sorolhatjuk: hepatotoxinok (mikrocisztinek, nodularin), citotoxinok (cilindrospermopsin), neurotoxinok (saxitoxinok, anatoxinok) és dermatotoxinok (lipopoliszacharidok). Humán egészségügyi szempontból a hepatotoxinok és a neurotoxinok jelentik a legnagyobb veszélyt (Gácsi *et al.*, 2009). Az emberi szervezetben a máj a leginkább érintett szerv, azonban a toxinnak való kitettség valószínűleg más szerveket is érinthet (Campos & Vasconcelos, 2010). Azonban a cianobaktériumok jelenléte nem mindig jár együtt toxintermeléssel; nem minden faj termel cianotoxinokat, illetve a termelésük környezeti feltételektől is függhet. A vízvirágzások kb. fele mérgező, és gyakran többféle toxin is jelen lehet a vizekben (Faulkner *et al.*, 2025).

Számos cianobaktérium nemzetség termel mikrocisztineket (MCY), mint például *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* és *Nostoc* nemzetségeket (Máthé *et al.*,

2013a). A mérsékelt felszíni víztestek legártalmasabb cianobaktérium faja a *Microcystis aeruginosa*, Magyarországon is ez a faj okozza a legtöbb kárt (Kos *et al.*, 1995). A mikrocisztinek kb. 1000 Da molekulatömegű molekulák, ciklikus heptapeptidek, általános szerkezetük 7 aminosavból áll: három D-aminosavat, két variábilis L-aminosavat és két jellegzetes aminosavat, az N-metildehidroalanint (Mdha) és egy hidrofób D-aminosavat, a 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-diénsavat (Adda) tartalmaznak. Több mint 80 variáns ismert, melyek a variábilis L-aminosav oldalláncukban térnek el. A mikrocisztin-LR (MCY-LR) a leggyakrabban előforduló és tanulmányozott mikrocisztin, mely esetében a második aminosav egy L-leucin és a negyedik aminosav egy L-arginin (Campos & Vasconcelos, 2010; Máthé *et al.*, 2013a).

A mikrocisztinek irreverzibilisen gátolják a szerin/treonin protein foszfatázokat, specifikusan a PP1 vagy PP2A aktivitását, úgy, hogy az enzim katalitikus alegységével lépnek kölcsönhatásba, ezzel számos metabolikus és/vagy jelátviteli útvonalat megzavarva eukarióta sejtekben (Campos & Vasconcelos, 2010). A MCY-LR és a PP1, illetve PP2A közötti kölcsönhatást egy kétlépéses mechanizmusként írták le: (1) először egy nem-kovalens kötés jön létre a toxin Adda oldallánca és a protein foszfatázok aktív centruma között; (2) majd kovalens kötés alakul ki a toxin Mdha oldallánca és a protein foszfatázokon található ciszteinek között (Machado *et al.*, 2017). A katalitikus alegység kovalensen kötődik a MCY-LR Mdha régió karbonil csoportjához, de ez a kölcsönhatás nem szükséges a toxicitáshoz. A gátló hatásért az Adda oldallánc felelős, mert a hidrofób szénlánc behatol a protein foszfatázok aktív centrumába. Ez kulcsfontosságú a toxicitás szempontjából, az Adda rész elvesztése vagy az Adda nélküli szintetikus MCY-LR-nek nincs toxikus hatása (Máthé *et al.*, 2013a). *In vitro* kísérletekben a MCY-LR hasonló hatékonysággal gátolja a PP1 és PP2A protein foszfatázokat, *in vitro* protein foszfatáz gátlásának IC₅₀ (fele maximális gátló koncentráció) értéke 0,1-0,25 nM (Máthé *et al.*, 2013a, 2019). *In vivo* a protein foszfatáz gátlás mértéke függ a vizsgált fajtól és a szervtől. Például *Vicia faba* (lóbab) oldalgyökér csúcsokban a relatív alacsony koncentrációjú MCY-LR erősebben gátolja a PP1 aktivitását, mint a PP2A protein foszfatázt (ahol enyhe aktivitásbeli emelkedés is megfigyelhető), azonban teljes oldalgyökér kivonatokban a toxin mindkét foszfatázt enyhén gátolta. A magasabb koncentrációjú mikrocisztin erősen gátolta mind a PP1, mind a PP2A aktivitását függetlenül a vizsgált szövetről (Garda *et al.*, 2018; Máthé *et al.*, 2019). Ezeket a változásokat az inhibitoroknak a protein foszfatázok szabályozó alegységekre gyakorolt eltérő hatásainak is tulajdonították, de ezenkívül MCY-LR jelenlétében a különböző szabályozó alegységek eltérő affinitással képesek kötődni

a katalitikus alegységhez, amely szintén megzavarja az enzimműködést (Máthé *et al.*, 2019).

A MCY-LR nagy mennyiségű reaktív oxigén forma (ROS) termelését is képes indukálni mind *in vitro*, mind *in vivo* modellekben a toxikológiai hatás részeként (Campos & Vasconcelos, 2010; Valério *et al.*, 2016). A növényi anyagcsere normál melléktermékeként számos ROS képződhet különféle sejtalkotókban, azonban stresszkörülmények alatt a termelésük megnövekedik. A reaktív oxigén formák az oxigén aktivált származékai, leggyakoribbak közé tartozik a szinglet oxigén ($^1\text{O}_2$), a szuperoxid-anion (O_2^-), a hidroxilgyök (OH^\bullet) és a hidrogén peroxid (H_2O_2) (Blokhina, 2003; Livanos *et al.*, 2012; Bheri & Pandey, 2019; Máthé *et al.*, 2019). A reaktív oxigén formák kettős szerepet töltenek be a növényvilágban: egyrészt számos jelátviteli folyamatban nélkülözhetetlen molekulák, másrészt pedig az aerob anyagcsere toxikus melléktermékei is egyben. Számos antioxidáns rendszer vesz részt a ROS homeosztázis fenntartásában. Stresszhatás alatt felborulhat ez az egyensúly a ROS képződés irányába és oxidatív stresszt válthat ki (Mittler, 2017). MCY-LR megemeli az intracelluláris ROS szintet azáltal, hogy megköti a redukált glutationt. Ez oxidatív stresszhez – ROS termeléshez – vezet azáltal, hogy egyensúlyhiányt idéz elő a sejt redox állapotában, ami különböző sejtkárosodásokat okoz. A MCY-LR által indukált oxidatív stressz az antioxidáns mechanizmusok (enzimatis és nem-enzimatis útvonalak) aktivitását is modulálja (Máthé *et al.*, 2019). Ha ezek a védekező mechanizmusok nem hatékonyak a megnövekedett ROS eliminálásában, negatív következményekkel járhat a növények fejlődésében (Freitas *et al.*, 2015). Számos tanulmány számolt be az MCY-LR oxidatív stresszre adott válaszreakciókra gyakorolt hatásairól zárvatermő növényekben. Ezek a kutatások vízi és szárazföldi növények – például mustár (*Sinapis alba*), lóbab (*Vicia faba*) és lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) – esetében is megnövekedett ROS szintet, csökkent redukált glutation szintet, valamint fokozott antioxidáns enzimaktivitást (például szuperoxid-dizmutáz, peroxidáz és kataláz) mutattak ki (Pflugmacher, 2004; M.-Hamvas *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2018). Ezenkívül saláta protoplaszt sejtekben a felvett MCY-LR képes a mitokondriumok permeabilitását megnövelni és az elektron transzport lánc komplexjeivel kölcsönhatásba lépni hidrogénkötés révén, így blokkolva az elektron transzportot és ROS termelést idézve elő (Li *et al.*, 2025). A toxin protein foszfatázokra gyakorolt komplex hatása valószínűleg megzavarja az oxidatív stressz által irányított jelátviteli útvonalakat, ami kulcsfontosságú lehet az MCY-LR oxidatív stresszt kiváltó mechanizmusának megértésében (Máthé *et al.*, 2019).

Eutróf édesvizekben a mikrocisztin koncentrációja gyakran eléri a 0,01 μM koncentrációt, de toxikus vízvirágzás idején akár 25 μM -ra is nőhet (Szigeti *et al.*, 2010). A mikrocisztinek legnagyobb része intracellulárisan termelődik, melyek a cianobakteriális sejtek lízise után jutnak a vizekbe. A MCY-LR hónapokkal a vízvirágzás után is izolálható a vizekben a nagy stabilitásának köszönhetően (Máthé *et al.*, 2007; Faulkner *et al.*, 2025), illetve a talajban felgyülemlett mikrocisztin is akár több hétig megmaradhat (Faulkner *et al.*, 2025).

A mikrocisztin hatására bekövetkező protein foszfatáz gátlást és az oxidatív stressz indukálást követően különböző molekuláris események és jelátviteli útvonalak kaszkádja indul el, amely membrán károsodásokat (lipid peroxidáció), fehérje denaturációt, enzim inaktivációt, citoskeleton rendezetlenséget és sérülést, mitokondriális permeabilitás változást és károsodást, DNS károsodásokat, vagy akár apoptózist válthat ki (Valério *et al.*, 2016; Máthé *et al.*, 2019). A Debreceni Egyetemen végzett számos kutatás vizsgálta a mikrocisztinek növényekre gyakorolt hatását, köztük természetes vízvirágzások során érintett fajok (pl. *Ceratophyllum*, *Phragmites*) morfológiai, sejtes és molekuláris elváltozásait. Ezek közé tartozik a hajtás- és gyökérfejlődés zavara, citoskeletonális átrendeződés, lignifikáció, sejtfal elváltozások, valamint apoptózisra utaló jelek. A mikrocisztin célpontjai közé tartozik a citoskeleton és a protein foszfatázok (PP1, PP2A), amelyek gátlása sejtosztódási rendellenességeket okoz több modellnövényben, például *Sinapis alba*, vagy *Vicia faba*. *Arabidopsis thaliana* esetében kimutatták a membránkompartmentek (vakuólum, mitokondrium, sztomula) szerkezetének megváltozását és kloroplaszt osztódási rendellenességeket is. A különféle növények eltérő érzékenységet mutattak a mikrocisztinre, de közös jellemző a fejlődésgátlás és a sejszerkezeti károsodás, elsősorban a protein foszfatázok gátlása révén (Kos *et al.*, 1995; M-Hamvas *et al.*, 2003; M.-Hamvas *et al.*, 2010; Máthé *et al.*, 2013b; M-Hamvas *et al.*, 2021).

2.7. ImageJ és Fiji szoftver alkalmazása mikroszkópos felvételek feldolgozására

A mikroszkópia gyors fejlődése szükségessé tette a megfizethetőbb, egyre gyorsabb és pontosabb kvantitatív képkalkotást, ami ennek megfelelően fejlettebb képfeldolgozási és képelemzési technikákat igényel (Schindelin *et al.*, 2015). A nagy felbontású két- és háromdimenziós felvételek szubjektív, megfigyelésen alapuló elemzése már nem lehetséges, hisz a képkalkotás során hatalmas mennyiségű adat keletkezik. A felvételek értelmezéséhez olyan bioinformatikai módszerek és számítógépes technikák használata szükséges, mint például a térfogatrekonstrukció, 3D vizualizáció, a biológiailag releváns jellemzők keresése

(szegmentáció), az adott objektumok térbeli követése vagy digitális atlaszokon alapuló összehasonlítás. Már számos kereskedelmi (pl. Imaris, Volocity és Amira) és nyílt forráskódú (pl. ImageJ, CellProfiler, Vaa3D, BioImageXD, stb.) szoftverplatform létezik biológiai képek elemzésére. A régóta elérhető ImageJ szoftver számos tudományterület közkedvelt eszköze, amely széleskörű elterjedése és kiterjesztett bővítmény-architektúrája miatt népszerű a kutatók körében (Schindelin *et al.*, 2012).

Az ImageJ egy Java nyelven fejlesztett, nyílt forráskódú képelemző szoftver, amelyet Wayne Rasband és munkatársai hoztak létre a National Institutes of Health (NIH) intézetben, az első verziót 1997-ben adták ki. Ingyenesen elérhető a NIH hivatalos weboldalán (<https://imagej.net/ij/>), és nagy népszerűségnek örvend, mert számos képfeldolgozó és -elemző funkciót kínál, több operációs rendszeren (Linux, MacOS X és Windows) is futtatható, valamint szabadon felhasználható bármilyen célra (Abramoff *et al.*, 2004; Collins, 2007; Gallagher, 2014). Az ImageJ további előnyei közé tartozik, hogy számos adattípust képes kezelni: 8, 16 és 32 bites szürkeárnyalatos és színes képeket, számos különböző fájlformátumban, köztük a leggyakoribbakat, mint a TIFF és a JPEG. Továbbá az ImageJ folyamatosan bővül a felhasználók által fejlesztett funkciókkal, amely lehetővé teszi a rendkívül sokféle alkalmazási területet. Nap mint nap új képfeldolgozó és -elemző makró programok, illetve bővítmények kerülnek fel az ImageJ támogatói oldalára, melyeket gyakran lektorált publikációkban is validálnak. A fluoreszcencia alapú alkalmazások folyamatos fejlődésével az ImageJ továbbra is meghatározó eszköz maradt a laboratóriumi munkákban. Ezenkívül részletes online segédanyag érhető el a programhoz, illetve alapködjá folyamatosan frissül (Gallagher, 2014).

A képelemzés alapja, hogy a felvétel jó minőségű, vagyis éles, jól fókuszált és nem túltelített (szaturált) kép. A rögzített képnek a következő paramétereknek kell megfelelni az előbb felsoroltakon kívül: a lehető legnagyobb bitmélységgel készüljön (lehetőleg 16 bites) az intenzitás lineáris ábrázolásához; tartalmazza a teljes látómezőt a maximális felbontás érdekében; megfelelő optikai szűrők használata az alacsony háttér és a maximális jelintenzitás érdekében; TIFF formátumban legyen elmentve; az eredeti képet mindig változtatás nélkül mentjük, a feldolgozáshoz használt kép mindig az eredeti másolata és jegyezzünk fel minden elvégzett módosítást (Gallagher, 2014).

Az ImageJ makró programok és különböző bővítmények (plugin) segítségével tudja egyszerűsíteni és automatizálni a rutin munkát (Gallagher, 2014). Az ImageJ beépített makró nyelve egy könnyen használható, szövegalapú szkriptnyelv, amely lehetővé teszi több képfeldolgozási lépés automatizálását, akár

tömegesen is, és szükség esetén összetett elemzési folyamatokká bővíthető. A makró rögzítő funkció segítségével egyszerűen rögzíthetjük az automatizálni kívánt parancssort, majd az így létrehozott alap makró program tovább fejleszthető az ImageJ weboldalán elérhető részletes dokumentáció segítségével. A weboldalon számos makró program is elérhető, ami módosítható a felhasználó speciális igényeihez. Bár a makrók elég összetetté válhatnak, az ImageJ igazi ereje a pluginok-ban rejlik (Collins, 2007). Manapság több mint 500 bővítmény érhető el az ImageJ weboldalán, amely lista rendszeresen bővül (Gallagher, 2014). A bővítmények nagyon változatosak lehetnek, melyek módosíthatják a meglévő funkciókat vagy képesek teljesen új művelet bevezetésére. Az elérhető bővítményeket szabadon lehet kombinálni, így testreszabott és összetett elemzések is elvégezhetőek. Az ImageJ rugalmas felépítése lehetővé teszi új funkciók fejlesztését a meglévő eszközökre épülve, így nem szükséges teljesen az alapoktól létrehozni (Schindelin *et al.*, 2015). A bővítmények számos területet lefednek, például adatgyűjtést, elemzést, színkezelést, fejlett szűrést, grafikai műveleteket, nyomtatási beállításokat, stb. (Gallagher, 2014). A kvalitatív vizualizációt segítő bővítmények, mint a 3D Viewer vagy a Volume Viewer, interaktív 3D megjelenítést tesznek lehetővé az ImageJ-ben, támogatva a térbeli tájékozódást és szegmentálással kombinálva a kvantitatív elemzést is (Schindelin *et al.*, 2015). A MorpholibJ egy matematikai morfológián alapuló plugin, amely bináris és szürkeárnyalatos 2D/3D képek feldolgozását segíti morfológiai szűrés, morfológiai rekonstrukció, watershed szegmentáció, különböző mérések (2D és 3D-ben is) és számos egyéb segédeszközök révén (Legland *et al.*, 2016). A BoneJ plugin csontszövetek és más porózus struktúrák 3D morfometriai elemzésére készült, különösen mikro-CT felvételekhez. A BoneJ plugin elsősorban a csont geometriai jellemzőinek a meghatározásához készült, de a szoftver morfometriai eszközei – mint a térfogatfrakció, vastagság, anizotrópia kvantifikálása, részecske- és felületelemzés, 3D vizualizáció – alkalmasak bármilyen porózus anyag vagy részecske vizsgálatára, amelyek megtalálhatók az élelmiszerekben, talajban vagy egyéb biológiai struktúrákban, ha a képalkotás megfelelő felbontást és kontrasztot nyújt (Doube *et al.*, 2010), melynek továbbfejlesztett verziója a BoneJ2 (Domander *et al.*, 2021)

A Fiji (Fiji is just ImageJ) korszerűsíti az ImageJ alapvető felépítését, modern szoftverfejlesztési elvekre épül, ami különböző szkriptnyelvek és fejlett könyvtárak felhasználásával lehetőséget biztosít az új bioinformatikai megoldások és képfeldolgozó algoritmusok gyors fejlesztésére. Beépített frissítőrendszere révén elősegíti a fejlesztők és felhasználók közötti aktív együttműködést, közös platformot kínálva biológiai és informatikai kutatásokhoz (Schindelin *et al.*, 2012).

Miután a szoftver letöltésre került, egyszerűen futtassuk a telepítőfájlt, és kövessük az utasításokat; ezt követően a program készen áll a képek megnyitására és az elemzés megkezdésére (Gallagher, 2014). Az ImageJ/Fiji nélkülözhetetlen eszközzé vált a legtöbb rutinszerű képfeldolgozási és képelemzési feladatokhoz, sokoldalú funkcióival és könnyen hozzáférhető segédanyagaival hatékony munkavégzést tesz lehetővé még a korlátozott költségvetésű projektek esetén is (Collins, 2007).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. A kísérletekhez használt csíranövények, nevelésük és toxinkezelés

3.1.1. Vizsgált *Arabidopsis thaliana* genotípusok

Kísérleteinkben a vad-típusú modellnövényünk az *Arabidopsis thaliana* Columbia (Col0) ökotípus. Columbia háttérű protein foszfatáz (PP2A) mutánsokat is vizsgáltunk, melyekről részletes jellemzéséről a [2.5.2. alfejezet](#)ben írok. A kísérleteinkben a FASS B” regulátor alegység kétféle mutánsát használtuk fel, az erősebb fenotípust okozó *fass-5* mutánst (Camilleri *et al.*, 2002), illetve a gyengébb fenotípusú *fass-15* mutánst (Kirik *et al.*, 2012). A B” regulátor alegység mutációját tekintve külön vizsgáltuk a homozigóta recesszív (HZ), illetve a heterozigóta (HeZ) genotípusokat. Vizsgálataink során a PP2A enzim C katalitikus alegységét érintő *pp2ac3 pp2ac4* (a továbbiakban *c3c4*) dupla mutánsokat is elemeztük (Alonso *et al.*, 2003; Ballesteros *et al.*, 2013).

A PhD kutatásomhoz kapcsolódóan történt egy franciaországi együttműködés az INRAE Kutatóközpont, Jean-Pierre Bourgin for Plant Science (IJPB) Intézetének SPACE (Spatial Control of Cell Division) kutatócsoportjával Versailles-ben. Ezekben a kísérletekben további mutáns növények vizsgálatára került sor, beleértve a PP2A-A „scaffolding” alegység mutánsait (Zhou *et al.*, 2004), kísérleteinkben az *pp2aa1 pp2aa3* (a továbbiakban *a1a3*) és *pp2aa2 pp2aa3* (a továbbiakban *a2a3*) dupla mutánsokat használtuk a *c3c4* dupla katalitikus alegység mutánsok mellett. Vizsgáltuk még a TTP komplex *trm6 trm7 trm8* (a továbbiakban *trm678*) tripla mutánsait is (Schaefer *et al.*, 2017).

A hisztokémiai és immunhisztokémiai jelölésekhez az összes felhasznált *A. thaliana* genotípus esetében az elsődleges gyökeret vizsgáltuk. Azért választottuk elsősorban a gyökerek vizsgálatát mert erről az irodalomban már több adat elérhető. Például azok a tanulmányok is, amelyek az általunk felhasznált mutáns növényekkel foglalkoznak leginkább a gyökérben írták le a különböző sejtszintű elváltozásokat. Ezenkívül, ha az öntözővízben felszaporodik a MCY-LR a növény leginkább a gyökerén keresztül érintkezik a toxinnal, így itt fejtheti ki erőteljesebb hatásait. Illetve kutatócsoportunk az előző kísérletek alkalmával leginkább a gyökerek vizsgálatára koncentrált több modell esetében, így a különböző modellnövények között is összehasonlíthatjuk a toxin hatásait. Ezenkívül technikailag könnyebb a gyökércsúcsot jelölni a foszfo-hisztón H3 vizsgálatokhoz, mint a hajtáscsúcsot. Azonban a gyengén fejlett és kevés gyökérbiomassza miatt a *fass* HZ és *c3c4* mutánsok esetében a protein foszfatáz

aktivitás méréseket egész növényi mintában (hajtás + gyökér) végeztük, valamint kontrollként a Col0 esetében is a mintavétel egész növény volt.

A HeZ mutánsok vizsgálata esetében a vizsgált minta egy homozigóta domináns genotíusból (Col0) és *fass* HeZ mutáns növényekből álló „pool” volt, mert a fenotípus alapján nem lehetett elkülöníteni a növényeket. Ezért ezek eredményeit nem publikáltuk.

A kísérleteinkben használt mutáns magokat Dr. Martine Pastuglia (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, IJPB, Versailles, Franciaország) biztosította számunkra, amelyeket laboratóriumunkban és a növénynevelő szobánkban tovább szaporítottunk a szükséges magmennyiség előállítása érdekében. Az 1. táblázat összefoglalja a kísérleteinkben vizsgált lúdfű genotípusokat.

1. táblázat: A PhD kutatásom során vizsgált *Arabidopsis thaliana* genotípusok a Debreceni Egyetemen, illetve a franciaországi INRAE Kutatóközpontban végzett kísérletek alatt.

Debreceni Egyetem	INRAE Kutatóközpont
vad-típusú Col0	vad-típusú Col0
<i>ppa2c3 pp2ac4 (c3c4)</i> dupla C katalitikus alegység mutáns	<i>ppa2c3 pp2ac4 (c3c4)</i> dupla C katalitikus alegység mutáns
<i>fass-15</i> B” regulátor alegység mutáns: mutáció által fenotipikusan gyengébben érintett regulátor alegység mutáns	<i>pp2aa1 pp2aa3 (a1a3)</i> dupla A „scaffolding” alegység mutáns: erőteljes fenotipikus elváltozást mutat
<i>fass-5</i> B” regulátor alegység mutáns: mutáció által fenotipikusan erőteljesebben érintett regulátor alegység mutáns	<i>pp2aa2 pp2aa3 (a2a3)</i> dupla A „scaffolding” alegység mutáns: fenotipikus elváltozást alig mutat
	<i>trm6 trm7 trm8 (trm678)</i> tripla TTP komplex TRM alegység mutáns

3.1.2. Nevelési körülmények és toxinkezelés

Az *Arabidopsis thaliana* csíranövényeket *in vitro* hosszú nappalos körülmények között neveltük. A kísérleteket axénikus és kontrollált körülmények között végeztük. Az axénikus körülmények biztosítása érdekében a magok felületét sterilizáltuk úgy, hogy 10 percen keresztül 20% (V/V) hígítású, kereskedelmi forgalomban kapható nátrium-hipoklorit tartalmú fertőtlenítőszerrel (Unilever „Domestos”) kezeltük, majd háromszor 5 percig mostuk steril desztillált vízzel. A felület sterilizált magokat steril, 0,9% (w/V) Bacto agarral (VWR Chemicals/Avantor, Radnor, PA, USA) szilárdított módosított MS (MS*) (Murashige & Skoog, 1962) táptalajra helyeztük, amely Gamborg-vitaminokat

(Gamborg *et al.*, 1968) tartalmazott (Duchefa Biochemie, Haarlem, the Netherlands) és 2% (w/V) szacharózzal egészítettük ki. 48 órás hidegkezelést követően a magokat tartalmazó Petri-csészék a növényi szövettenyésztő szobába kerültek az alábbi körülmények közé: 14/10 órás fotoperiódus, $22\pm 2^\circ\text{C}$, $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ fotonfluxus sűrűség a fényperiódusban. Az öt napos előnevelt csíranövényeket folyékony MS* táptalajjal átítatott steril szűrőpapírra helyeztük és ebbe a táptalajba adagoltuk különböző koncentrációban (0,05 és $1 \mu\text{M}$) a MCY-LR-t (PP2A és PP1 gátló) a toxinkezelésekhez.

A Franciaországban használt felület sterilizálási módszer eltért, azonban ugyanazt a célt értük el vele, az axénikus körülmények megteremtését a kísérletekhez. A felületsterilizálás ez esetben nátrium-diklór-izocianurát tartalmú klóros fertőtlenítőszerrel történt (Nectra Pastilles Chlorées, „Barychlore”) 10x hígításban. Az oldattal a magokat 5 percig kezeltük, majd 2x átöblítettük 96° -os etanollal. Ezután az etanolt eltávolítottuk a magvokról, és hagytuk őket teljesen megszáradni. A felület sterilizált magokat 0,8% (w/V) Phyto-agarral (Duchefa Biochemie, Haarlem, the Netherlands) szilárdított $\frac{1}{2}$ MS* (Duchefa Biochemie, Haarlem, the Netherlands) táptalajra helyeztük, amely 1% szacharózt és 0,5% (w/V) MES-t (Acros Organics, Geel, Belgium) tartalmazott. Szintén 2 napos hidegkezelést követően a magokat tartalmazó Petri-csészék növénynevelő kamrába kerültek a következő körülményekkel: 16/8 órás fotoperiódus, $21\pm 2^\circ\text{C}$, $70\text{-}80 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ fotonfluxus sűrűség a fényperiódusban. Az 5 napos előnevelt csíranövényeket folyékony $\frac{1}{2}$ MS* táptalajjal átítatott steril szűrőpapírra helyeztük és ebbe a táptalajba adagoltuk különböző koncentrációban (1 és $5 \mu\text{M}$) a hesperadint (Aurora kináz gátló) a toxinkezelésekhez.

A toxinkezelések időtartama rövid távú, 24 órán keresztül tartott. Az 5 napos előnevelt csíranövényeket különböző koncentrációjú toxinokkal kezeltük, miközben minden esetben alkalmaztunk kontroll (K), kezeletlen mintát is. A különböző mutáns genotípusok kontroll mintája a kezeletlen Col0 volt, míg a toxinok hatását mindig az adott genotípus kezeletlen mintáihoz viszonyítottuk.

3.1.3. *A mikrocisztin-LR tisztítása*

A MCY-LR toxin tisztítását Kos és munkatársai (1995) módosított módszere alapján végezte Prof. Dr. Vasas Gábor és kutatócsoportja (DE, TTK, BÖI, Növénytani Tanszék) *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 jelű cianobaktérium törzs tenyészetéből. A törzs egy 1991-es Velencei-tavi vízvirágzásból származik. Röviden a cianobaktérium sejteket centrifugálással gyűjtötték össze, majd metanolos kivonás következett. A sejttörmelékét centrifugálással eltávolították, a felülúszót pedig bepárolták, így eltávolították a szerves oldószert a toxin pedig

visszamarad a szárazanyagban. Ezután a szárított mintákat Tris-HCl pufferben (pH 7,5) szuszpendálták, hogy vizes közegbe kerüljön a további tisztítási lépésekhez. A cianotoxin végső tisztítását DEAE Cellulóz-52 (Whatman DE 52) oszlopon végezték. A mikrocisztint tartalmazó eluátumokat Toyopearl méretkizárásos kromatográfiával tovább tisztították a szennyezőktől. A kinyert MCY-LR koncentrációját és tisztaságát fotometriás, nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), valamint kapilláris elektroforézis módszerek segítségével állapították meg (Vasas *et al.*, 2004). A vizsgálatban használt MCY-LR $\geq 95\%$ -os tisztaságú.

3.1.4. A toxin kezelési koncentrációk megválasztása

A vizsgálat során használt toxin koncentrációkat úgy választottuk meg, hogy a vizsgált időperiódusban (24 óra) sejthalál indukálása nélkül váltsanak ki sejtszintű elváltozásokat. MCY-LR esetében 5 μM feletti koncentrációk már rövid távú (24 óra) kezelés esetén is sejthalált okoztak. A kísérleteinkhez így 0,05 és 1 μM koncentrációkat választottunk. Az 1 μM MCY-LR jelentős protein foszfatáz gátlást idézett elő sejthalál nélkül rövid távú (24 órás) expozíció után. A 0,05 μM MCY-LR koncentráció környezetileg relevánsnak tekinthető, mivel hasonló értékek mérhetőek toxikus vízvirágzás során a szabad vizezterekben (Ujvárosi *et al.*, 2019).

A hesperadin koncentrációjának a megválasztása során az első kísérleteket 1 μM , 5 μM és 10 μM koncentrációban végeztük. 24 órás inkubációt követően 5 és 10 μM koncentrációjú hesperadin mellett a sejtostódás erőteljes csökkenését és a pH3S10 jelek erős hiányát tapasztaltuk, így ezek a magasabb koncentrációjú oldatok nem tűntek megfelelőnek. A célunk ennél a kísérletnél az volt, hogy teszteljük az újonnan kifejlesztett 3D kiértékelési módszert (lásd [3.6.2. alfejezet](#)) és precízen detektáljuk a kismértékű jelintenzitás csökkenést is. 1 μM koncentrációjú hesperadin mellett a pH3S10 jel még detektálható értékelhető intenzitásbeli különbségekkel a kontroll mintákhoz viszonyítva. A hesperadint a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől szereztük be.

3.2. Protein foszfatázok (PP1 és PP2A) aktivitásának meghatározása

3.2.1. Fehérje kivonás

A foszfatáz aktivitás vizsgálatok egész növényben, illetve gyökér mintákban történtek. A gyökerek begyűjtése időigényesebb folyamat, melynek során a hipokotil alatt egyesével vágjuk le a gyökeret (a folyamat jéggel hűtött környezetben történt). Az *Arabidopsis thaliana* mintákat első lépésben NaCl tartalmú foszfátpufferrel (1x PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄,

pH 7,4) átmostuk, a folyadékot szűrőpapír segítségével leittattuk a növényekről majd a különböző kezelések mintáit előre lemért Eppendorf-csőbe gyűjtöttük. A fehérjék natív kivonása úgy történt, hogy a növényi anyagot folyékony nitrogénben porítottuk majd jégen homogenizáltuk egy olyan pufferben, amely 50 mM Tris-HCl-t (pH 7,5), 0,1 mM EDTA-t, 0,2 mM EGTA-t, 0,1% (w/V) β -merkaptoetanolt, 1mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 4% (w/V) vízdoldékony poli-vinil-pirrolidont (PVP) tartalmazott. Ezenkívül a kivonó oldathoz adtunk 0,5% (V/V) proteáz inhibitor koktélt (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). A kivonó oldatot 1:1,5 arányban adtuk a növényi mintákhoz. Homogenizálás után 20000 \times g-n, 4°C-on történő centrifugálás (Beckman Avanti J-25) következett 20 percig, majd a felülúszó fehérjetartalmát Bradford szerint (Bradford, 1976), spektrofotometriás módszerrel (595 nm) határoztuk meg. Fehérje standardként borjú szérum albumint (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk. A protein foszfatáz aktivitás vizsgálatokat azonos mennyiségű fehérjével végeztük.

3.2.2. Izotópos aktivitás mérés

Az *in vivo* izotópos protein foszfatáz aktivitás méréseket, amely magában foglalja a PP1 és PP2A aktivitás együttes, illetve a külön-külön meghatározott aktivitásokat, a korábban leírtak szerint Erdődi és munkatársai (1995) módszere alapján Dr. Kónya Zoltán végezte (DE, ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet).

A foszfatáz aktivitás mérések szubsztrátja a [³²P]-MLC20 (³²P-jelzett 20 kDa molekulatömegű pulyka miozin könnyű lánc) volt. Szubsztrátként azért használtak simaizomból származó (pulyka zúza) foszforilált miozin könnyű láncot, mert azt elsősorban a PP1 és PP2A defoszforilálja a sejt kivonatokban. A vizsgálati elegy tartalmazta a sejt lízátumokból származó 10 μ g fehérje kivonatot és 2 μ M [³²P]-miozin könnyű lánc szubsztrátot. A specifikus foszfatáz aktivitás pmol [³²P] mg fehérje⁻¹ egységben van megadva, a kezelt növény (Col0) aktivitásának százalékában (100%) (Erdodi *et al.*, 1995). A külön-külön meghatározott PP2A és PP1 aktivitások méréséhez az oldat 2 μ M Inhibitor-2 (I-2)-t, egy természetes PP1 gátlót tartalmazott. A PP2A aktivitást az I-2 hozzáadása után mérték a kivonatokból, míg a PP1 aktivitást úgy határozták meg, hogy a PP2A aktivitást kivonták a teljes protein foszfatáz aktivitásból (Dedinszki *et al.*, 2015). A gátlószerek nélkül mért aktivitásokat 100%-nak tekintettük, és a kezelt mintákat a kontroll értékhez hasonlítottuk. Az így kapott relatív (%) meghatározott foszfatáz aktivitás értékek átlagát ábrázoltuk a szórás adatok feltüntetésével. A protein foszfatáz aktivitás vizsgálatokat kezelésként három párhuzamos mérésben és legalább három különálló ismétlésben végeztük növényi mintánkként.

3.3. Hisztokémiai és immunhisztokémiai jelölések

Toxin kezelést követően, illetve a különböző lúdfü genotípusok vizsgálata során a foszforilált hiszton H3 (pH3S10) és a mikrotubulusok kimutatása immunlokalizációval történt, a kromatin jelölésére pedig fluoreszcens festéket használtunk. A növények vizsgálatára whole-mount technikát alkalmaztunk, aminek fő előnye, hogy a növényt egészben, metszési eljárások nélkül lehet citológiai szinten vizsgálni és egy 3D-s képet kapunk az antigének sejten belüli elhelyezkedéséről. Az eljárás fő lépései Pasternak és munkatársai (2015) által leírtak szerint zajlottak: fixálás, permeabilizáció, blokkolás, valamint az elsődleges és szükség esetén másodlagos antitestek hozzáadása. A növényi sejtfal akadályozza az ellenanyag bejutását a sejtbe, ezért a sejtfalat enzimatikusan emésztjük a fixálást követően (Pasternak *et al.*, 2015).

A toxinkezelés után a mintákat 24-lyukú mikrotiter lemezbe helyeztük és a továbbiakban ebben dolgoztunk. Az első lépés a fixálás, amihez fixálóoldatot készítettünk: 2% (w/V) paraformaldehid (PFA) + 0,1% (V/V) Triton-X100 2x mikrotubulus stabilizáló pufferben (2x MTSB: 100 mM PIPES, 10 mM MgSO₄, 10 mM EGTA, 90 mM KOH, pH 7,0). A lépés célja az osztódó sejtek fixálása, hogy később az osztódás különböző fázisaiban lévő sejtek arányát meghatározhassuk. A fixáló oldatot a növényekre pipettáztuk, majd kétszer 5 percig vákuuminfiltráltuk, ezt követően 50 percig inkubáltuk vákuum nélkül, szobahőmérsékleten. A fixálást követően a mintákat háromszor 5 percig mostuk 1x MTSB oldattal.

Ezt követően a gyökérsúcsokat metanollal kezeltük, amely szerves oldószerként lebontja a kutikulát és növeli a szövetek permeabilitását (sejtfal, plazmamembrán), illetve csökkenti az autofluoreszcenciát. A mintákat 10 percig inkubáltuk 100%-os metanollal, majd csökkenő metanol koncentrációjú sorozatban rehidratáltuk (3 percenként növekvő mennyiségű ultratiszta vízzel hígítottuk a metanol koncentrációját). Ezután a mintákat ultratiszta vízzel mostuk 3x 5 percig.

A sejtfal enzimátikus emésztéséhez olyan enzimkocktételt használtunk, amely celluláz, hemicelluláz és pektináz aktivitású enzimeket tartalmazott. Ez a sejtfal fellazítását szolgálta, lehetővé téve az antitestek bejutását a sejtekbe, miközben a sejtek integritása megmaradt. Az enzimkocktételtünk 0,2% (w/V) Driselázt (Driselase™ *Basidiomyces* sp.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 0,15% (w/V) Macerozimot (Macerozyme R-10® from *Rhizopus* sp.; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) tartalmazott 2 mM MES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pufferben (pH 5,0). Az enzimek hozzáadása előtt a mintákat mélyített tárgylemezre helyeztük, majd nedves kamrába tettük, hogy megakadályozzuk a kiszáradásukat. Ettől a lépéstől számítva mélyített tárgylemezen dolgoztunk

tovább. Az inkubáció 37°C-on 25 percig tartott, majd a mintákat 3x 5 percig 1x MTSB-vel mostuk.

Ezután a csíranövényeket 10% (V/V) DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 3% (V/V) IGEPAL (IGEPAL® CA-630 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1x MTSB-ben hígított oldatával 20 percig 37°C-on permeabilizáltuk, majd 1x MTSB-vel mostuk az előzőekhez hasonlóan. A permeabilizálás során a membrán átjárhatóbbá válik, lehetővé téve az ellenanyagok számára a sejtekhez való hozzáférést.

A következő lépés a preinkubálás, amelyhez blokkoló puffert használtunk: 4% (w/V) BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1x MTSB-ben hígítva. Az inkubáció szobahőmérsékleten 30 percig tartott. A borjú szérum albumin a nem specifikus fehérjékhez kötődik, így lényegében a háttérrel csökkenti, illetve növeli az esélyét, hogy az antitestek, csak a vizsgálni kívánt antigénekhez kötődjenek. Ezt a lépést nem követte mosás.

Ezután az elsődleges antitesteket 4% (w/V) BSA + 1x MTSB oldatban hígítottuk és 12 órán át 4°C-on inkubáltuk. Az elsődleges antitestek a nyúlban előállított poliklonális anti- β -tubulin (ab15568; Abcam, Cambridge, UK) 1:100-os hígításban, illetve szintén nyúlban előállított poliklonális anti-foszfo-hiszton H3 S10 (anti-phH3S10, ab5176; Abcam, Cambridge, UK) 1:50-es hígításban. Ezzel az antitesttel azt a hiszton H3 fehérjét tudjuk jelölni, amely a szerin 10-es aminosavnál foszforilált állapotban van. A két immunjelölési eljárást külön kísérletekben végeztük, mert mindkettő azonos gazdaállatból származó antitest. Az inkubációt követően a mintákat 3x 5 percig 1x MTSB-vel mostuk.

A másodlagos ellenanyag Alexa 488 fluorofórral konjugált kecskében előállított anti-nyúl IgG volt (Alexa Fluor® 488, ab150113; Abcam, Cambridge, UK). Mikrotubulus jelöléshez 1:200 hígításban, foszforilált hiszton H3 jelöléshez pedig 1:100 hígításban alkalmaztuk. A másodlagos antitesttel való inkubálást 4% (w/V) BSA + 1x MTSB oldatban végeztük 4 órán át, 37°C hőmérsékleten, majd a mintákat háromszor mostuk 1x MTSB oldattal.

Ezt követően a sejtmag jelölésére egy fluoreszcens festéket, a 4',6'-diamidino-2-fenil-indol-t (DAPI; Fluka, Buchs, Switzerland) használtunk. A mintákat 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációjú, 1x MTSB-ben hígított DAPI-val inkubáltuk 30 percig, majd háromszor mostuk át 1x MTSB oldattal körönként 5 percig. A DAPI egy olyan, UV tartományban gerjeszhető, kék fluoreszcenciát emittáló festék, amely erősen kötődik a DNS adenin és timin gazdag régióiba.

Végül a preparátumok készítése következett: a növényeket Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) rögzítő közeg segítségével rögzítettük a tárgylemezre. A Mowiol® 4-88 megszáradása 24 órát vesz igénybe

szobahőmérsékleten, majd a mintákat hűtőben tároltuk a mikroszkópos felvételek készítéséig (maximum 1-2 hétig). A kísérleteket többszörös, független biológiai ismétlésben végeztük el, minden genotípus és minden kezelés minimum 5 alkalommal ismétlésre került, kísérletenként 3-4 gyökérminta elemzésével.

A versailles-i kutatóintézetben végzett immunlokalizációs kísérlet főbb lépései megegyeztek (fixálás, sejtfalemésztés, permeabilizáció, antitestek és fluoreszcens festékek hozzáadása) azonban a protokoll lépései kissé eltértek az ottani körülményekhez alkalmazkodva. A 24-lyukú mikrotiter lemezbe 3D nyomtatott kosárcákát tettünk, így az oldatok cseréje könnyebb volt a különböző lépések között. A minták fixálása 4% (w/V) PFA-val (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 0,1% (V/V) Triton-X100-al (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) történt ½ MTSB pufferben hígítva. Az inkubáció 1 órán át tartott vákuum alatt, majd a mintákat ½ MTSB pufferrel mostuk 10 percig. Ezután metanolos permeabilizálás következett 15 percig, majd a minták rehidratálása 1x PBS (Eurobio Scientific, Les Ulis, Franciaország) pufferrel történt 10 perc inkubációs idő mellett. A sejtfal emésztéshez használt enzimektől 0,02% (w/V) Drizelázt (Driselase™ *Basidiomyces* sp.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 0,015% (w/V) Macerozimot (Macerozyme-R10; Yakult Pharmaceutical Industry Co., Tokyo, Japan) tartalmazott 5 mM MES (Acros Organics, Geel, Belgium) pufferben (pH 5,0) hígítva. Az inkubáció 55 percig tartott 37°C hőmérsékleten. A minták PBS-el történő 10 perces átöblítése után az elsődleges antitestek hozzáadása következett. A mikrotubulusok jelölésére monoklonális, egerben termeltetett anti- α -tubulin antitestet (B5.1.2 - T5168; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) használtunk 1:2000-es hígításban, 1x PBS pufferben. A foszforilált hiszton H3 jelölésére nyúlban termeltetett poliklonális anti-phH3S10 antitestet (ab5176; Abcam, Cambridge, UK) használtunk 1:2000-es hígításban. A francia minták esetében a két immunjelölési eljárást egy kísérletben tudtuk elvégezni, mert a két antitest különböző gazdaállatból származik. Az elsődleges antitestekkel történő hibridizáció „overnight” tartott 4°C-on. Másnap a mintákat 20 percig mostuk 1x PBS-el, amely 50 mM glicint is tartalmazott. Ezután a másodlagos antitestekkel történő inkubáció szintén „overnight” zajlott, szobahőmérsékleten. A mikrotubulusok kimutatásához használt másodlagos ellenanyag kecskében előállított, Alexa 555-el konjugált anti-egér IgG volt (Alexa Fluor™ 555, A21422; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), míg a phH3S10 kimutatásához Alexa 488-al konjugált anti-nyúl IgG volt a másodlagos ellenanyag, amelyet szintén kecskében állítottak elő (Alexa Fluor™ 488, A11008; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A másodlagos ellenanyagok hígítása 1x PBS-ben 1:2000 mindkét esetben. A minták 20 percig történő mosása után, 1x PBS + 50 mM glicint

tartalmazó oldattal, a kromatin festése következett. Ehhez $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) festéket használtunk $1\times$ PBS + 50 mM glicin oldatban hígítva. Az inkubáció 30 percig tartott, majd a mintákat 20 percig mostuk PBS-el. A gyökér preparátumokat Vectashield® Antifade (Vector Laboratories, Newark, CA, USA) rögzítő anyag segítségével készítettük, illetve Secure-Seal™ Spacer (8 rekesz, 9 mm átmérő, 0,12 mm mélység; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével kerültük el a minták összenyomását és bármilyen deformációját, ezzel biztosítva, hogy a teljes gyökeret 3D-ben lehessen rögzíteni mikroszkópos vizsgálat során. Az összehasonlítható genotípusokat és toxin kezelt növényeket ugyanabban a kísérletben jelöltük és egy időben mikroszkopizáltuk, átlagosan 7-8 gyökeret elemeztünk genotípusonként vagy kezelésként.

3.4. Mikroszkópos felvételek készítése

A fluoreszcensen jelölt növényi gyökér minták elemzése konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával (CLSM) történt. A jelölt fehérjék (mikrotubulus, foszforilált hiszton H3) és a DNS vizuális megjelenítéséhez különböző beállításokat alkalmaztunk a használt mikroszkóp típusától és a jelölés jellegétől függően. A mikroszkópos képeket Fiji (Fiji is just ImageJ) szoftver (Schindelin *et al.*, 2012) segítségével elemeztük.

3.4.1. Zeiss LSM 880 és Nikon Ti-E (Debreceni Egyetem)

A Debreceni Egyetemen vizsgált mintákat – Col0, valamint PP2A protein foszfatáz B” regulátor alegység (*fass-5*, *fass-15*) és C katalitikus alegység (*c3c4*) mutánsok – Zeiss LSM 880 és Nikon Ti-E típusú mikroszkóppal elemeztük.

Azokat a minták, ahol a mikrotubulusokat és a kromatint jelöltük, a Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) konfokális mikroszkóppal és Zen Black 2.3 szoftverrel vizualizáltuk, és egy C-Apochromat 40x/1.2 W Korr FCS M27 objektívet használtunk. Az Alexa 488 megjelenítéséhez hagyományos beállításokat használtunk: a fluorofór gerjesztéshez Arg (argon) lézert alkalmaztunk, az emissziót pedig egy 490 nm-es dikroikus tükör és egy 490/530 nm-es szűrőkészlet mellett figyeltük meg. A DAPI jelölés elemzéséhez 405 nm-es diódlézert használtunk, a jel detektálása pedig a festékre vonatkozó hagyományos LSM paraméterek szerint történt, amely magában foglalja a lézer teljesítményének beállítását, a fotoelektron-sokszorozó (PMT) érzékenységének optimalizálását, az emissziós hullámhossz detektálásához szükséges szűrő beállításokat. Továbbá optimalizáltuk a felvétel sebességét, vonalátlagolást és a pixelméretet a megfelelő

jel-zaj arány és képfelbontás érdekében. A Debreceni Egyetem Zeiss LSM 880 mikroszkópjával készült felvételeket Dr. Ujlaky-Nagy László (DE, ÁOK, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen, Magyarország) készítette.

A foszfo-hisztin H3 és kromatin jelöléssel ellátott mintákat Nikon Ti-E inverz szuperrezolúciós mikroszkóppal (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA) és NIS-elements Ar szoftverrel (verziószám: 5.30.02) vizualizáltuk, és egy Plan Apo VC 60x/NA 1.40 DIC N2 objektívet használtunk. A DAPI festék megjelenítéséhez 405 nm-es lézert és 405/50 szűrőkészletet használtunk, az emisszió hullámhossza 425/475 nm volt. Az Alexa 488 fluorofór detektálásához 488 nm-es lézert és 525/50 szűrőkészletet alkalmaztunk, az emissziót ebben az esetben az 500/550 nm hullámhosszon figyeltük meg. A Debreceni Egyetem Nikon Ti-E mikroszkópjával készült felvételeket Dr. Garda Tamás (DE, TTK, BÖI, Növénytan Tanszék) készítette.

A kísérleteket többszörös független ismétlésben végeztük el, minden genotípus és minden kezelés minimum 5 alkalommal ismétlésre került, kísérletenként 3-4 gyökérminta elemzésével. Minden alkalommal a mikroszkóp beállítások a kontroll (Col0, kezeletlen) mintához lettek módosítva, úgy, hogy a pixelintenzitások ne telítődjenek.

3.4.2. Leica SP8 (INRAE Kutatóközpont)

A Franciaországban végzett kutatómunka alkalmával vizsgált Col0, PP2A-C3/C4 alegység mutánsok (*c3c4*), PP2A-A alegység mutánsok (*a1a3*, *a2a3*) és TTP komplex mutáns (*trm678*) minták felvételei Leica SP8 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország) típusú konfokális mikroszkóppal készültek és HC PL APO CS2 40x/1.30 OIL objektívet használtunk. A DAPI, az Alexa 488 és az Alexa 555 detektálása 405 nm, 488 nm és 561 nm hullámhosszú lézertel történt, melyek emissziós hullámhosszai 420/446 nm, 495/540 nm és 570/620 nm. A DAPI és pH3S10 jelölésekhez PMT (fotoelektron-sokszorozó) detektorokat, míg a mikrotubulusokhoz hibrid detektort alkalmaztunk. A teljes 3D kép felvétele 12 bites, hogy a foszfo-hisztin H3 jel nagy dinamikatarományban jelenjen meg, biztosítva, hogy ezen a csatornán ne legyen telített pixel. Ezenkívül a felvételek ugyanazon zoommal, azonos voxel mérettel (350 nm x 350 nm x 350 nm) és ugyanazokkal a beállításokkal készültek. A pH3S10 csatornán a felvételek készítésénél minden esetben azonos lézerteljesítményt, azonos akusztó-optikusan hangolt szűrő (AOTF) beállítást, azonos PMT erősítést használtunk, illetve offset nélküli beállítást és 2-es vonalátlagolást alkalmaztunk. Az összes összehasonlítandó genotípust vagy hesperadin kezelt növényt ugyanabban a kísérletben jelöltük és egy időben készítettük a mikroszkópos felvételeket. Átlagosan 7-8 gyökéret elemeztünk

genotípusonként vagy kezelésként. Minden alkalommal azonos beállításokat használtunk a mikroszkopizálás során.

3.5. A mitotikus aktivitások elemzése

A gyökércsúcs merisztéma sejtek (RAM) osztódóképességének vizsgálatakor minden osztódási stádiumot külön megszámloltunk, majd az adatokból kiszámoltuk a mitotikus indexet (MI) az alábbi képlet alapján:

$$MI = \frac{\text{osztódó sejtek száma}}{\text{összes sejtek száma}} \times 100$$

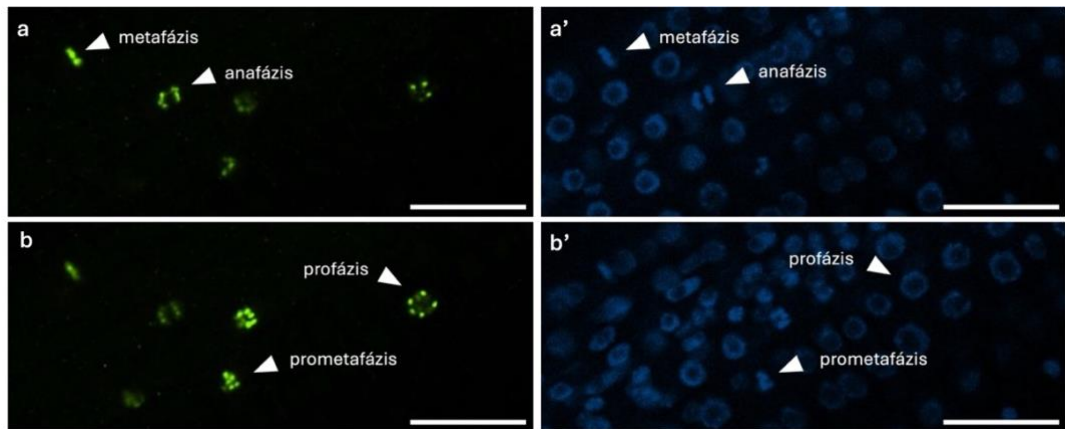
A különböző osztódási stádiumokban lévő sejtek arányát is megállapítottuk. A mitotikus indexeket az összes mitotikus sejtek százalékos arányaként adtuk meg, valamint külön az osztódás korai (profázis + prometafázis + metafázis) és kései (anafázis + telofázis + citokinézis) szakaszában lévő sejtek százalékos arányaként, a gyökércsúcs merisztémák (RAM-ok) összes sejtjének számához viszonyítva. A pontos eredmények érdekében külön módszereket alkalmaztunk a mitotikus indexek meghatározásakor: a mikrotubulusok jelölése lehetővé tette a kései mitotikus fázisok egyértelműbb elkülönítését, a foszfo-hiszton H3 jelölés pedig javította a korai mitotikus fázisok megkülönböztetését. Az adatok ábrázolásához az átlagos értéket számítottuk ki. Az elemzésből kizártuk a nyugvó centrumot, a kialakuló szállító szövet és a gyökérsüveg sejtjeit.

3.6. A foszforilált hiszton H3 szint meghatározása

3.6.1. A fluoreszcens jelintenzitás 2D elemzése

A Nikon Ti-E konfokális mikroszkóppal készült felvételek esetében egy-egy gyökérről Col0 esetében kb. 15-20 képszelet készült, a vastagabb gyökerű mutánsok esetében valamivel több. A használt szeletelési lépték 1,5 - 2 μm vastagság, az egy gyökérről készült mikroszkópos felvétel több képszeletből áll össze. A mikroszkopozás közben és a szeletelési vastagság beállítása alatt figyelünk arra, hogy a legtöbb sejt fluoreszcens jele egy-egy szeletben fókuszban legyen. A gyökerek mikroszkópos felvétele a legelső fluoreszcens jeltől a legutolsó észlelt pH3S10 jelig történt, így előfordul, hogy a legelső, illetve a legutolsó sejt sorokról nem készült kép. Ebben az esetben, egy-egy gyökérről nem készült teljes 3D-s felvétel, egy-egy sejtről általában 2-3 képet készítettünk, a célunk a fókuszban levő fluoreszcens jelek átlag intenzitásának a mérése volt.

A Fiji szoftver (Schindelin *et al.*, 2012) segítségével elemeztük és kvantifikáltuk a fluoreszcens jelek intenzitását. A pH3S10 jelek fekete háttér előtt jelennek meg, az antitest segítségével csakis a foszforilált fehérje jelölődik specifikusan az osztódó sejtekben (8. ábra). A fluoreszcens jel intenzitás értékét a háttér kivonása után a terület integrált optikai denzitást (AIOD) mutató pixel számaként fejeztük ki. Az értékek az átlag pixel intenzitást mutatják egy-egy kijelölt területen. Az osztódó sejtek fluoreszcens jelerősségét egyesével mértük, abban a szeletben, ahol a jel fókuszban volt. Ehhez a Fiji szoftver szabad kezű kijelölő eszközével körbe rajzoltuk a fluoreszcens jelet kinagyítás után, majd a pixelintenzitások átlag értékét mértük le az adott szeletben a program „Analyze → Measure” funkciójának a segítségével. A pixelintenzitások egyes átlag értékeit feljegyeztük a különböző osztódó fázisokban, majd ezt ábráztuk grafikusán. A különböző osztódó fázisokat a következőképpen határoztuk meg (8. ábra): profázisban a pH3S10 fluoreszcens jel eloszlása pöttyös, hiszen a mitózis legelején a hiszton H3 kizárólag a centromer régióban foszforilálódik, a DNS szerkezete az interfázisos sejtekére hasonlít. A profázis esetében a jelintenzitás mérése három külön pont (vagy amennyi fókuszba esik) lemérésével, majd az intenzitásértékek átlagolásával került elemzésre. A prometafázisban a kromoszóma már kondenzáltabb, a pH3S10 jelek pöttyös eloszlása is kezd megszűnni, kondenzáltabb a hiszton jel is. Metafázisban a hiszton H3 foszforilációja már teljesen kiterjed a kromoszóma karokra, a kromoszóma a középsíkban detektálhatók erősen kondenzáltan. A prometafázis és metafázis esetében a teljes pH3S10 fluoreszcens jelet rajzoltuk körbe és mértük le. Anafázisban/telofázisban a testvérkromatidák szétválnak, így a pH3S10 jel két egymás mellett lévő vonalban jelenik meg, ez esetben a két testvérkromatida pixelintenzitása külön-külön került mérésre, majd ennek átlag értékét használtuk az elemzéshez. A háttér intenzitások leméréséhez egy „fekete” területet jelöltünk ki és ott mértük le a pixel átlag intenzitását, majd ezt az adatot vontuk ki a pH3S10 jelintenzitásokból, minden szelet esetében külön-külön. Az elemzés alatt figyelni kellett arra, hogy egy osztódó sejtet csak egyszer mérjünk, még abban az esetben is, ha több szeleten keresztül látszódik a fluoreszcens jel. Az elemzéshez mindig azt a szeletet választottuk, ahol a fluoreszcens jel fókuszban van, és a legélesebb.



8. ábra: Foszforilált hiszton H3 fluoreszcens jel detektálása *Arabidopsis thaliana* Col0 gyökércsúcs merisztéma sejtekben: A pH3S10 kizárólag az osztódó sejtekben jelenik meg, a profázis során a centromer régióban (pöttyös fluoreszcens jel eloszlás) detektálható, majd kiterjed a kromoszóma karokra a mitózis előrehaladtával. *A. thaliana* Col0-ról készült felvételében két egymást követő képszelet, ahol egy-egy osztódó sejt más szeletben esik fókuszba: **(a)** metafázis és anafázis pH3S10 jelölés; **(b)** profázis és prometafázis pH3S10 jelölés. **(a')** és **(b')** ugyanazon képszeletek DAPI jelölése, ahol a kromoszóma organizáció szintén jól megfigyelhető az egyes mitotikus fázisokban.

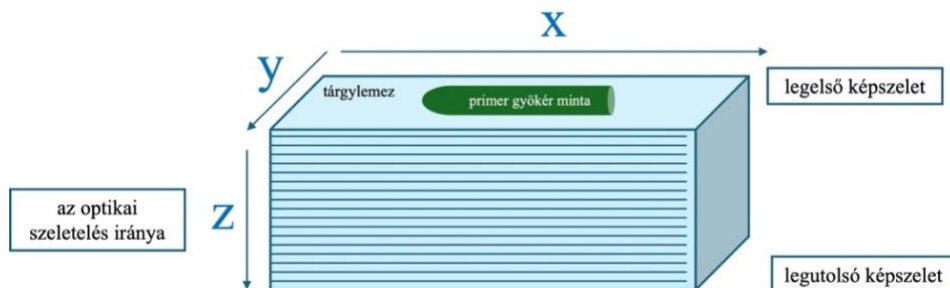
Méret skála: 20 μm

3.6.2. A fluoreszcens jelintenzitás 3D elemzése

Ellentétben a Debreceni Egyetemen készült mikroszkópos gyökérfelvételekkel, Franciaországban a Leica SP8 konfokális mikroszkóppal készült felvételek esetében a szeletvastagság beállítása kisebb volt, nevezetesen 0,35 μm . Ilyen beállítás mellett Col0 esetében kb. 300 képszelet készült, mutáns genotípustól függően ± 100 . Ezzel a beállítással egy-egy osztódó sejtről több kép (~15-20 db) is készült, illetve mindegyik gyökéret a legelső sejtsortól a legutolsó sejtsor végéig szkenneltük, így teljes 3D képet kapunk a gyökérről és a vizsgálni kívánt sejtalkotók elhelyezkedéséről. Ez lehetővé tette a pH3S10 fluoreszcens jelintenzitás 3D-ben történő elemzését. A fluoreszcens jel intenzitását a pixelek (3D esetén voxelek) integrált denzitásaként (IntDen) határoztuk meg, amely a szegmentált objektumokhoz – azaz a pH3S10 pozitív osztódó sejtekhez – tartozó voxelek intenzitás értékeinek összegét jelenti.

Az eddig alkalmazott kézi, egyesével történő elemzés időigényes, illetve nagyobb mértékben fennáll a szubjektivitás és az emberi tévedés lehetősége. A franciaországi SPACE kutatócsoporttal együttműködve sikerült egy 3D képalkotáson alapuló elemzési folyamatot létrehozni, amely lehetővé teszi a hiszton H3 foszforiláció félautomata módon történő mérését a lúdfű mitotikus gyökér merisztéma sejteiben. Minden elemzést a Fiji szoftverben (Schindelin *et al.*, 2012) végeztünk. Az elemzési folyamatokat ImageJ makrók formájában írta Dr. David

Bouchez (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin for Plant Science (IJPB), Versailles, Franciaország) bioinformatikus a BoneJ2 (<https://imagej.net/plugins/bonej>) (Domander *et al.*, 2021) és a MorphoLibJ (<https://imagej.net/plugins/morpholibj>) (Legland *et al.*, 2016) ImageJ bővítményeinek segítségével. Konfokális mikroszkóppal készült felvételek esetében jól ismert probléma a jelerősség csökkenése a Z-mélység („Z-stack”) előrehaladásával (9. ábra), ami elsősorban a gerjesztő és a kibocsájtott fény szórásának és abszorpciójának köszönhető, illetve fotokémiai fakulás következménye is lehet (Biot *et al.*, 2008; Ohser *et al.*, 2020). Ezáltal előfordulhat, hogy a legutolsó képszeletben a pH3S10 jelerőssége számottevően csökken a legelső szeletben detektálható fluoreszcens jelhez képest. Ezért a versailles-i SPACE kutatócsoport tudósai segítségével egy megbízható módszert dolgoztunk ki a jelerősség Z-mélységgel történő csökkenés becslésére, amely segítségével közvetlenül a vizsgált objektumok alapján teszi lehetővé a konfokális képfelvétel utólagos jelintenzitás korrekcióját, illetve biztosítja a fluoreszcens jelek kvantitatív kiértékelésének jelentős javítását. Ezzel a módszerrel pontosabban meghatározható hiszton H3 foszforilációs mértéke a mitózis különböző fázisaiban.



9. ábra: A konfokális mikroszkóp optikai szeletelésének bemutatása, a Z-mélység vizuális ábrázolása

A fluoreszcens jelintenzitás a mintában az egyre mélyebb optikai szeletek felvétele készítése során a jel természetéből adódóan csökken, ezért a „Z-stack” legutolsó képszeleteiben (képszelet számával kifejezve, pl. a 216-os képszeletben) az intenzitás csökkenése már szabad szemmel is észlelhető lehet.

Az analízis folyamata három különböző makró működését veszi igénybe, az első a jelerősség csökkenését korrigálja a Z-mélységben, a második az egyes pH3S10 fluoreszcens jelek intenzitását méri le a korrigált felvételeken, a harmadik pedig az osztódó sejtek különböző fázisban lévő állapotának a meghatározására szolgál. A módszert és a program működését részletesen az „Eredmények” fejezetben (lásd [4.4. alfejezet](#)) fejtem ki. Az ImageJ makró programokat Dr. David Bouchez írta és fejlesztette az általam végzett mikroszkópos képanalízisek eredményei alapján. A projekt során a feladatom a nagyszámú mikroszkópos

felvétel kvantitatív elemzése volt, amely során kapott adatok több körben hozzájárultak a program optimalizálásához. A végleges verzió elkészültéig az elemzést legalább három alkalommal megismételtem, miközben folyamatosan egyeztettem Dr. Martine Pastuglia és Dr. David Bouchez kutatókkal.

3.7. Grafikai ábrázolások és statisztika

Debrecenben minden számszerűsített adatot a Systat Sigma Plot 10.0/12.0® szoftver (Systat Software, San Jose, CA, USA) segítségével ábrázoltunk, az ábrák az átlag \pm SE (standard hiba) értékeket mutatják. A kontrollok és a kezelések közötti különbségek statisztikai szignifikanciáját post-hoc: Holm-Sidak módszerrel és t -tesztekkel vizsgáltuk. A különbségeket az alkalmazott statisztikai beállításoknak megfelelően $p < 0,05$ esetén statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Az adatelemzés során azt vizsgáltuk, hogy a különböző mutáns genotípusok és a toxinkezelések miként befolyásolják a mért paramétereket, figyelembe véve a genotípus és az MCY-LR kezelés hatásait külön-külön. Az ábrákon az „X” szimbólumok minden minta szignifikáns különbségét mutatják a kontroll vad-típusú (Col0) mintához képest, míg a „*” szimbólumok az adott genotípuson belüli kezelések közötti szignifikáns különbségeket mutatják. A p -értékeket az ábrákon három szinten jelöltük: X, * = szignifikáns különbség ($p < 0,05$); XX, ** = szignifikáns különbség ($p < 0,01$); XXX, *** = szignifikáns különbség ($p < 0,001$). A szórásokat minden esetben standard hibaként számoltuk ki. Amint azt fentebb említettük, minden kísérlethez csoportonként legalább három független megfigyelést használtunk.

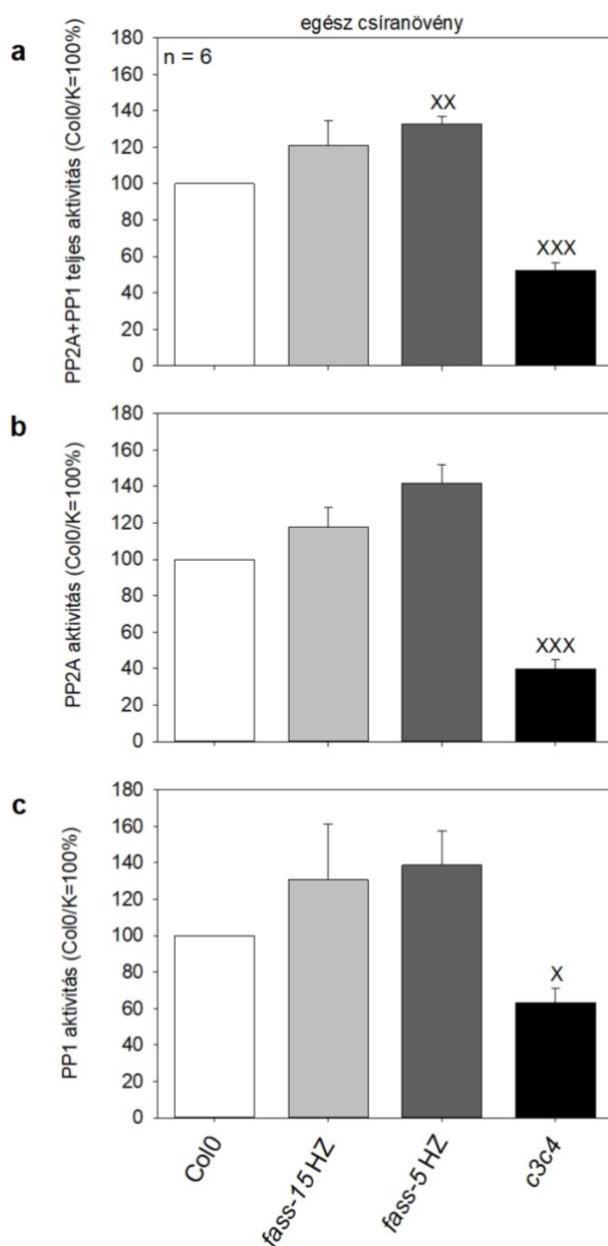
A Franciaországban végzett kísérleti adatok statisztikai elemzése és ábrázolása eltérő módszerrel történt. A statisztikai elemzésekhez két-két összehasonlításon alapuló Mann-Whitney tesztet használtunk, amely a független mintás t -teszt nem-paraméteres alternatívája. A grafikon fölötti csillagok a csoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbséget jelzik: *** = $p < 0,05$; ns = nem szignifikáns. A grafikonok ábrázolása ggplot2 (Wickham, 2016) és Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) segítségével történt, az ábrák szórása az átlag \pm CI95 (az átlag 95%-os konfidencia intervalluma) értékeket mutatják.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A protein foszfatáz aktivitás (PP2A + PP1) változásai a különböző genotípusokban és toxinkezelés hatására

4.1.1. A kontroll genotípusokban mért protein foszfatáz aktivitások

Kíváncsiak voltunk, hogy a különböző PP2A alegységek kiesése, hogyan befolyásolja a protein foszfatáz aktivitásokat. Az *in vivo* protein foszfatáz aktivitás vizsgálata során biokémiai módszerrel mértük a PP2A és PP1 együttes aktivitását, valamint külön-külön is vizsgáltuk a PP2A, illetve a PP1 aktivitásának mértékét a különböző *A. thaliana* genotípusokban. Minden esetben 100%-nak a vad-típusú Col0 mintáit tekintettük és ehhez viszonyítottuk a változásokat. A kezeletlen minták összehasonlítása érdekében, minden genotípus esetében az egész csíranövény foszfatáz aktivitását elemeztük, hisz a mutáns növények kisebb gyökér fenotípusa miatt nem tudtunk elegendő mintát gyűjteni (10. ábra). A B'' regulátor alegység mutánsokat elemezve a teljes protein foszfatáz aktivitás magasabb volt, mint a Col0 mintában, ami a *fass-5* HZ esetében szignifikáns változásnak tekinthető (10/a. ábra). Külön-külön vizsgálva a PP2A és PP1 aktivitásokat is ezekben a modellnövényekben, szintén emelkedett aktivitást tapasztalhatunk (10/b-c. ábra). A katalitikus alegység *c3c4* dupla mutáns esetében szignifikáns csökkenés detektálható nemcsak a teljes protein foszfatáz aktivitásban (10/a. ábra), hanem külön-külön a PP2A és PP1 aktivitásában is (10/b-c. ábra). Összességében azt tapasztaltuk, hogy a C katalitikus alegység kiesése gátolja, míg a FASS regulátor alegység kiesése serkenti mind a PP2A, illetve a PP1 protein foszfatáz aktivitásokat.



10. ábra: A PP2A alegységek különböző mutációi befolyásolják a protein foszfatázok aktivitását egész csíranövényben. Izotópos foszfatáz mérés eredményei: **(a)** Teljes protein foszfatáz aktivitás (PP2A és PP1 együttesen), ahol a *fass* HZ mutánsok megnövekedett, illetve a *c3c4* mutáns csökkent aktivitása detektálható; **(b)** csak a PP2A aktivitásának mértéke és **(c)** csak a PP1 aktivitásának a mértéke azt mutatja, hogy külön-külön is növekedett (*fass* HZ), illetve csökkent (*c3c4*) a foszfatáz aktivitás a mutáns genotípusokban.

A Col0 kontroll mintáit (Col0/K) 100%-nak vettük, és ehhez viszonyítottuk a mutánsokban mért változásokat.

A „X” szimbólumok minden minta szignifikáns különbségét mutatja a Col0 kontrollhoz képest.

X = $p < 0,05$; XX = $p < 0,01$; XXX = $p < 0,001$

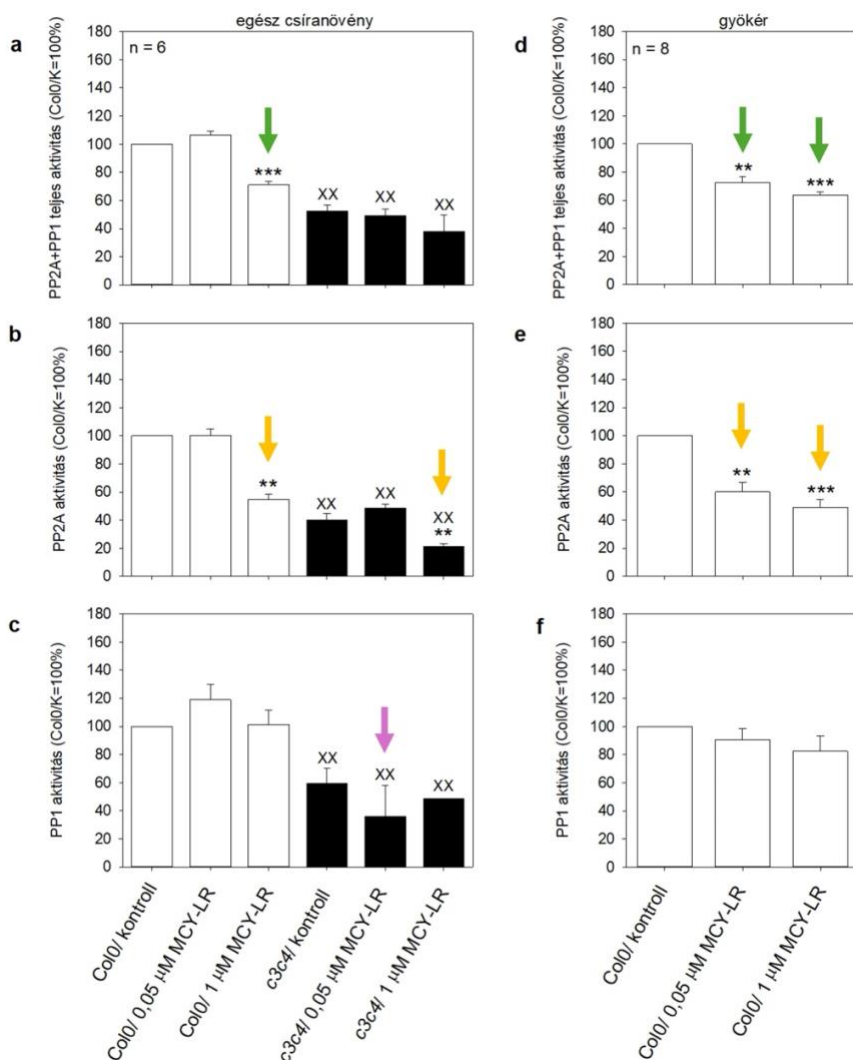
n = kísérleti ismétlések száma

4.1.2. MCY-LR által kifejtett hatások a protein foszfatáz aktivitásokra

A MCY-LR-rel kezelt minták esetében azt vizsgáltuk, hogy a toxinkezelés milyen további hatással van a protein foszfatáz aktivitásokra. Ennek azért van jelentősége, mert ilyenkor nem csupán egyetlen PP2A holoenzim komplex (a C3/C4 és FASS alegységekkel) működése gátlódik, hanem a toxin hatására az összes PP2A és PP1 enzimkomplex aktivitása is gátlás alá kerül. A mikrocisztin kezelés hatása a foszfatázok aktivitására genotípus- és koncentráció-függő módon változott.

A toxinok hatását az adott genotípus kezeletlen mintáihoz viszonyítottuk. A MCY-LR hatását a teljes Col0 csíranövényben, illetve külön, a gyökerekben is megvizsgáltuk. Az egész csíranövény esetében csak a nagyobb, 1 μM koncentrációjú MCY-LR gátolta szignifikánsan a teljes és a PP2A foszfatáz aktivitásokat (11/a-b. ábra). A magasabb koncentrációjú (1 μM) MCY-LR a gyökerekben is hasonló hatást váltott ki a teljes és PP2A foszfatáz aktivitásokra, de már a kisebb koncentrációban (0,05 μM) is gátolta őket (11/d-e. ábra). A Col0 PP1 aktivitására ugyanakkor nem fejtett ki nagyobb hatást a toxin (11/c,f. ábra).

A *c3c4* dupla mutánsok esetében a kísérleteket csak egész csíranövényen végeztük el. A nem kezelt *c3c4* mutánsokban már csökkent teljes foszfatáz aktivitást detektáltunk a Col0-hoz képest, amit a toxinnal történő kezelés számottevően tovább már nem gátoltak (11/a. ábra). Az eredmények alapján, a magasabb koncentrációjú (1 μM) MCY-LR kezelés következtében a PP2A aktivitás szignifikáns gátlását detektáltuk (11/b. ábra), míg a PP1 aktivitását inkább alacsonyabb (0,05 μM) koncentrációban gátolta (11/c. ábra).



11. ábra: A MCY-LR kezelés következtében megváltozott protein foszfataz aktivitások a vad-típusú Col0 és a *c3c4* dupla katalitikus alegység mutánsok esetében. A protein foszfataz aktivitás változásokat a Col0 esetében (a-c) egész csíranövényben, illetve (d-f) csak gyökér mintában is vizsgáltuk, (a-c) míg *c3c4* esetében egész növényben mértük a foszfataz aktivitásokat. Izotópos foszfataz mérés eredményei: (a) Az egész növény teljes protein foszfataz aktivitása (PP2A + PP1 együttesen) szignifikánsan az 1 μ M MCY-LR csökkentette a Col0-ban (zöld nyíl), míg *c3c4* esetében a toxin nem gátolta tovább a foszfataz aktivitást számottevően. (b) Csak a PP2A foszfataz aktivitás esetében egész növényben az 1 μ M MCY-LR gátló hatást fejtett ki a Col0 és a *c3c4* növényekben is (sárga nyílak); (c) míg csak a PP1 foszfataz aktivitás esetében a 0,05 μ M MCY-LR gátolta inkább az aktivitást a *c3c4* esetében egész növényben (lila nyíl). (d) A Col0 gyökerek teljes protein foszfataz aktivitása (PP2A + PP1 együttesen) csökkent mindkét koncentrációjú mikrocisztin kezelés hatására (zöld nyílak). (e) Csak a PP2A aktivitására gátló hatást fejtett ki a toxin már kisebb koncentrációban is Col0 gyökérben (sárga nyílak); (f) azonban csak a PP1 protein foszfataz aktivitását nem befolyásolta a toxinkezelés.

A Col0 kontroll (Col0/K) mintákat tekintettük 100%-nak, ehhez viszonyítva ábrázoltuk a mutáns növények kontroll mintáit. A kezelésekre bekövetkező változásokat az adott genotípus kezletlen mintáihoz viszonyítottuk.

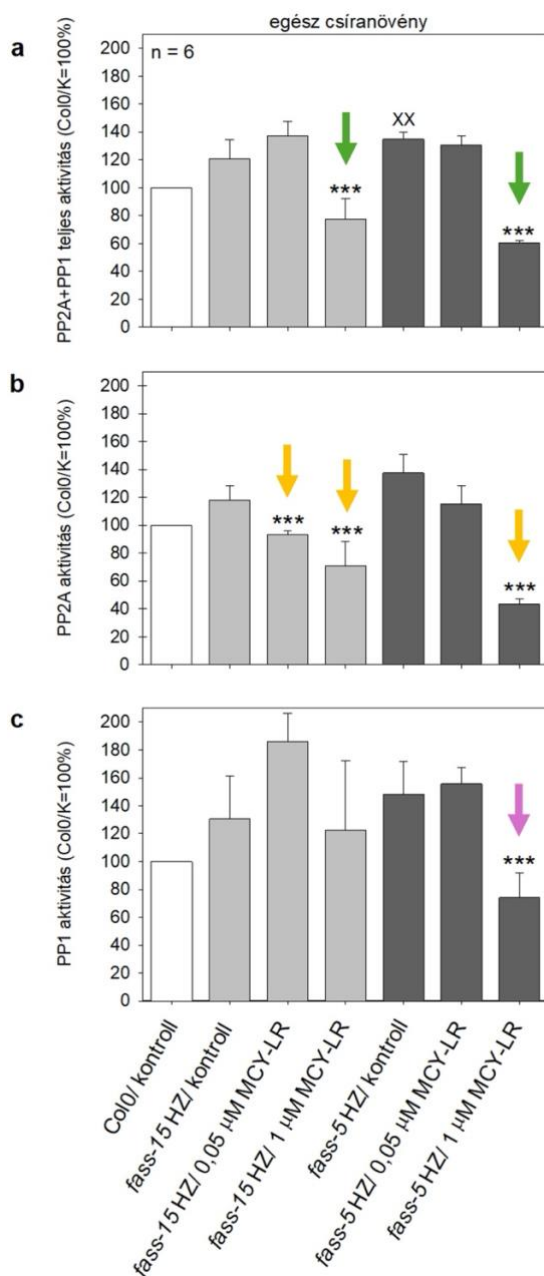
A „X” szimbólumok minden minta szignifikáns különbségét mutatja a Col0 kontrollhoz képest, míg a „*” szimbólumok az adott genotípuson belüli MCY-LR kezelések és a controlok közötti szignifikáns különbségeket mutatják.

X, * = $p < 0,05$; XX, ** = $p < 0,01$; XXX, *** = $p < 0,001$

n = kísérleti ismétlések száma

A B” regulátor alegység homozigóta mutánsok esetében a vizsgálatokat szintén egész növényeken végeztük el a gátolt gyökérnövekedési fenotípusuk miatt (lásd 7. ábra). Ezeknél a genotípusoknál magasabb teljes protein foszfatáz aktivitást detektáltunk a kezeletlen növényekben a Col0-hoz képest (12/a. ábra). Az alacsonyabb 0,05 μM koncentrációjú MCY-LR a *fass-15* HZ esetében a PP2A aktivitását szignifikánsan gátolta (12/b. ábra), míg szembetűnően serkentette a teljes és a PP1 foszfatázok aktivitását (12/a,c. ábra). A teljes protein foszfatáz mérések során valószínűleg a jelentősen megnövekedett PP1 aktivitás következtében tapasztaltunk serkentő hatást a kisebb koncentrációjú toxinkezelés hatására (12/a,c. ábra). A nagyobb koncentrációban (1 μM) a toxin kezelés szignifikánsan gátolta a PP2A + PP1 együttes aktivitását, illetve a PP2A aktivitását (12/a-b. ábra), azonban a PP1 aktivitását itt már nem indukálta (12/c. ábra). A *fass-5* HZ esetében a mikrocisztin erősebb gátló hatást fejtett ki nagyobb koncentrációjú kezelés után. Szignifikánsan gátolta a PP2A + PP1 együttes aktivitást (12/a. ábra), illetve külön-külön is gátló hatást fejtett ki a toxin nemcsak a PP2A, hanem ennél a genotípusnál a PP1 aktivitására is (12/b-c. ábra). Az alacsonyabb 0,05 μM MCY-LR nem befolyásolta számottevően a protein foszfatáz aktivitásokat a *fass-5* HZ mutánsban.

A toxinkezelés Col0 növényekben csak a PP2A aktivitását gátolta. A mutáció által enyhébb fenotipikus elváltozásokat mutató növények esetében (*c3c4*, *fass-15* HZ) szintén csak a PP2A aktivitása gátlódik, míg a mutáció által fenotipikusan leginkább érintett *fass-5* HZ esetében a PP1 aktivitása is erőteljes gátlás alá kerül.



12. ábra: A MCY-LR kezelés következtében megváltozott protein foszfatáz aktivitások a B” regulátor alegység mutánsok esetében. A protein foszfatáz aktivitás változásokat a *fass* homozigóta mutáns növények esetében egész növényben vizsgáltuk. Izotópos foszfatáz mérés eredményei: **(a)** A teljes protein foszfatáz aktivitás (PP2A + PP1 együttesen) szignifikánsan a nagyobb koncentrációjú toxinkezelés hatására csökkent mindkét *fass* HZ mutánsban (**zöld nyilak**). **(b)** Csak a PP2A foszfatáz aktivitást a *fass-15* HZ mutáns esetében már a 0,05 μ M MCY-LR is gátolta, míg a *fass-5* HZ esetében gátlás csak 1 μ M MCY-LR kezelés után következett be (**sárga nyilak**); **(c)** csak a PP1 foszfatáz aktivitást szignifikánsan kizárólag az 1 μ M MCY-LR gátolta a *fass-5* HZ növényekben (**lila nyíl**), míg *fass-15* HZ esetében 0,05 μ M MCY-LR szembeűően megemelte.

A Col0 kontroll (Col0/K) mintákat tekintettük 100%-nak, ehhez viszonyítva ábrázoltuk a mutáns növények kontroll mintáit. A kezelések hatására bekövetkező változásokat az adott genotípus kezeletlen mintáihoz viszonyítottuk.

A „X” szimbólumok minden minta szignifikáns különbségét mutatja a Col0 kontrollhoz képest, míg a „*” szimbólumok az adott genotípuson belüli MCY-LR kezelések és a kontrollok közötti szignifikáns különbségeket mutatják.

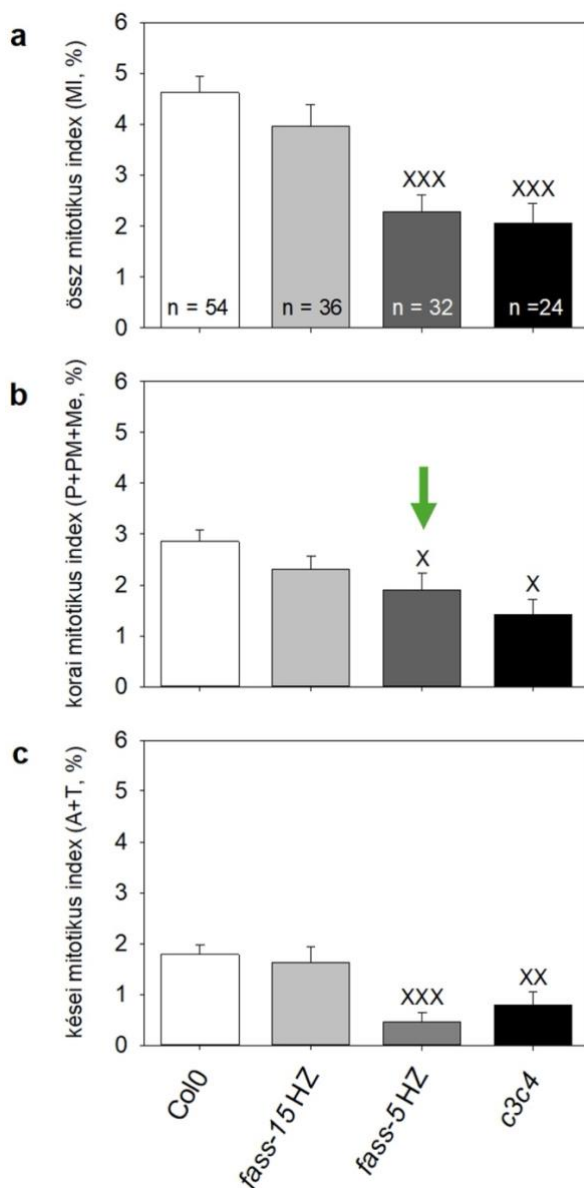
X,* = $p < 0,05$; XX,** = $p < 0,01$; XXX,*** = $p < 0,001$

n = kísérleti ismétlések száma

4.2. Mitotikus aktivitás változások a különböző genotípusok gyökerében és toxinkezelések következtében

4.2.1. A kontroll genotípusok mitotikus aktivitásának változása

A mitotikus aktivitás vizsgálatokkal szeretnénk feltárni, hogy a bizonyos PP2A enzimek funkcióinak a kiesése, hogyan befolyásolja a mitózis mértékét. Az *Arabidopsis thaliana* vad-típusú és PP2A mutáns növények gyökercsúcsában vizsgáltuk az osztódási aktivitást a mitotikus index (MI) meghatározásával, melyhez immunhisztokémiai jelölést (anti-foszfo-hisztin H3S10 és anti- β -tubulin + Alexa 488 fluorofór), fluoreszcens festést (DAPI) és konfokális mikroszkópiát alkalmaztunk, majd a felvételeket a Fiji szoftverben elemeztük, melynek „Multi-point” eszközével számoltuk a sejteket. A kezeletlen gyökérmintákat összehasonlítva megállapítottuk milyen hatással vannak az osztódásra a PP2A alegység mutációk a vad-típusú növények gyökereihez képest (13. ábra). A gyengébb fenotípusú *fass-15* HZ esetében nem detektáltunk nagy elváltozást a Col0-hoz viszonyítva, azonban az erősebb fenotípusú *fass-5* HZ mutáns mitotikus aktivitása erőteljesen lecsökkent (13/a. ábra). Ezenkívül *fass-5* HZ esetében egy mitotikus blokk detektálható a korai mitotikus fázisokban (13/b. ábra), hiszen a kései osztódási fázisokban lévő sejtek aránya jóval alacsonyabb, mint a Col0 vagy más mutáns genotípusok esetében (13/c. ábra). A C katalitikus alegység mutánsban is szignifikáns gátlás figyelhető meg a Col0-hoz hasonlítva, a *fass-5* HZ-hoz hasonló mértékben (13/a. ábra), azonban mitotikus blokk a *c3c4* mutánsban nem detektálható szignifikánsan. Összességében szignifikáns mitotikus aktivitásbeli gátlást a C katalitikus alegység kiesése, illetve a FASS regulátor alegység erőteljesebb mutációja okozott.



13. ábra: A különböző PP2A alegység mutánsok gyökér merisztéma osztódási aktivitása a kontroll vad-típusú növények gyökeréhez képest. A mitotikus aktivitások százalékos meghatározása hisztokémiai (DAPI) és immunhisztokémiai jelölések (mikrotubulus és foszfohiszton H3) után: **(a)** össz mitotikus index, ahol a *fass-5 HZ* és *c3c4* mutáns genotípusok mutatnak szignifikánsan gátolt aktivitást; **(b)** korai osztódási fázisban lévő sejtek mitotikus indexe, ahol a *fass-5 HZ* esetében osztódási blokk figyelhető meg (zöld nyíl); **(c)** kései osztódási fázisban lévő sejtek mitotikus indexe, ahol látható, hogy a *fass-5 HZ* esetében az ebben a fázisban lévő osztódó sejtek jóval alacsonyabb arányban voltak.

A „X” szimbólumok minden minta szignifikáns különbségét mutatja a Col0 kontrollhoz képest.

X = $p < 0,05$; XX = $p < 0,01$; XXX = $p < 0,001$

Rövidítések: MI – mitotikus index; P – profázis; PM – prometafázis; Me – metafázis; A – anafázis; T – telofázis

n = vizsgált gyökérminták száma

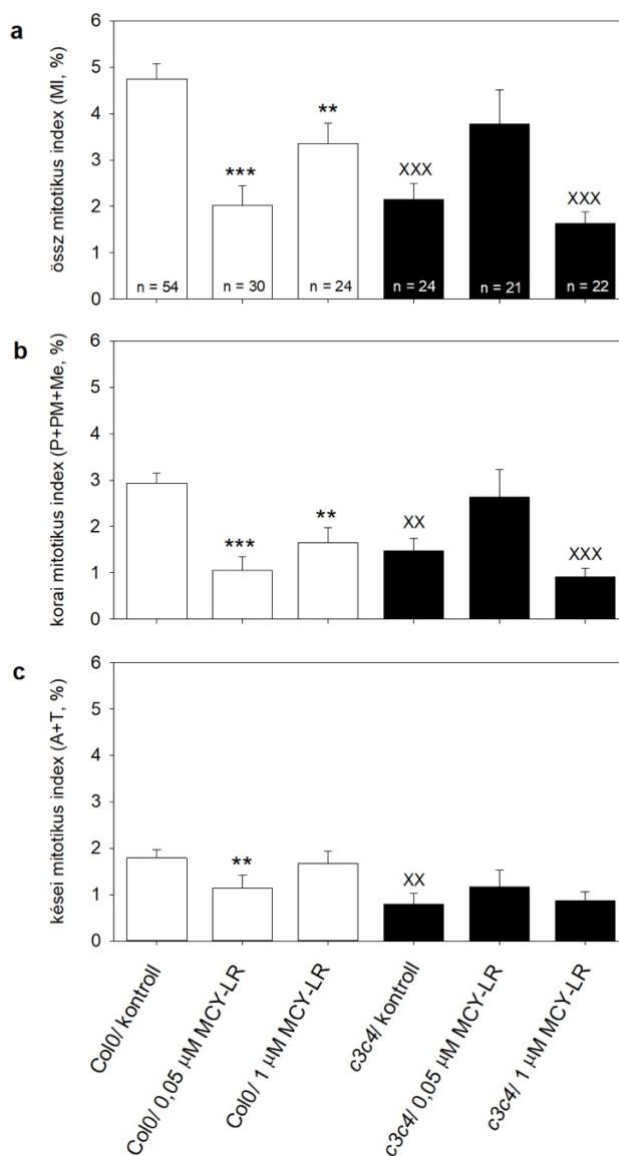
4.2.2. MCY-LR hatása a mitotikus aktivitásokra

A MCY-LR a mitotikus aktivitásokat is befolyásolhatja, így kíváncsiak voltunk, hogy a hatása hogyan érvényesül a különböző modellnövényekben. A MCY-LR hatása a mitotikus aktivitásra erősen genotípus függő volt, ezenkívül a toxin különböző koncentrációban alkalmazva más-más hatást váltott ki.

A vad-típusú Col0 esetében a MCY-LR szignifikánsan gátolta a mitózist, de érdekes módon kisebb koncentrációban erőteljesebb gátló hatást fejtett ki (14/a. ábra). *c3c4* katalitikus alegység mutáns esetében csökkent mitotikus aktivitás figyelhető meg a vad-típushoz képest, azonban a 0,05 μM MCY-LR hatására mitotikus aktivitásbeli növekedés figyelhető meg, ami a Col0-hoz viszonyítva már nem mutat szignifikáns különbséget. A magasabb koncentrációjú toxinnak kitett kezelés hatására azonban további minimális gátlás detektálható a *c3c4* kontroll mintához képest (14/a. ábra). Ezeknél a genotípusoknál nem figyelhető meg mitotikus blokk, vagyis a korai és kései osztódási fázisban lévő sejtek aránya nem változott számottevően a kontroll mintákhoz képest (14/b-c. ábra).

A B'' regulátor alegység mutánsok mitotikus aktivitása toxinkezelés következtében inkább megemelkedett, szignifikáns változást azonban csak a *fass-5* HZ esetében detektáltunk (15/a. ábra). A *fass-15* HZ esetében a MCY-LR összességében növelte a mitotikus index értékét a kezeletlen mintákhoz képest, koncentráció-függő mértékben. Érdekes, hogy ennél a genotípusnál 0,05 μM MCY-LR mellett a kései osztódási fázisokban egy mitotikus blokk detektálható (15/c. ábra), anafázisban és telofázisban az osztódó sejtek aránya magas volt. A *fass-5* HZ esetében is a mitotikus aktivitás lecsökken a Col0-hoz viszonyítva, a kisebb koncentrációjú toxinkezelés látszólag megemelte a mitotikus index értékét (15/a. ábra), de ez leginkább a korai osztódási fázisban megjelenő erősebb mitotikus blokknak köszönhető (15/b. ábra). A korai osztódási fázisban lévő sejtek arányához képest nagyon kevés, a kései osztódási fázisban lévő sejtek számoltunk (15/c. ábra).

Összességében a vad-típusú növények esetében a MCY-LR erőteljes mitotikus aktivitásbeli gátlást okozott, míg a mutánsok esetében a kisebb koncentrációjú toxinkezelés mintha helyreállította volna a mutánsok csökkent mitotikus aktivitását (növekedett mitotikus aktivitások).



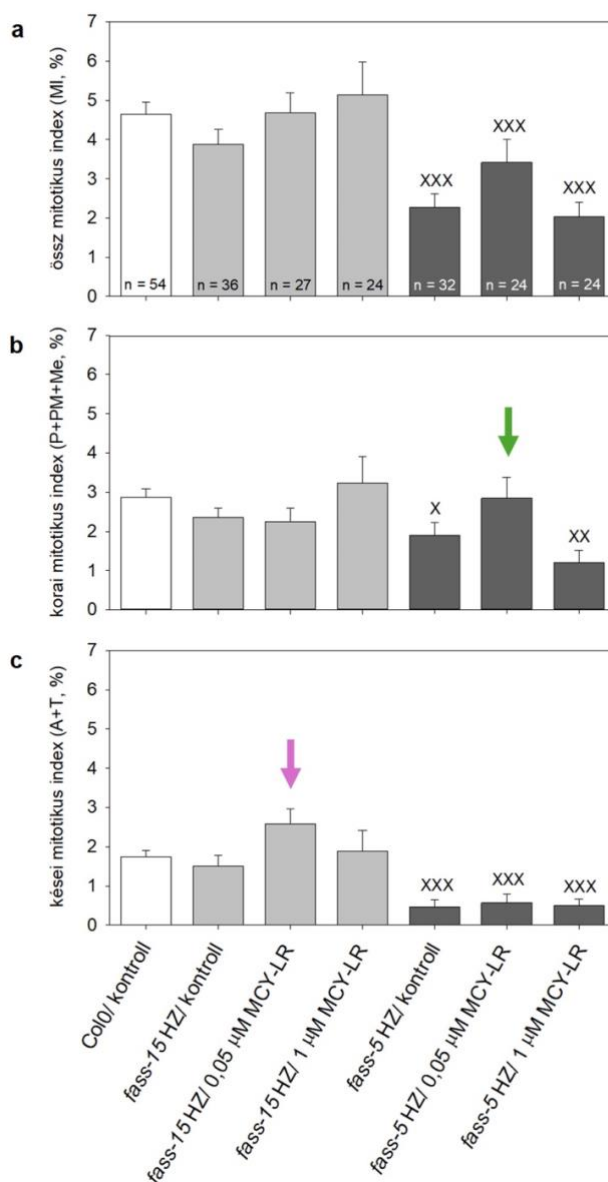
14. ábra: A MCY-LR hatása a vad-típusú Col0 és a *c3c4* dupla katalitikus alegység mutánsok mitotikus aktivitására gyökércsúcs merisztéma sejtekben. A mitotikus aktivitások százalékos meghatározása hisztokémiai (DAPI) és immunhisztokémiai jelölések (mikrotubulus és foszfohiszton H3) után: **(a)** össz mitotikus index, ahol a MCY-LR Col0 esetében gátolta a mitózist, még *c3c4* esetében a kisebb koncentrációjú toxinkezelés hatására szembetűnően megemelkedett a mitotikus aktivitás a kezeletlen mintához képest; **(b)** korai osztódási fázisban lévő sejtek mitotikus indexe; **(c)** kései osztódási fázisban lévő sejtek mitotikus indexe.

A „X” szimbólumok minden minta szignifikáns különbségét mutatja a Col0 kontrollhoz képest, míg a „*” szimbólumok az adott genotípuson belüli MCY-LR kezelések szignifikáns különbségeit mutatják a kontroll mintához viszonyítva.

X, * = $p < 0,05$; XX, ** = $p < 0,01$; XXX, *** = $p < 0,001$

Rövidítések: MI – mitotikus index; P – profázis; PM – prometafázis; Me – metafázis; A – anafázis; T – telofázis

n = vizsgált gyökérminták száma



15. ábra: A MCY-LR hatása a vad-típusú Col0 és a B² regulátor alegység mutánsok mitotikus aktivitására gyökércsúcs merisztéma sejtekben. A mitotikus aktivitások százalékos meghatározása hisztokémiai (DAPI) és immunhisztokémiai jelölések (mikrotubulus és foszfohiszton H3) után: **(a)** össz mitotikus index, ahol szignifikánsan csak a *fass-5* HZ esetében növekedett a kisebb koncentrációjú MCY-LR hatására a mitotikus aktivitás; **(b)** korai osztódási fázisban lévő sejtek mitotikus indexe, ahol a *fass-5* HZ esetében egy erős mitotikus blokk figyelhető meg (zöld nyíl); **(c)** kései osztódási fázisban lévő sejtek mitotikus indexe, ahol a *fass-15* HZ esetében figyelhető meg mitotikus blokk, 0,05 μ M MCY-LR mellett (lila nyíl).

A „X” szimbólumok minden minta szignifikáns különbségét mutatja a Col0 kontrollhoz képest.

X = $p < 0,05$; XX = $p < 0,01$; XXX = $p < 0,001$

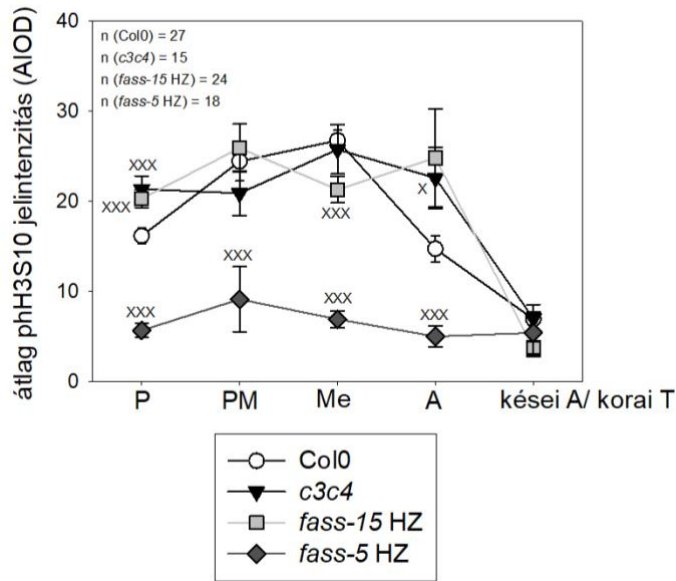
Rövidítések: MI – mitotikus index; P – profázis; PM – prometafázis; Me – metafázis; A – anafázis; T – telofázis

n = vizsgált gyökérminták száma

4.3. A különböző PP2A mutációk és toxinkezelések hatása a reverzibilis hiszton H3 foszforilációra

4.3.1. A kontroll genotípusokban mért foszfo-hiszton H3 szintek

A vizsgálat során kíváncsiak voltunk, hogy a PP2A mutációja milyen hatással van a hiszton H3 reverzibilis foszforilációjára a mitózis alatt. A foszforiláció dinamikus változásait a gyökércsúcs merisztéma sejtekben immunhisztokémiai jelölés (anti-foszfo-hiszton H3S10 + Alexa 488 fluorofór) és konfokális mikroszkópozás után 2D-ben mértük le és a fluoreszcens jelek területek átlag integrált optikai denzitása alapján (AIOD) határoztuk meg. Ahogy az várható volt pH3S10 jelet kizárólag osztódó sejtekben detektáltunk. Az elemzésből kizártuk a nyugvó centrumot, a kialakuló szállító szövet és a gyökérsüveg sejtjeit, illetve a homályos jeleket nem mértük le. A különböző lúdfű genotípusokat összehasonlítva láthatjuk, hogy a Col0 esetében az irodalomnak megfelelő foszforilációs H3S10 mintázatot tapasztaltunk (Houben *et al.*, 2007), míg ezt a PP2A mutációk erőteljesen befolyásolták (16. ábra). A kontroll Col0-ban a profázisban jelenik meg először a pH3S10 fluoreszcens jel, folyamatosan növekszik az intenzitása a metafázisig, majd a testvérkromatida szegregáció során csökkenni kezd, és a telofázis végére teljesen eltűnik. Ezzel szemben a katalitikus alegység mutánsban (*c3c4*), illetve a gyengébb fenotípusú *fass-15* HZ esetében a H3S10 foszforiláció a profázisban magasabb szintről indul és csak minimálisan emelkedik meg a szintje a korai osztódási fázisokban. Ezeknél a PP2A mutáns genotípusoknál az anafázisban magasabb foszforilációs szint tapasztalható a kontroll vad-típusú gyökerekhez képest, vagyis a defoszforiláció kisebb mértékben indul a testvérkromatida szegregáció után, ez a *c3c4* esetében szignifikáns változás. A *fass-15* HZ esetében a prometafázisban tetőzik a hiszton H3 foszforilációs szintje és a metafázisban egy szignifikáns csökkenés figyelhető meg. A legdrámaibb H3S10 foszforilációs változást a *fass-5* HZ esetében tapasztaltuk. Ebben a mutánsban gátlódott a pH3S10 foszforilációja, és a teljes mitózis alatt alacsony szinten detektáltuk. A mutáció által enyhébb fenotipikus elváltozásokat mutató növények esetében (*c3c4*, *fass-15* HZ) a mutáció kisebb mértékben befolyásolta a hiszton dinamikát mitózis során, mint a mutáció által fenotipikusan leginkább érintett *fass-5* HZ esetében.



16. ábra: A PP2A alegység mutációk hatása a hiszton H3S10 foszforilációjára gyökér mintákon. A pH3S10 foszforilációs szintjét az Alexa 488 fluorofórral jelölt fluoreszcens jelek átlag intenzitása alapján határoztuk meg. A PP2A mutáns genotípusokat összevetve a kontroll Col0 mintával szignifikáns jelintenzitás emelkedést tapasztalhatunk a *c3c4* esetében a profázisban, illetve az anafázisban. A *fass-15* HZ esetében szignifikáns változás a profázisban és a metafázisban következett be, illetve nem-szignifikáns, de szintén szembetűnő pH3S10 szint növekedés tapasztalható az anafázisban. A *fass-5* HZ esetében a teljes mitózis alatt drasztikus és szignifikáns jelintenzitás csökkenés tapasztalható.

A „X” szimbólumok minden minta szignifikáns különbségét mutatja a Col0 kontrollhoz képest.

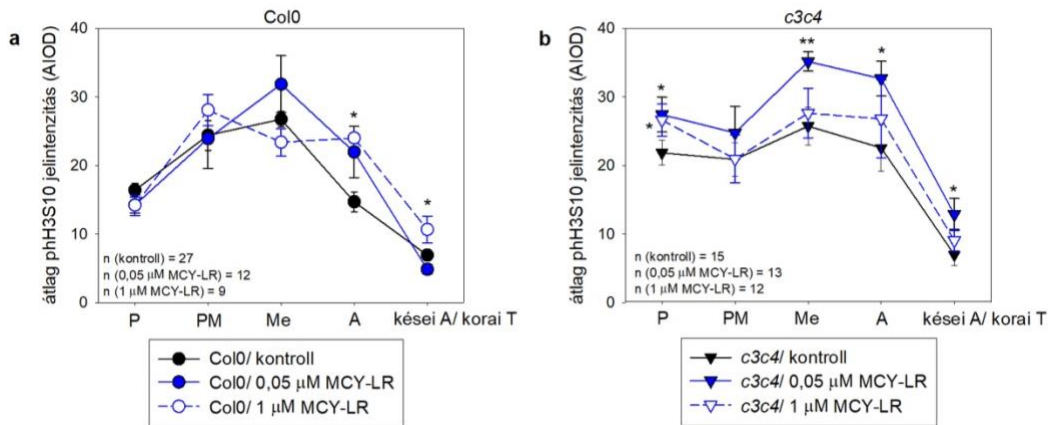
X = $p < 0,05$; XX = $p < 0,01$; XXX = $p < 0,001$

Rövidítések: AIOD – a fluoreszcens jelek terület integrált optikai denzitása 2D-ben; P – profázis; PM – prometafázis; Me – metafázis; A – anafázis; T – telofázis

4.3.2. MCY-LR hatása a reverzibilis hiszton H3 foszforilációra

Ezek után megvizsgáltuk a mikrocisztin hatását a H3S10 foszforilációra a PP2A alegység mutánsokban és a vad-típusú Col0-ban is, mert kíváncsiak voltunk, hogy MCY-LR kezelés következtében detektálhatunk-e további eltéréseket a foszfo-hiszton szintekben. A toxinkezelés hatására számos szembetűnő változást tapasztaltunk egymáshoz és a vad-típushoz képest is.

A vad-típusú *A. thaliana* növény esetében az alacsony 0,05 μM koncentrációjú MCY-LR kezelés láthatóan fokozta a H3S10 foszforilációját a metafázisban, illetve az anafázisban. A kései osztódási fázisokban, különösen az anafázisban csak a magas koncentrációjú (1 μM) MCY-LR növelte a pH3S10 foszforilációját (17/a. ábra). A C katalitikus alegységekre mutáns növényekben csak a kisebb koncentráció hatott szignifikánsan, a hiszton H3 foszforiláció mértéke megnövekedett a teljes mitózis folyamata alatt (17/b. ábra).



17. ábra: A hiszton H3 foszforiláció mértékének változása MCY-LR kezelés következtében a Col0 és *c3c4* mutáns növények gyökércsúcs merisztéma sejtekben. A pH3S10 foszforilációs szintjét az Alexa 488 fluorofórral jelölt fluoreszcens jelek átlag intenzitása alapján határoztuk meg. **(a)** A Col0 esetében szignifikáns változás a kései osztódási fázisban detektálható 1 μM MCY-LR kezelés következtében. **(b)** A *c3c4* mutáns növényekben a 0,05 μM koncentrációjú toxin váltott ki szignifikáns hatást, szinte a teljes mitózis alatt megemelte a pH3S10 szintjét.

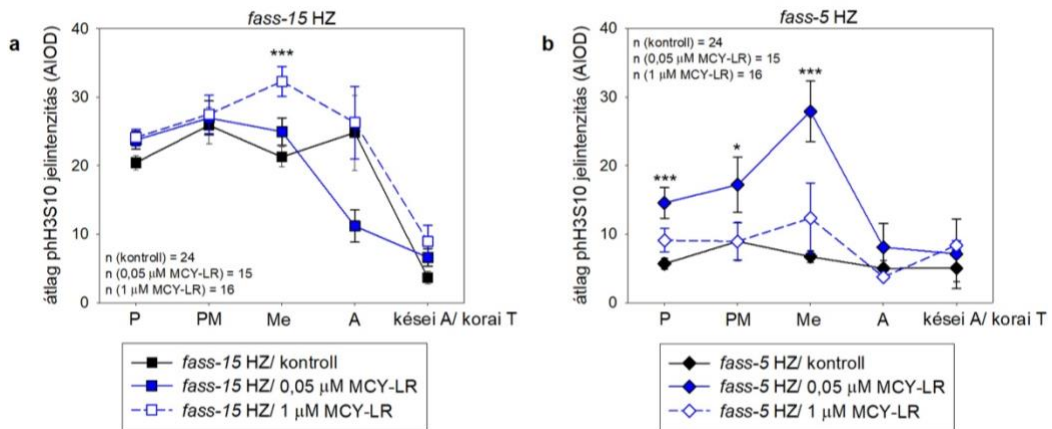
A „*„ szimbólumok az adott genotípuson belüli kezelések közötti szignifikáns különbségeket mutatják a kontroll mintához viszonyítva.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Rövidítések: AIOD – a fluoreszcens jelek terület integrált optikai denzitása 2D-ben; P – profázis; PM – prometáfázis; Me – metafázis; A – anafázis; T – telofázis

A B'' regulátor alegység mutánsokra a toxinkezelés erőteljesebb hatást fejtett ki. A *fass-15* HZ növényekben az alacsony (0,05 μM) koncentrációjú cianotoxin szembetűnően csökkentette az AIOD szintet az anafázisban, de szignifikáns változást csak a magasabb koncentrációjú (1 μM) MCY-LR kezelés következtében tapasztaltunk a metafázisban, ahol a pH3S10 jelintenzitása megnövekedett (18/a. ábra). Ezzel szemben a *fass-5* HZ esetében, ahol a kontroll növényben a pH3S10 nagyon alacsony szinten marad végig a mitózis folyamata alatt, addig a 0,05 μM MCY-LR-el kezelt növényekben a vad-típusú növényekre jellemző hiszton H3 foszforilációs mintázatot lehetett megfigyelni (metafázisig emelkedik, majd a kései mitotikus fázisokban csökken a pH3S10 szintje). Nagyobb koncentrációban ugyanakkor a toxin lényegesen nem változtatta meg a H3S10 foszforilációját (18/b. ábra).

A MCY-LR enyhébb módon befolyásolta a C katalitikus alegység mutáns, illetve a mutáció által kisebb mértékben érintett FASS regulátor alegység mutáns foszfo-hiszton szintjét, míg a FASS knock-out mutáns esetében érdekes módon a hiszton H3 foszforilációs mintázata helyreállt a toxinkezelés következtében.



18. ábra: A hiszton H3 foszforiláció mértékének változása MCY-LR kezelés következtében a *fass* HZ mutáns növények gyökércsúcs merisztéma sejtekben. A pH3S10 foszforilációs szintjét az Alexa 488 fluorofórral jelölt fluoreszcens jelek átlag intenzitása alapján határoztuk meg. **(a)** A *fass-15* HZ esetében szignifikáns változást csak a metafázisban tapasztaltunk 1 μM MCY-LR kezelés hatására, de a 0,05 μM MCY-LR szembenően csökkentette a pH3S10 szintjét az anafázisban. **(b)** A *fass-5* HZ mutáns növényekben a 0,05 μM koncentrációjú toxin váltott ki szignifikáns hatást a korai osztódási fázisokban, helyreállította a hiszton H3 foszforilációs mintázatát (metafázisig növekszik, majd a testvérokromatida szegregációval csökken a pH3S10 szintje).

A „*” szimbólumok az adott genotípuson belüli kezelések közötti szignifikáns különbségeket mutatják a kontroll mintához viszonyítva.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Rövidítések: AIOD – a fluoreszcens jelek terület integrált optikai denzitása 2D-ben; P – profázis; PM – prometáfázis; Me – metafázis; A – anafázis; T – telofázis

4.4. A hiszton H3 foszforilációs jelek kvantifikálása félautomata 3D módszerrel

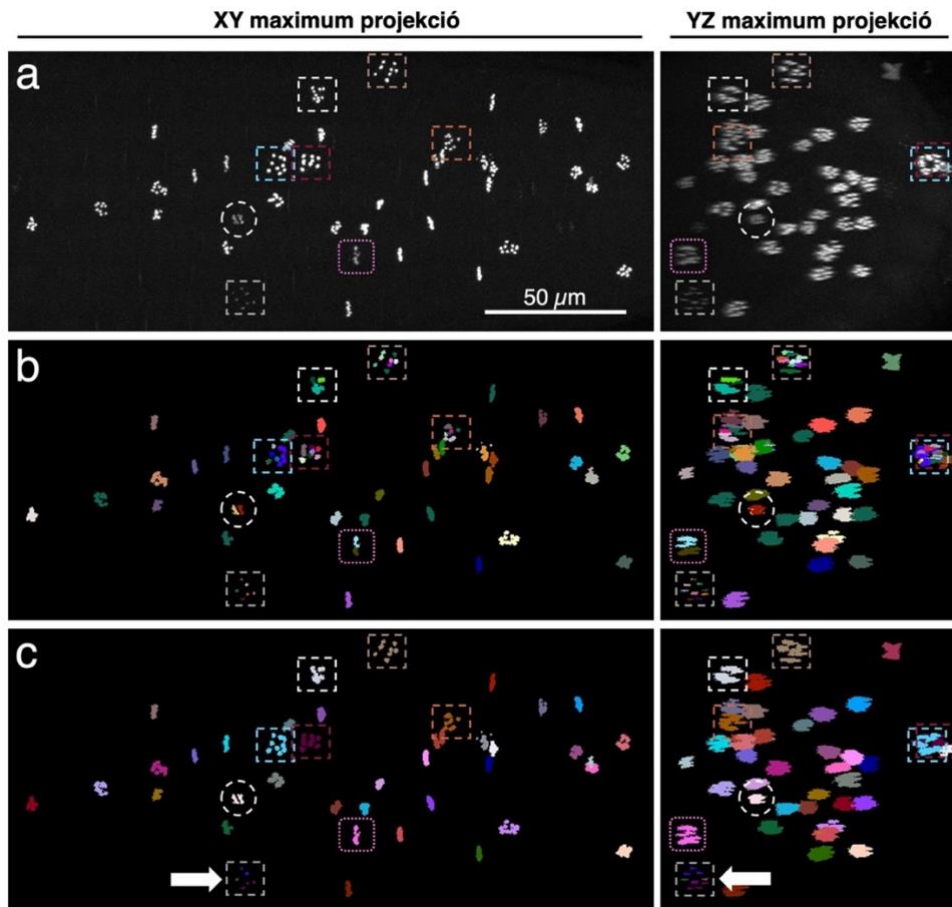
Az analízis folyamata három különböző makró működését veszi igénybe, az első automatikusan szegmentálja az osztódó sejteket és korrigálja a jelerősség csökkenését a Z-mélység következtében a metafázisos sejtek alapján („HisCorrect”), a második a szegmentált pH3S10 objektumok fluoreszcens jel intenzitását méri le a korrigált felvételeken („HisMeasure”), a harmadik pedig az osztódó sejtek különböző fázisban lévő állapotának a meghatározására szolgál („HisAnnot”).

4.4.1. Az osztódó sejtek automata szegmentálása és felismerése

A pH3S10 jelölés előnye, hogy nagyfokú specificitást mutat az antitest és alacsony háttérintenzitás mellett jelennek meg a fluoreszcens jelek az osztódó sejtekben (fekete képen pár fluoreszcens jel). Ezt kihasználva egy olyan ImageJ

alapú elemzési folyamatot dolgoztunk ki, amely automatikusan felismeri és csoportosítja (szegmentálja) a vizsgált struktúrákat releváns jellemzők alapján (esetünkben az osztódó sejtek) és méri a fluoreszcens intenzitásokat. A program automatikusan detektálja az osztódásban lévő sejteket a pH3S10 jel alapján (pH3S10 pozitív sejtek) és ezeket objektumokként kezeli a fluoreszcens intenzitások méréséhez.

Röviden, először a mikroszkópos felvételekről egy bináris képet készít, és egy minimális szürkeérték küszöb beállításával és egy minimum pixel méret meghatározásával a BoneJ2 (Domander *et al.*, 2021) 3D részecske elemző bővítménye szegmentálja a bináris képet. A program által meghatározott színekódolt objektumok egy-egy osztódó sejt fluoreszcens jeleit mutatják (19. ábra). Kihívást jelent a profázis pöttyös jelszerveződése és az anafázis jeleloszlása a két testvérkromatidán, hisz gyakran ezeket a program külön-külön szegmentálja (19/b. ábra). Azonban a hiba kiküszöbölése is megtörtént, úgy, hogy a program képes összekötni az egymáshoz nagyon közel lévő jeleket (általában az egy sejthez tartozó profázisos vagy anafázisos jelek) és egy objektumként szegmentálni, úgy, hogy a térfogatukat átmenetileg megnöveli. Néhány esetben fordul csupán elő, hogy egy osztódó sejtől származó néhány kromoszóma nem egy objektumként detektálható (19/c. ábra). Ezt az adatelemzés alatt kézzel korrigálhatjuk az Excel eredmény táblázatban.



19. ábra: A pH3S10 pozitív sejtek automata szegmentálása és felismerése. (a) pH3S10 jeleket mutató csatorna maximális projekciója a gyökérről készült 3D felvételen. (b) A program által automatikusan detektált 3D objektumok maximum projekciója. (c) Az automatikus szegmentálást követően az egy sejthez tartozó szeparált objektumok fúziója is megtörtént.

A bal oldalon az XY síkban látható maximális projekció, míg a jobb oldalon az YZ síkban vetített maximális projekció ugyanarról a 3D felvételtől. A bekeretezett elemek azt jelölik, ahol több objektum fúziójával határozza meg a program egy-egy osztódásban lévő sejtet. Itt láthatók a korai profázisban (szaggatott téglalap), metafázisban (rózsaszín téglalap) és anafázisban (szaggatott kör) lévő sejtek. Azonban néhány esetben nem történik meg azon objektumok fúziója, amelyek egy osztódó sejthez tartoznak (szürke szaggatott téglalap, fehér nyilak a (c) ábra alján).

Konfokális mikroszkópos felvételek alapján.

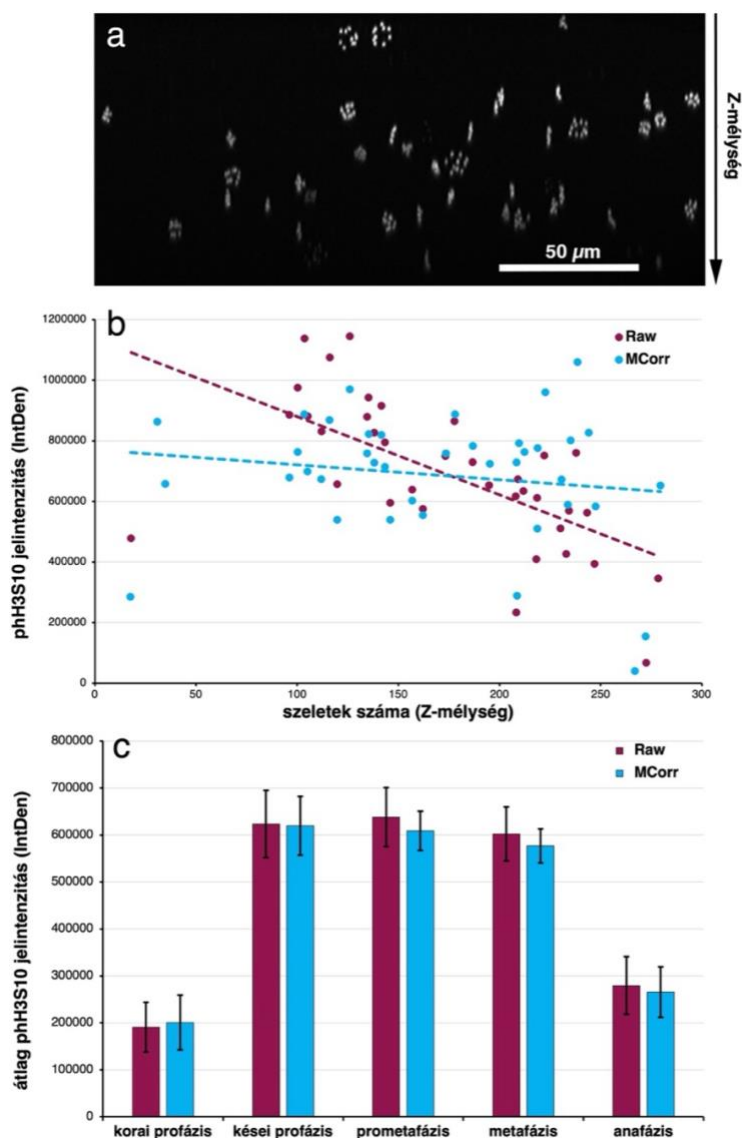
Méret skála: 50 μm

A szegmentáció után kapunk egy úgynevezett „objektum térképet”, ahol a pH3S10 pozitív sejtek egyenként színekódolva és sorszámozva jelennek meg, lehetővé téve azok egyedi azonosítását és további elemzését. Ezt az objektum térképet nemcsak a hiszton jelintenzitás méréséhez használtuk, hanem a felvételek közben detektált jelerősség csökkenés korrigálására is, hiszen lehetőség van a szegmentált objektumokat méretük és alakjuk alapján szűrni, így automatikusan kiválasztva egy-egy osztódási fázisban lévő sejteket.

4.4.2. A jelerősség csökkenés korrigálása a Z-mélységgel („HisCorrect”)

Az első elemzésekből kiderült, hogy a Z-mélységgel, vagyis a szeletelés előrehaladásával a mélyebb szövetekben és sejtekben a fluoreszcens jelintenzitás erősen csökken, ami megnehezíti a pontos 3D analízist (20/a. ábra).

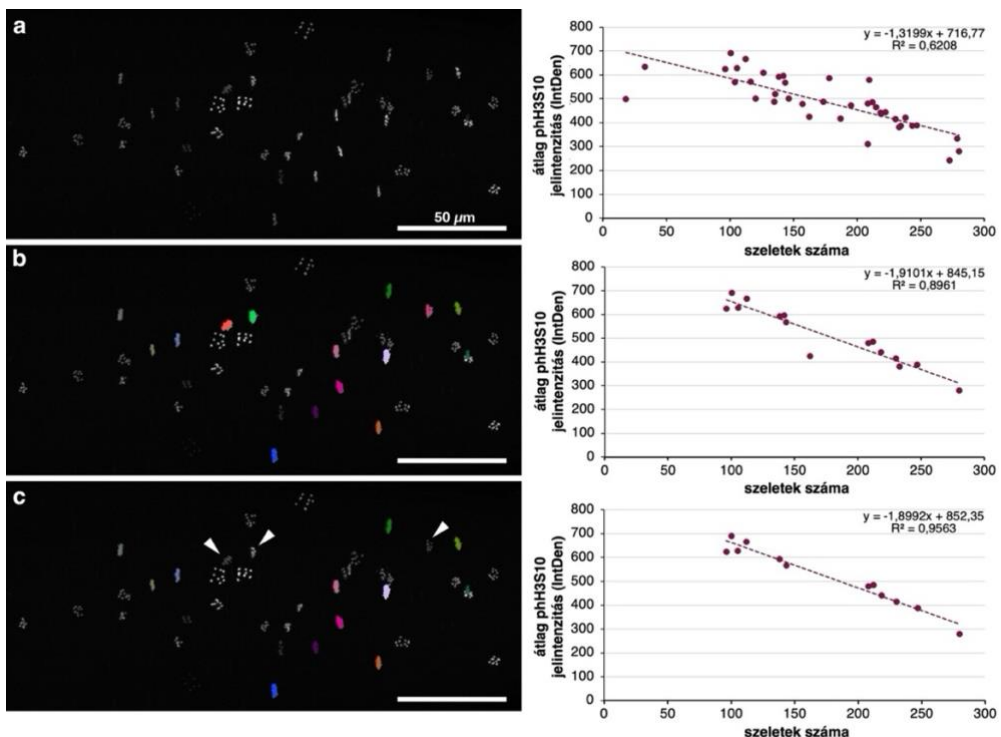
A foszforilációs jel természeténél fogva változik a mitózis egyes szakaszaiban: profázisban növekszik, anafázisban csökken. A jelerősség csökkenés korrigálását ezért egy homogén objektumkategórián keresztül végeztük el. A lúdfügyökér merisztéma sejtjeiben a metafázis nagyon rövid (3-5 perc), és a pH3S10 jel intenzitása várhatóan csak kis mértékben változik az egyes metafázisos sejtek között. Ezért a metafázisos objektumokat választottuk a „Z-stack” jelerősség csökkenés korrigálására (MCorr módszer). A nyers adatokhoz viszonyítva (Raw) a metafázisos sejteken alapuló korrekció (MCorr) után a jelerősség csökkenés a Z-mélységgel előre haladva jóval kisebb mértékű (20/b. ábra). Külön vizsgálva a pH3S10 jelerősséget mitotikus fázisonként korrekció előtt és után csökkenést tapasztaltunk a 95%-os konfidenciaintervallum (CI) értékében; metafázisban a csökkenés elérte majdnem a 37%-ot, a prometáfázisban pedig 33%-kal csökkent. (20/c. ábra).



20. ábra: A jelerősség csökkenés korrekciója a vizsgált *Arabidopsis Col0* esetében bemutatva. (a) A 3D felvétel maximum projekciója XZ síkban, ahol látható a fluoreszcens jelek erősségének a csökkenése a szeletelés előrehaladtával. (b) A grafikon az összes pH3S10 jel integrált denzitását mutatja a 3D képfelvételek Z-mélységében (szelet szám) egy vizsgált Col0 gyökérszucs esetében. A jelerősség korrekció hatékonyságának ábrázolása a nyers felvételhez képest, ahol a **lila**, a nyers, korrekció nélkül mért átlag integrált denzitást mutatja (**Raw**), míg a **kék** a metafázisos objektumokon alapuló korrekció (**MCorr**) után mért értékeket ábrázolja a detektált összes osztódó sejt esetében. Látható, hogy korrekció után a jelerősség csökkenés jóval alacsonyabb mértékű, kisebb a függvény meredeksége. (c) A hiszton H3 foszforiláció dinamikája a mitózis során, nyers adatokban (Raw) és az MCorr módszerrel végzett korrekció után, külön elemezve a pH3S10 fluoreszcens jeleket az egyes mitotikus fázisokban. Az ábra a vizsgált nyolc Col0 gyökér átlag pH3S10 jelintenzitását mutatja mitotikus fázisonként. A 95%-os konfidenciaintervallum (CI95) csökkent, amikor az objektumok integrált denzitását a metafázisos sejteken alapuló korrekciós módszerrel korigáltuk (MCorr).
Rövidítés: IntDen – integrált optikai denzitás; lemért fluoreszcens jelintenzitások összege 3D-ben

A metafázisos objektumok átlagos intenzitásának ábrázolása a szeletek számának függvényében azt mutatta, hogy a jelerősség csökkenés a szeletek számának lineáris függvénye. Ezért lineáris regressziót alkalmaztunk, ami megfelelő R^2 értéket biztosított. A makró program a korrekció kiszámításához a középső szeletet veszi referenciaértékként. Mivel a meredekség negatív, a felső szeletek jeleit csökkenti, míg az alsó szeletek jeleit növeli. Minden olyan gyökeret eltávolítottunk a további elemzésből, amelynek R^2 együtthatója 0,4-nél kisebb volt.

A „HisCorrect” makró program ki tudja szűrni a metafázisban lévő sejteket a méretük és specifikus alakjuk által. A makró a BoneJ2 szegmentációs eszközt és MorphoLibJ morfológiai szűrőit (méret, laposság és gömbölyűség) használja a specifikus objektumok kiválasztására. A küszöbérték, a minimális objektum térfogat és a dilatációs sugár paramétereit a felhasználó határozhatja meg, akárcsak a méret, laposság és gömbölyűség küszöbértékeit. A morfológiai szűrők azonban nem mindig 100%-osan pontosak, így előfordulhat, hogy néhány nem metafázisos objektum is átjut a szűrőkön. Ezért lehetőség van manuálisan is ellenőrizni az objektumok szűrését és szükség esetén eltávolítani a nem metafázisos objektumokat a regressziós adatbázisból, ami így jobb regressziós illeszkedést eredményez (21. ábra).



21. ábra: A regressziós koefficiens értékének változása a metafázisos objektumok pontos meghatározásával. Balra ugyanazon mikroszkópos felvétel maximum projekciója látható, ahol

különböző objektumok kerültek kiemelésre és felhasználásra a korrekcióhoz. Jobbra az elemzéshez tartozó grafikonok láthatók, amelyek az objektumok átlagos integrált denzitását ábrázolják a szeletek függvényében, valamint a program által kiszámított R^2 értékeket. **(a)** pH3S10 jelek maximum projekciója és a grafikon, amely az összes objektum átlagos integrált denzitását ábrázolja a szeletek függvényében. **(b)** A „HisCorrect” makró által automatikusan szegmentált objektumok színekódoltak a maximum projekcióban. A jelerősség csökkenés korrigálása már ez esetben is észlelhető, magasabb R^2 értéket kapunk. **(c)** Még pontosabb regressziós illeszkedést eredményez, ha manuálisan eltávolítjuk a nem metafázisos objektumokat (nyílhegyek, prometafázisos sejtek). Rövidítés: IntDen – integrált optikai denzitás; lemért fluoreszcens jelintenzitások összege 3D-ben

Egyes kezelések és genotípusok azonban jelentősen befolyásolhatják az osztódó sejtek számát a gyökércsúcsban. Ilyen felvételek esetében előfordulhat, hogy nem találunk elegendő metafázisos objektumot (min. 5) a megfelelő regressziós koefficiens kiszámításához. Ebben az esetben a makró képes regressziót számítani az összes objektum alapján, előzetes szűrés nélkül, így az összes pH3S10 jelet felhasználja a korrekció kiszámításához.

A „HisCorrect” makró lényegében automatikusan kiszűri a metafázisban lévő sejteket (manuálisan korrigálhatjuk), majd ezt követően egy korrekciós együttthatót alkalmaz a regresszióval előre jelzett értékek alapján, a középső szeletet véve referenciának. A program futtatása után kapunk egy olyan 3D felvételt a gyökérről, ami a korrigált fluoreszcens intenzitás értékeket mutatja, valamint opcionálisan biztosítja a regressziós görbét, illetve egy számozott és színekódolt objektum térképet is a szegmentált jelekhez. Ezeket az elemzés további lépéseiben használjuk fel.

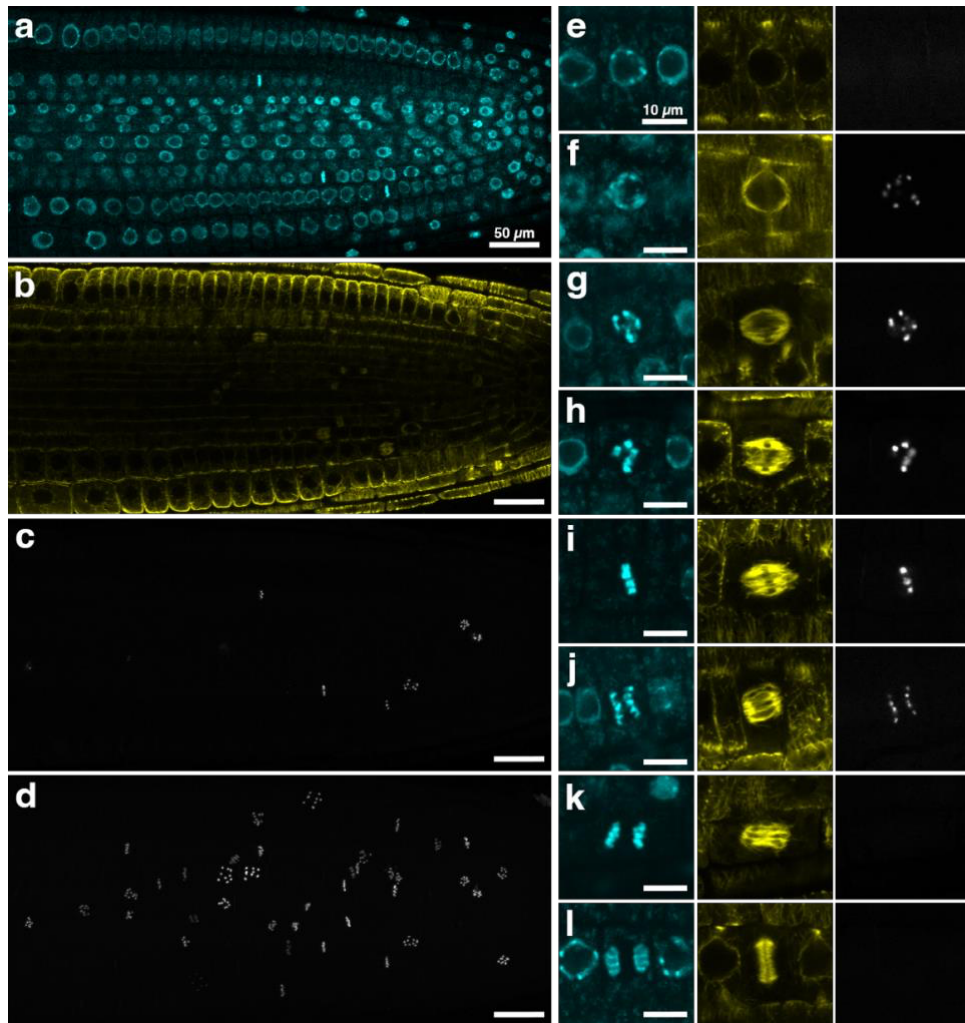
4.4.3. A foszforilált hiszton H3 fluoreszcens jel intenzitás 3D mérése („HisMeasure”)

Automata fluoreszcens jel intenzitás mérést tesz lehetővé a „HisMeasure” makró a korrigált felvételeken (illetve összehasonlítás szempontjából az eredeti mikroszkópos felvételeken), ami a szegmentált objektumok integrált optikai denzitását (IntDen) méri le 3D-ben, vagyis egy sejt fluoreszcens jelintenzitásának az értékét összeadja az összes „Z-stack”-ben, amelyben megjelenik az adott osztódó sejt (~általában 15-20 szeleten keresztül). A pontos eredmény érdekében megfelelő beállításokat kell alkalmaznunk: szürkeérték küszöb, minimális objektum térfogat és dilatációs érték, valamint méret, laposság és gömbölyűség tartományok. A lemért paraméterek (átlag, szórás, maximum, minimum, medián, integrált denzitás stb.) egy Excel táblázatban jelennek meg, az objektumok pozíciójára, méretére és alakjára vonatkozó számozással együtt. Később az adatelemzés ebben a táblázatban zajlik, ahol például manuálisan eltávolíthatjuk a hibásan szegmentált objektumokat, vagy profázis esetében a külön-külön számozott jelintenzitás értékeket manuálisan

összeadhatjuk. A felhasználó preferenciájaként a 3D objektum térkép, illetve azok maximum projekciója is elmenthető.

4.4.4. A pH3S10 jel 3D eloszlása az Arabidopsis thaliana gyökércsúcs merisztéma sejtekben és az egyes mitotikus fázisok meghatározása („HisAnnot”)

A gyökércsúcsok whole-mount immunjelölése lehetővé teszi az osztódó sejtek pontos idő- és térbeli vizualizációját, megkülönböztetve az egyes mitotikus fázisokat. A pH3S10 jel igen specifikus, a mitózis során különböző eloszlásokban jelenik meg, először a korai mitózisban tűnik fel azokban a sejtekben, amelyek érett preprofázisos köteggel (PPB) rendelkeznek, majd anafázis végén tűnik el. A kromatin (DAPI festés), a mikrotubulus és a pH3S10 jelek (immunfestés specifikus antitestek bevonásával) alapján az alábbi osztódási stádiumokat detektáltuk (22. ábra): A G2 kései szakaszában, a G2/M fázis átmenet során kezd el kialakulni növényi sejtekben a PPB, amely a sejt elköteleződését mutatja a mitózis irányába. Habár a mikrotubulusok szerveződésén keresztül már megjelenik a mitózisra jellemző morfológiai tulajdonság, a kromatin ezen a szinten még nem mutat a mitotikus sejtekre jellemző sajátosságokat, úgymint a foszfo-hiszton H3 jeleket (22/e. ábra). A pH3S10 pozitív sejtek alapján öt sejtciklus fázist tudunk azonosítani. (1) A korai profázisban a sejtek teljesen kialakult PPB-vel rendelkeznek és a foszforilált hiszton H3S10 jel pöttyös eloszlásban jelenik meg a centromereket jelölve (22/f. ábra). (2) A kései profázis szakaszába azok a sejtek tartoznak, amelyekben már elkezd kialakulni a mitotikus orsó, a mikrotubulus szálak a sejtek két pólusa felé kezdenek rendeződni (kezdetleges orsó), de a centromerek pöttyös pH3S10 jelei tapasztalhatók még ebben a fázisban is (22/g. ábra). (3) A prometáfázis azokra a sejtekre jellemző, amelyekben a bipoláris mitotikus orsó már kialakult, a kromatin kondenzáció erős, de a kromoszómák még nem teljesen rendeződtek a középsíkba (22/h. ábra). (4) A metafázisban a kromoszómák teljesen a középsíkba rendeződtek és jól megkülönböztethető a specifikus metafázisos jeleloszlás (22/i. ábra). (5) Az anafázisban a testvérkromatida szegregáció figyelhető meg, a mitotikus orsó mentén a kromoszómák az ellentétes pólusok felé mozognak (22/j. ábra). A nagyobb dinamikatarományú felvételek, illetve a mikrotubulus és foszforilált hiszton H3S10 együttes jelölése lehetővé tette, hogy pontosabban meghatározzuk az egyes fázisokban történő eseményeket. Így láthatóvá vált számunkra, hogy a pH3S10 jel már a kései anafázisban eltűnhet, vagy nagyon gyenge, de mire elkezd kialakulni a fragmoplaszt a telofázisban, a foszforilált hiszton H3 jel teljesen eltűnik (22/l. ábra).

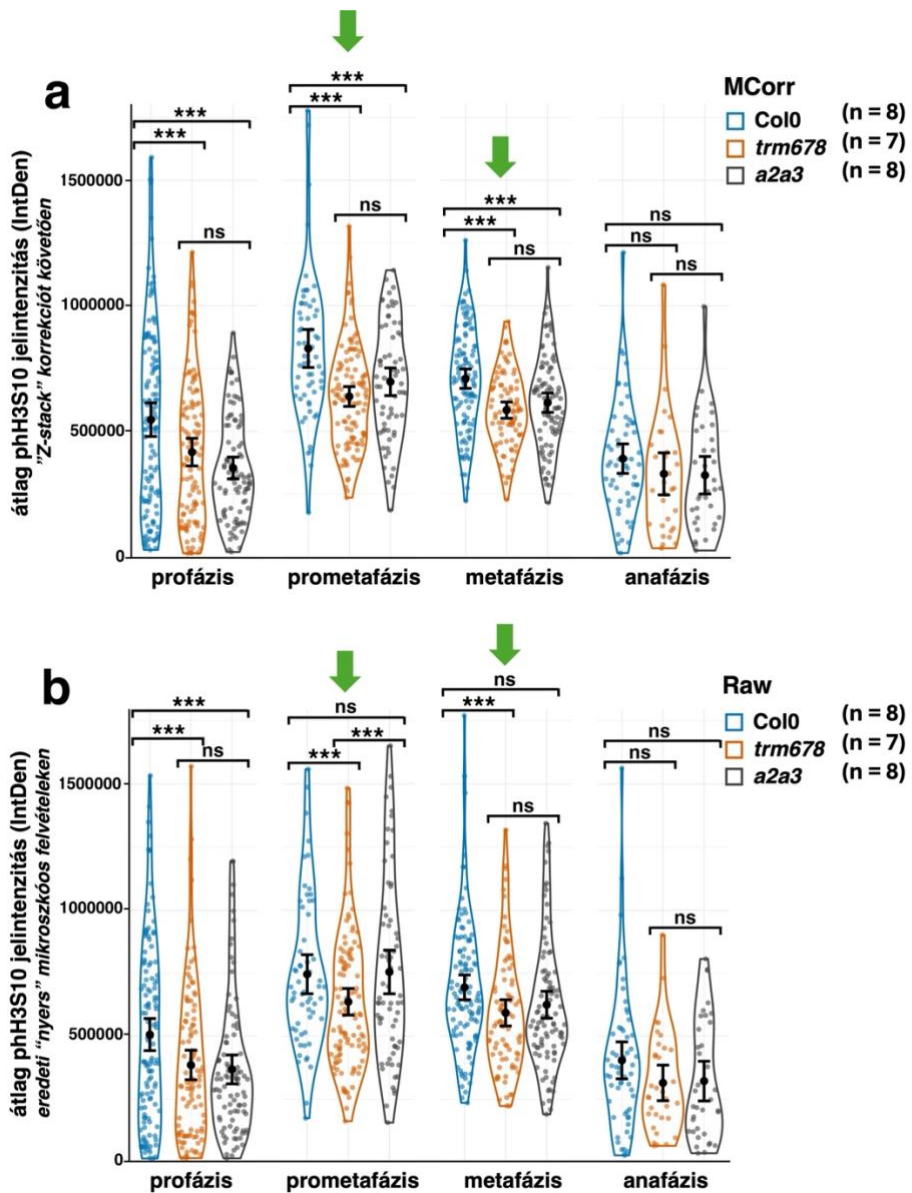


22. ábra: A különböző osztódási fázisban lévő sejtek detektálása *Arabidopsis thaliana* primer gyökércsúcsban. Hisztokémiai (DAPI) és immunhisztokémiai (mikrotubulus és foszfo-hisztin H3) jelölések után konfokális mikroszkópiával vizualizáltuk az egyes sejtalkotókat és fehérjéket. **(a-c)** A gyökércsúcs hosszanti metszetei, ahol **(a)** kromatin kimutatására (kék) egy fluoreszcens festéket, a DAPI-t használtuk, **(b)** míg a mikrotubulus organizáció (anti- α -tubulin + Alexa 555, sárga) **(c)** és a foszforilált hisztin H3 (anti-foszfo-hisztin H3S10 + Alexa 488, szürke) jel vizualizációja immunlokalizációval történt. **(d)** A pH3S10 jel maximális projekciója, ahol látható az adott gyökércsúcsban megjelenő összes osztódó sejt. **(e-l)** Az osztódó sejtek kinagyított képei, az egyes fázisok meghatározásában kulcsfontosságú szerepet játszott a mikrotubulusok szerveződése: **(e)** a pH3S10 jel még nem detektálható éretlen PPB mellett (nagy PPB és/vagy kevés perinukleáris mikrotubulus); **(f)** foszforilált hisztin jel a kései PPB szakaszban jelenik meg először, mikor a perinukleáris mikrotubulusok felhalmozódása már erőteljesebb, ezt a szakaszt korai profázisként definiáltuk; **(g)** kései profázisban kezdetleges orsó kezd kialakulni; **(h)** a prometáfázisban a mitotikus orsó már kialakult, a kromoszóma kondenzáció is erőteljes; **(i)** a metafázisban a kromoszómák a középsíkba rendeződnek; **(j-k)** az anafázis során a pH3S10 jel még detektálható a **(j)** korai szakaszban, majd a **(k)** kései anafázisban már eltűnik; **(l)** a fragmoplaszt kialakulásakor már egyáltalán nem detektálható pH3S10 jel a telofázisban és a citokinézis során. Konfokális mikroszkópiával készült reprezentatív felvételek. Méret skála: 50 μ m (a-d); 10 μ m (e-l)

A harmadik „HisAnnot” makró az egyes objektumok detektálását teszi lehetővé a különböző mitotikus fázisokban. A makró minden egyes számozott pH3S10 objektumon végighalad és egy legördülő menüből választhatjuk ki a megfelelő kategóriát miután eldöntöttük a pH3S10 és a mikrotubulus jel alapján, hogy melyik osztódási fázisba soroljuk az adott sejtet. Az elemzésből kizártuk a nyugvó centrumot és a gyökérsüveg sejtjeit, illetve azokat az objektumokat melyeknek szegmentálása hibás volt. Ezek az esetek külön kategóriaként szerepelnek a legördülő menüben, így az adattisztítás egyszerűen, néhány kattintással elvégezhető adatelemzés során. A makró automatikusan frissíti a korábban elmentett Excel táblázatot ezekkel az információkkal, lehetővé téve az adatok pontos elemzését és a megfelelő grafikus megjelenítést.

4.4.5. A makró program tesztelése PP2A és TTP komplex alegység mutáns növények foszfo-hisztin H3 szintjének vizsgálatával

PP2A protein foszfatáz A és C alegység mutánsokat, illetve TTP komplex mutánsokat vizsgálva teszteltük a kifejlesztett program működését a pH3S10 fluoreszcens jelintenzitások 3D elemzésében. Legelőször a hisztin H3 foszforilációs szintjét az enyhébb fejlődési eltéréseket mutató mutáns növényekben mértük, vagyis az *a2a3*, illetve *trm678* mutánsok mikroszkópos felvételeit elemeztük. A *trm678* mutáns osztódó sejtekben (illetve majd az *ala3* és *c3c4* esetében is) hiányzik a korai profázis meghatározására szolgáló PPB, így csak négy osztódási fázist különítettünk el az összehasonlító kísérletekben: profázis, prometafázis, metafázis és anafázis. A jelerősség korrekciós módszer előnyeinek az értékelésére ugyanazokat a mintákat elemeztük korrigált, illetve nem korrigált formában is (23. ábra). A korrigált adatokon végzett elemzés azt mutatta, hogy az pH3S10 jel mindkét mutánsban (*trm678* és *a2a3*) szignifikánsan csökkent minden osztódási fázisban, kivéve az anafázisban a Col0-hoz hasonlítva (23/a. ábra). Az adatok korrekció előtti és utáni összehasonlítása megerősítette, hogy a metafazisos objektumokon történő korrekció (MCorr) csökkentette a konfidencia intervallumokat (CI95) (20/c. ábra), aminek következtében az eddig nem szignifikáns eredmények szignifikáns elváltozást mutattak az összehasonlító elemzés alatt (23/a-b. ábra).



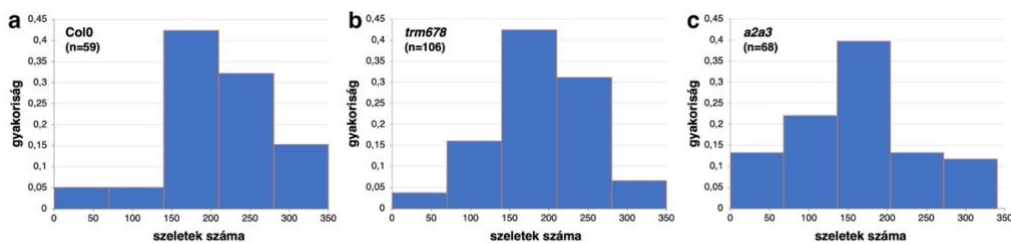
23. ábra: Az *a2a3* és a *trm678* mutánsok hiszton H3 foszforilációs intenzitásának vizsgálata.

Citológiai jelölés és konfokális fluoreszcens mikroszkopizálás után 3D-ben elemeztük a felvételeket és a kifejlesztett ImageJ makrók segítségével mértük a pH3S10 jelintenzitásokat. Összehasonlító elemzés **(a)** metafázisos objektumokon végzett jelerősség csökkenés korrigálás után (MCorr), illetve **(b)** a nyers, korrekció nélküli (Raw) mikroszkópos felvételeken. Az anafázis kivételével a pH3S10 jelintenzitása szignifikánsan csökkent mindkét mutáns genotípusban a Col0-hoz mérve a korrigált felvételek elemzésével. A korrekció nemcsak a CI95 intervallumot csökkentette jelentősen, hanem nem szignifikáns eredményeket is szignifikánssá módosított a pontosabb elemzésből adódóan (pl. Col0 és *a2a3* prometafázis és metafázis között; **zöld nyilak**).

A grafikon feletti csillagok az átlag értékek közötti szignifikanciát jelzik (***) = p -érték < 0,05; ns = nem szignifikáns).

Rövidítés: IntDen – integrált optikai denzitás; lemért fluoreszcens jelintenzitások összege 3D-ben
n = vizsgált gyökérminták száma

Ezenkívül a módszer segítségével korrigálhatjuk az objektumok véletlenszerű eloszlását, ami egyes mintákban előfordulhat. Például a nyers adatok elemzése nem mutatott szignifikáns különbséget a vad-típusú Col0 és az *a2a3* mutáns között a prometafázisban (23/b. ábra), míg korrekció után egyértelműen szignifikáns különbséget detektáltunk a két genotípus között (23/a. ábra). A prometafázisos sejtek vizsgálata azt mutatta, hogy eloszlásuk a Col0 esetében inkább a 3D felvételek alsó felében (későbbi szeletekben) jelennek meg, ellentétben az *a2a3* mutáns esetében, ahol ezek az osztódó sejtek inkább a felvétel első felében detektálhatók (legelső szeletekben) (24/a,c. ábra). Az objektumok egyenetlen eloszlása torzíthatja az eredményeket, mivel az alsóbb szeletekben a fluoreszcens jel természeténél fogva gyengébb, míg a felső szeletekben erősebb. Ezért előfordulhatott, hogy nem láttunk szignifikáns különbséget a jelerősség mérésekor. Az MCorr módszer ezt kiküszöböli azzal, hogy a középső szeletet használja viszonyítási alapként, így kiegyenlíti a jelintenzitás térbeli eloszlásából adódó eltéréseit. Ennek köszönhetően pontosabban tudjuk követni a pH3S10 szintjének változásait a mitózis különböző fázisaiban. Hasonló térbeli korrekció segített a *trm678* esetében a 95%-os konfidencia intervallum (CI95) csökkentésében. A korrekció nélküli elemzések során jelentősen nagyobb szórást figyeltünk meg, mint az MCorr módszer alkalmazása után kapott fluoreszcens intenzitásértékek esetében. A *trm678* esetében a prometafázisos sejtek főként a „Z-stack” középső-alsó régiójában helyezkedtek el (24/b. ábra). Így ez a MCorr módszer lehetővé teszi nemcsak a konfidencia intervallumok csökkentését, hanem az objektumok egyenlőtlen eloszlását is korrigálja, így pontosabban elemezhető a fluoreszcens jelintenzitás.

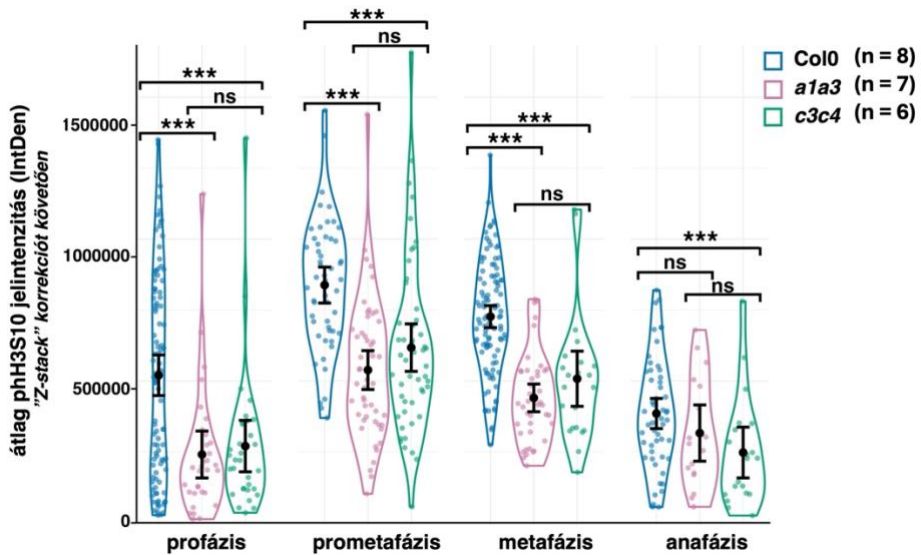


24. ábra: A prometafázisos pH3S10 jelek gyakorisága a Z-mélység függvényében. (a) A vad-típusú Col0 esetében a prometafázisos sejtek inkább a „Z-stack” alsó felében helyezkedtek el, így természetüknél fogva alacsonyabb jelintenzitással rendelkezhetnek. (b) A *trm678* esetében ezek a sejtek inkább a „Z-stack” középső-alsó részén, (c) *a2/a3* mutánsokban pedig inkább a szeletelés első fázisában detektálhatóak.

Az objektumok véletlenszerű, egyenetlen eloszlása a térben befolyásolhatja a pH3S10 jelintenzitás pontos mérését, így torzíthatja az időbeli változásokat, amelyeket a hiszton H3S10 foszforilációjának mértéke alapján követünk a mitózis során.

n = eloszlási gyakoriság szempontjából vizsgált sejtek száma

Az súlyosabb fejlődési rendellenességeket mutató mutánsok gyökérmorfológiája erősen deformált, drasztikusan érintve az osztódó sejtek számát, így a metafázisos sejtek aránya is erőteljesen lecsökkent. Ez esetben a korrekcióhoz az összes osztódó sejtet figyelembe vettük és így számítottuk ki a regressziót. A mutáns genotípusok fluoreszcens jelintenzitását a vad-típushoz hasonlítva erőteljes csökkenést tapasztalhatunk, a *c3c4* esetében ez szignifikáns változásnak bizonyult minden mitotikus osztódó fázisban (25. ábra).



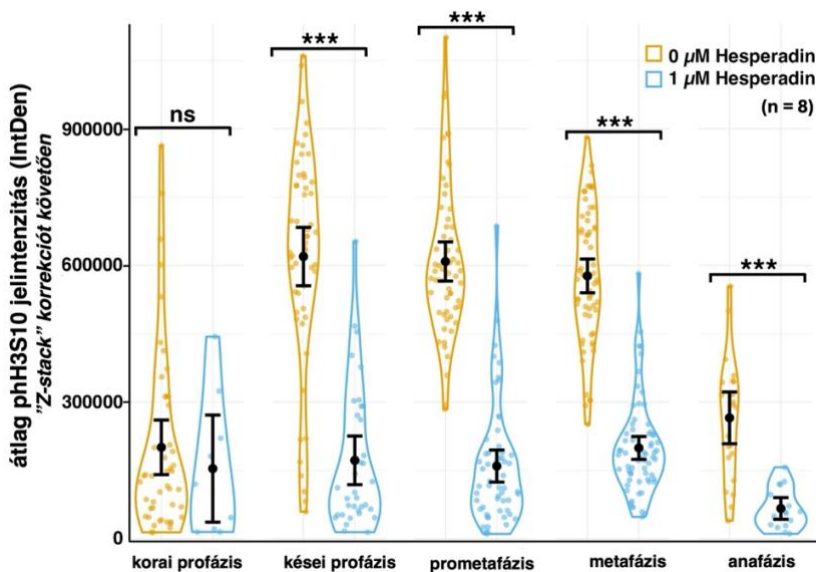
25. ábra: Az *a1a3* és *c3c4* mutánsok hiszton H3 foszforilációs intenzitásának vizsgálata. Citológiai jelölés és konfokális fluoreszcens mikroszkopizálás után 3D-ben elemeztük a felvételeket és a kifejlesztett ImageJ makrók segítségével mértük a pH3S10 jelintenzitásokat. Ezekben a fejlődési rendellenességek mértéke szempontjából erős fenotípusú dupla mutánsokban a korrekciót az összes mitotikus objektum segítségével végezte el a program, hisz az osztódó sejtek száma, így a metafázisos objektumok száma is nagyon alacsony volt a fejlődési rendellenességek miatt. A mutációk szignifikánsan csökkentették a pH3S10 szintjét több fázisban is a Col0-hoz viszonyítva. A grafikon feletti csillagok az átlag értékek közötti szignifikanciát jelzik (***) = p -érték < 0,05; ns = nem szignifikáns).

Rövidítés: IntDen – integrált optikai denzitás; lemért fluoreszcens jelintenzitások összege 3D-ben
n = vizsgált gyökérminták száma

4.4.6. A makró program hatékonyságának tesztelése Col0 hesperadin kezelések következtében

A program hatékonyságának tesztelése érdekében, hogy képes-e pontosan mérni és kimutatni a különbségeket két befolyásoló tényező vagy körülmény között, a vad-típusú *Arabidopsis thaliana* növényeket egy ismert Aurora kináz inhibitorral, hesperadinnal kezeltük, amiről köztudott, hogy befolyásolja a hiszton

H3 foszforilációját (Demidov *et al.*, 2005; Kawabe *et al.*, 2005; Kurihara *et al.*, 2006). A pH3S10 méréseket $1\mu\text{M}$ hesperadinnal kezelt növények esetében végeztük (26. ábra). A vad-típusú kontroll növényeket tekintve is érdekes eredményeket detektálhatunk, ahol külön tudtuk kategorizálni a korai és a kései profázist a mikrotubulus és a pH3S10 együttes jelölésnek köszönhetően. Azt láthattuk, hogy a foszforilációs szint maximumát már a kései profázisban eléri és magas szinten marad egészen a metafázisig. Hesperadinnal történő kezelés következtében szignifikáns gátlás tapasztalható szinte a teljes mitózis alatt, kivéve a korai profázisban. A kezelés következtében a jelintenzitás már a korai profázisban eléri a maximumát és egészen megmarad a pH3S10 szintje szinte ugyanezen az intenzitás értéken a prometafázis és a metafázis szakaszában is, majd az anafázisban eltűnik pH3S10 jel. Az $1\mu\text{M}$ hesperadinnal végzett kezelés jelentősen csökkentette a pH3S10 szinteket a kései profázistól egészen az anafázisig, akár 75%-os csökkenést okozva a kezeletlen mintákhoz képest.



26. ábra: A hesperadin kezelés hatása a hiszton H3 foszforilációjára nézve *Arabidopsis thaliana* Col0 növényekben. Citológiai jelölés és konfokális fluoreszcens mikroszkópozás után 3D-ben elemeztük a felvételeket és a kifejlesztett ImageJ makrók segítségével mértük a pH3S10 jelintenzitásokat. Az Aurora kináz gátló hesperadin befolyásolja a hiszton H3 reverzibilis foszforilációját, amit pontosan mértünk a félautomata 3D képelemző módszer segítségével. Az $1\mu\text{M}$ hesperadin szignifikánsan csökkentette a pH3S10 szintjét a kései profázistól kezdve.

A grafikon feletti csillagok az átlag értékek közötti szignifikanciát jelzik (***) = p -érték $< 0,05$; ns = nem szignifikáns).

n = vizsgált gyökérminták száma

5. DISZKUSSZIÓ

5.1. A FASS és C3/C4 alegységek hozzájárulnak a protein foszfatáz 2A (PP2A) aktivitásához, valamint szabályozzák a mitotikus eseményeket

A Debreceni Egyetemen már régóta folynak kutatások protein foszfatázokkal (PP1, PP2A), vizsgálva azok szabályozó szerepét különböző növényfajokban és mikrocisztin kezelések segítségével is (Máthé *et al.*, 2009, 2013b; Szigeti *et al.*, 2010; Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2016, 2018; Ujvárosi *et al.*, 2019). A közönséges nád (*Phragmites australis*) esetében a mikrocisztin idő- és dózisfüggő módon gátolta a protein foszfatázok aktivitását párhuzamosan a mitotikus aktivitás gátlásával, miközben rendellenes mikrotubulus szerveződést (ICMT és orsó) és gyökérmorfológiai elváltozásokat idézett elő (Máthé *et al.*, 2009). *Vicia faba* (lóbab) modellnövény esetében a foszfatáz gátlás kromatin- és mikrotubulus rendellenességekhez vezetett, beleértve számos abnormális orsóképződést, valamint rendellenes testvérkromatida szegregációt és mikronukleuszok kialakulását. Ebben a modellnövényben a mitotikus aktivitásra is hatással volt a cianotoxin, illetve hiszton H3 hiperfoszforilációt váltott ki, gátolva a megfelelő testvérkromatida szegregációt és késleltette a metafázis-anafázis átmenetet (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2016). A hiszton H3 hiperfoszforilációja hozzájárul a metafázisos kromoszómák hiperkondenzálásához és a metafázis-anafázis átmenet késleltetéséhez, azonban a kutatások azt mutatták, hogy a hiszton H3 hiperfoszforiláció önmagában nem okoz mitotikus blokkot, a metafázis-anafázis átmenet szabályozásához más faktorok is hozzájárulnak (Garda *et al.*, 2018). Mustár csíranövényekben is csökkent foszfatáz aktivitást és mitotikus zavarokat okozott a mikrocisztin: csökkent mitotikus aktivitás, abnormális mikrotubulus és kromatin szerveződés volt megfigyelhető (Máthé *et al.*, 2013b). Hasonló sejtszintű és fejlődési rendellenességeket írtak le természetes vízvirágzások során is, többek között *Ceratophyllum* fajokban, ahol a cianotoxin a hiszton H3 hiperfoszforilációját, a citoskeleton átrendeződését, a sejtciklus korai fázisainak felhalmozódását (mitotikus blokkok), csökkent fehérje és klorofill tartalmat idézett elő, amit a MCY-LR által kiváltott protein foszfatáz gátlásnak tulajdonítottak (Szigeti *et al.*, 2010; Ujvárosi *et al.*, 2019).

A korábbi eredmények megerősítették, hogy a protein foszfatáz aktivitás és az általuk végzett defoszforiláció kulcsfontosságú szerepet játszik a kromatin és a citoskeleton megfelelő szerveződésében, ezáltal a mitózis szabályozásában (Beyer *et al.*, 2012). Eddig ezekben a folyamatokban a PP2A szerepét elsősorban foszfatáz gátlók alkalmazásával vizsgálták, amelyek a teljes protein foszfatáz

(PP2A és PP1) aktivitást blokkolták, így nem tették lehetővé az egyes alegységek specifikus szerepének az elkülönítését. Ezzel szemben a specifikus PP2A alegység mutáns növények vizsgálata célzottabb és specifikusabb megközelítést kínál, lehetővé téve a PP2A egyes komponenseinek részletesebb tanulmányozását. Az általunk vizsgált mutáns növényekben egy meghatározott PP2A komplex működése sérült, amely a C3 és C4 katalitikus alegységeket, valamint a FASS regulátor alegységet érintette. A MCY-LR kezelés irreverzibilisen gátolja a teljes PP2A holoenzim készlet aktivitást, és emellett a PP1-et is érinti. Ez lehetőséget ad annak vizsgálatára, hogy más PP2A vagy PP1 izoformák képesek-e kompenzálni a mutánsokban hiányzó specifikus PP2A komplex funkcióját. Ha a MCY-LR kezelés súlyosabb elváltozásokat eredményez, az arra utalhat, hogy más PP2A komplexek vagy a PP1 részben átvehetik a sérült vagy hiányzó enzimkomplex szerepét, ami funkcionális átfedésekre vagy kompenzációs mechanizmusokra utalhat.

Ez a projekt új megvilágításba helyezi a FASS és a C3/C4 alegységek szerepét a PP2A aktivitásának a szabályozásában és feltárja, hogy milyen összefüggésben járulnak hozzá a mitotikus aktivitáshoz és a mitotikus események pontos előremeneteléhez. Emellett lehetőséget nyújt arra is, hogy részletesebben megértsük az MCY-LR szubcelluláris hatásait *Arabidopsis thaliana* modellnövényben.

A korábbi tanulmányok már bebizonyították, hogy a FASS a TTP komplex részeként a PP2A-t a kortikális mikrotubulusokhoz lokalizálja és szabályozza a dinamikus átrendeződésüket a sejtosztódás alatt (Spinner *et al.*, 2013; Bouchez *et al.*, 2014). Azonban az még nem ismert, hogyan befolyásolja ennek az alegységnek a kiesése a PP2A katalitikus aktivitását. Meglepetésünkre mind a két *fass* homozigóta mutáns esetében növekedett a teljes protein foszfatáz (PP1 + PP2A együttesen) aktivitás a Col0-hoz viszonyítva, amihez külön-külön járult hozzá a PP1 és PP2A aktivitásában tapasztalt növekedés (10. ábra). A PP2A-C katalitikus alegység elleni antitesttel végzett Western blot kísérletek azt mutatták, hogy az aktivitás emelkedéssel párhuzamosan az össz-PP2A-C szint is megnövekedett a *fass* homozigóta mutánsokban (Függelék F1/a. ábra). A gyengébb fenotípusú mutáns (*fass-15* HZ) esetében észlelt eltérések azért különösen jelentősek, mert ezek nagyobb valószínűséggel utalnak specifikus molekuláris változásokra, nem pedig a *fass-5* HZ funkcióvesztéses genotípusra jellemző súlyos fenotípusos elváltozások közvetlen következményei. Az eredményeinkből arra következtethetünk, hogy a FASS kulcsfontosságú szabályozó egysége a PP2A holoenzim aktivitásának.

A FASS nagyobb eséllyel lép kölcsönhatásba a katalitikus alegység II-es alcsalád tagjaival, a C3 vagy a C4 katalitikus alegységgel (Yoon *et al.*, 2018). A

c3c4 dupla katalitikus alegység mutáns protein foszfatáz aktivitás vizsgálata során szignifikáns gátlást tapasztaltunk mind a teljes, mind a külön-külön mért protein foszfatáz aktivitás mértékében a vad-típushoz viszonyítva (10. ábra), amit szintén alátámasztottak a Western blot kísérletek (Függelék F1/a. ábra). Yoon és munkatársai (2018) szintén csökkent PP2A katalitikus aktivitást tapasztaltak Western blot kísérleteikben *Arabidopsis thaliana* PP2AC-3,4 VIGS (a PP2A-C3 és -C4 egyidejű csendesítése, vírus-indukált géncsökkentés) növényekben, ahol szintén jelentős morfológiai elváltozásokat idézett elő a mutáció (Yoon *et al.*, 2018). RT-PCR vizsgálatok alapján a T-DNS inszercióval előállított *c3c4* dupla mutánsban a PP2A-C3 teljes hosszúságú mRNS szintje igen alacsony, míg a PP2A-C4 alegység teljes hosszúságú mRNS-e nem detektálható (Spinner *et al.*, 2013). Ez arra utal, hogy a katalitikus alegységek közül a C3 és C4 fehérjék expressziója rendkívül alacsony a mutánsban, és a jelen lévő fehérjék funkcionálisan nem aktívak. Ennek megfelelően a vizsgálatunkban kimutatott alacsony PP2A aktivitás a funkcionális PP2A-C3 és PP2A-C4 hiányának tudható be. Ami a PP1 aktivitás jelentős csökkenését illeti *c3c4* mutánsban, egyelőre nem egyértelmű, hogy ez közvetlenül a megváltozott funkciójú PP2A-C3/C4 alegység következménye, vagy inkább egy közvetett hatás, amely a mutánsra jellemző fenotípusos és élettani elváltozásokkal függ össze.

Számos olyan természetes vegyület létezik, amelyek rendkívül hatékonyan gátolják a PPP családba tartozó protein foszfatázokat. Ezek különböző ökológiai szerepet tölthetnek be, de humán mérgezéseket is okozhatnak. Ilyen például a mikrocisztin-LR mellett az okadainsav, a tautomycin, a kalikulin A vagy a kantharidin (MacKintosh & Diplexcito, 2010). Ezek a vegyületek rendkívül hasznosnak bizonyultak a foszfatázok specifikus osztályainak *in vitro* és *in vivo* különböző hatásainak elemzésében, mivel állati és növényi sejtek is könnyen felvehetik ezeket a molekulákat. A kalikulin A és az okadainsav gátolja mind a PP1 és PP2A foszfatázokat, de hatástalanok a PP2B (nagyon kis koncentrációban gátolhatja) és a PP2C foszfatázokkal szemben. Az okadainsav erősen gátolja a PP2A-t, míg a PP1-et csak 10-100-szor nagyobb koncentrációban befolyásolja. A kantharidin csak a PP2A-t gátolja, másokat nem. A kalikulin A és a mikrocisztin-LR azonos hatással gátolja a PP1-et és a PP2A-t, míg a tautomycin a PP2A-nál ötször kisebb koncentrációban gátolja a PP1-et. Ezeket a reagenset hatékony eszközként alkalmazták ezen enzimek sejtfunkcióinak meghatározására különféle emlős és növényi sejtekben (Smith & Walker, 1996; Luan, 2003).

A mikrocisztin-LR (MCY-LR) specifikusan gátolja a PP2A és PP1 aktivitását szinte minden vizsgált organizmusban *in vitro* és *in vivo* egyaránt (MacKintosh & Diplexcito, 2010; Máthé *et al.*, 2016), ami a korábban végzett

kísérletek alkalmával is megfigyelhető volt mustár, nád és lóbab modellnövényekben (Máthé *et al.*, 2009, 2013b; Garda *et al.*, 2018), illetve lúdfű esetén a hipokotilban és a kloroplasztiszban (Máthé *et al.*, 2024). Azonban a mi kísérleteink azt mutatták, hogy viszonylag rövid távú kezelés után (24 óra) a mikrocisztin kizárólag a PP2A aktivitását gátolta szignifikánsan a vad-típusú *A. thaliana* öt napos egész csíranövényekben és gyökérben egyaránt (11. ábra). A gyökerek érzékenyebbek voltak a toxinra, hiszen ez esetben már a kisebb koncentrációjú, 0,05 μM MCY-LR szignifikáns gátló hatást fejtett ki (11/d-e. ábra), míg egész növényi minta esetében csak a nagyobb koncentrációjú, 1 μM MCY-LR váltott ki szignifikáns csökkenést (11/a-b. ábra). Ebből következik, hogy a MCY-LR kiváló eszköz a PP2A funkcióinak vizsgálatára lúdfűben. Col0 esetében a MCY-LR nem okozott ROS szint növekedést és ezáltal oxidatív stresszt, amit Freytag és munkatársai (2023) detektáltak 24 órás kezelés következtében DCFH-DA festéssel, mellyel kimutatható a teljes ROS tartalom (Freytag *et al.*, 2023). Hosszabb, 48 órás kezelés hatására sem növekedett meg az intracelluláris ROS tartalom a vad-típusú növényekben a gyökércsúcs merisztéma sejtekben (Garda *et al.*, 2025). Így a MCY-LR által kifejtett hatások specifikusan a foszfatáz gátlás következményei lehetnek, nem pedig általános stresszreakciók és a további megfigyelt változások is szintén ehhez a célzott biokémiai hatáshoz köthetők.

A PP2A mutánsokban különböző hatást fejtett ki a cianotoxin, általában nagyobb koncentrációban erőteljesebb hatás érvényesült. A *c3c4* katalitikus alegység mutáns esetében a toxin tovább gátolta a PP2A aktivitását, így valószínűleg a mikrocisztin gátolta a többi katalitikus alegység működését is (11/b. ábra). A B'' regulátor alegység mutánsok esetében a MCY-LR gátló hatását tapasztaltuk a PP2A aktivitásra nézve (12/b. ábra), majdnem olyan mértékben, mint a Col0 növényekben (11/e. ábra), annak ellenére, hogy a *fass* mutáns kontroll növények protein foszfatáz aktivitása magasabb volt (10. ábra). Ez szintén azt mutatja, hogy a toxin hatékonyan befolyásolja a PP2A működését a *fass* mutánsokban is. Azonban a PP1 aktivitását csak a *fass-5* HZ esetében gátolta a mikrocisztin szignifikánsan (12/c. ábra). Ez a mutáns erőteljesebb fenotipikus elváltozásokat mutat, így ez érzékenyebb különféle stresszhatásokra szubcelluláris szinten, ahogy azt Juhász és munkatársai (2023) is detektálták (Juhász *et al.*, 2023). Ezért arra következtethetünk, hogy a MCY-LR által okozott PP1 gátlás nem áll közvetlen összefüggésben a FASS-C3/C4 interakció megváltozásával.

Számos tanulmány igazolta, hogy a protein foszfatázok – különösen a PP1 és PP2A – kulcsszerepet játszanak a sejtosztódás szabályozásában. A PP1 fontos szerepet tölt be az eukarióta sejtekben a metafázis-anafázis átmenet szabályozásában. Állati sejtekben a PP1 gátlása metafázisos blokkot idézett elő,

azonban a hiszton H3 foszforilációjában, illetve a mitotikus orsó organizációjában nem tapasztaltak eltérést (Fernandez *et al.*, 1992), míg sarjadzó élesztőben az aktivitása szükséges az orsó ellenőrző pont (SAC) inaktiválásához (Pinsky *et al.*, 2009). Állati sejtekben a PP2A-B56 szabályozza a sejtosztódás kulcsfontosságú folyamatait, beleértve a kromoszómák kondenzációját és kohézióját, a mikrotubulusok kapcsolódását a kinetokór régióhoz, az orsó ellenőrző pont inaktiválását, valamint az anafázis-promóteáló (APC/C) komplex aktiválását (Oh *et al.*, 2025). A mitózis során a fehérjék foszforilációja és defoszforilációja biztosítja a sejtosztódás eseményeinek pontos időzítését; a mitotikus belépéshez nagymértékű fehérje foszforiláció, míg a kilépéshez ezen fehérjék defoszforilációja szükséges. Ez utóbbi folyamatban fontos szerepe van a PP2A-B55-nek, amelynek mitotikus előrehaladásban betöltött funkcióját először *Xenopus* petesejt kivonatokban mutatták ki, ahol gátlása felborította a ciklin/CDK-komplexek aktivitásának időzítését a sejtosztódás elején és így a mitózis menetét (Mochida *et al.*, 2009; Lacroix *et al.*, 2022).

Növényekben még kevésbé ismert a PP1 vagy PP2A szabályozó szerepe a mitózis időzítésének szabályozásában. Azonban láthattuk, hogy számos növényfajban mikrocisztin kezelés hatására a PP2A és PP1 gátlás alá kerül, ami befolyásolja a metafázis-anafázis átmenetet és késleltette a mitózis előremenetelét (Máthé *et al.*, 2009; Beyer *et al.*, 2012; Máthé *et al.*, 2013b; Garda *et al.*, 2016, 2018). Ezenkívül dohány BY-2 sejtekben az okadainsav profázisos blokkot idézett elő, ami a PP2A aktivitás gátlásnak volt köszönhető (Zhang *et al.*, 1992).

A korábbi modellnövényekkel végzett kísérletek után (Máthé *et al.*, 2009; Beyer *et al.*, 2012; Máthé *et al.*, 2013b; Garda *et al.*, 2016, 2018) arra számítottunk, hogy a foszfatáz mutánsok és/vagy a gátló kezelések súlyos zavarokat idéznek elő a mitotikus apparátusban, gátolják, sőt akár teljesen blokkolják a mitózist. A kontroll genotípusok összehasonlítása során szignifikáns mitotikus aktivitásbeli gátlást tapasztaltunk a *fass-5* HZ és a *c3c4* foszfatáz mutáns növényekben (13. ábra). A *fass-5* HZ esetében ez együtt járt a korai osztódási fázisban tapasztalt mitotikus blokkal, vagyis a korai fázisokban lévő sejtek aránya jóval magasabb volt, mint a Col0 növényekben (13/b. ábra), azonban az enyhébb fenotipikus elváltozást mutató *fass-15* HZ esetében nem tapasztaltunk erős mitotikus gátlást. Arra következtetünk, hogy a FASS szerepet játszik a mitózis kezdetének a szabályozásában, azáltal, hogy fenntartja a protein foszfatázok aktivitásának normál szintjét, hisz a PP2A és a PP1 aktivitásának a megemelkedése a *fass* mutánsokban (10. ábra) mitotikus blokkokat idézett elő (13/b. ábra). Ezzel szemben a *c3c4* mutánsban a mitózis gátlása a foszfatáz aktivitás csökkenésével és a PP2A szintjének mérséklődésével jár (10. ábra), de nem vezet mitotikus

blokkokhoz (13. ábra). Az összes általunk vizsgált mutáns növényben hiányzik a preprofázisos köteg (PPB) (Spinner *et al.*, 2013). Mivel a *c3c4* mutánsban nem tapasztaltunk korai mitotikus blokkot, így feltételezhető, hogy a PPB hiánya nem akadályozza az átmenetet a mitózis korai és a kései fázisai között lúdfüben, illetve a *fass* mutánsokban tapasztalt mitotikus blokk sem köthető közvetlenül a PPB hiányához. A dupla katalitikus alegység mutáns esetében Spinner és munkatársai (2013) sem detektáltak mitotikus blokkokat (Spinner *et al.*, 2013). Összességében a FASS szerepet játszhat a mitózis megindulásának a szabályozásában, de ez nincs közvetlen összefüggésben a PPB kialakulásának a szabályozásával.

A protein foszfatáz gátlás (11/d-f. ábra) mellett a MCY-LR a mitózist is gátolja a vad-típusú *A. thaliana* gyökércsúcs merisztéma sejtjeiben (14. ábra). A cianotoxinnal kezelt Col0 növényekben összefüggés figyelhető meg a PP2A és a mitotikus aktivitás között. Érdekes módon a kisebb koncentrációjú (0,05 μM) mikrocisztin erőteljesebb hatást fejtett ki a mitózisra, mint az 1 μM MCY-LR (14/a. ábra), annak ellenére, hogy a PP2A foszfatáz aktivitását erőteljesebben gátolta a nagyobb koncentrációjú toxin (11/e. ábra). Eközben a Western blot eredmények azt mutatják, hogy a PP2A-C fehérje szint csökken az alacsonyabb (0,05 μM) MCY-LR kezelés hatására, míg 1 μM esetén nem történik jelentős változás, enyhén megemelkedik a PP2A-C szintje (Függelék F1/b. ábra). Ez arra utalhat, hogy a mikrocisztin-LR alacsonyabb koncentrációban megzavarja a protein foszfatáz aktivitás és expresszió közötti egyensúlyt, míg magasabb koncentrációban a gátló hatást a PP2A szint fenntartása részben ellensúlyozhatja. Korábbi vizsgálatok rizs és uborka csíranövényekkel kimutatták, hogy a protein foszfatáz aktivitásának a szabályozása – elsősorban a foszfatázokat kódoló gének fokozott expressziója révén – fontos szerepet játszik a mikrocisztinnel szembeni tolerancia kialakításában. Rizslevelekben magasabb szintű PP2A katalitikus és regulátor alegység expressziót figyeltek meg, miközben a foszfatáz aktivitás csak enyhén csökkent. Ez arra utal, hogy a PP2A alegységek fokozott expressziója szerepet játszhat az enzim aktivitásának a fenntartásában és ezáltal a növény mikrocisztinnel szembeni ellenálló képességének szabályozásában (Ma *et al.*, 2023).

A PP2A mutáns növényekben érdekes hatásokat váltott ki a MCY-LR a mitotikus aktivitásra. A *fass-5* HZ és *c3c4* esetében látszólag növekedett a mitotikus aktivitás 0,05 μM MCY-LR kezelést követően (14-15. ábra), azonban ez a *fass-5* HZ esetében leginkább a korai mitotikus fázisban megfigyelhető mitotikus blokknak köszönhető (15/b. ábra), amely a számított mitotikus index emelkedéséhez vezetett. *fass-15* HZ esetében mitotikus blokkok nem figyelhetők meg úgy, mint az erősebb fenotípusú *fass-5* HZ esetében a kontroll növényekben (13. ábra), azonban MCY-LR hatására kisebb mértékű mitotikus blokk figyelhető

meg a kései osztódási fázisban (15/c. ábra). Érdekes azonban, hogy hosszabb távú (48 órás) mikrocisztin kezelést követően már az enyhébb fenotipikus elváltozást mutató *fass-15* HZ esetében is detektálhatunk korai osztódási fázisban lévő blokkot (Garda *et al.*, 2025). Ezek az eredmények tovább erősítik azt a feltevést, hogy a FASS szabályozó alegység hiánya nem csupán a PP2A aktivitására hat, hanem ennél összetettebb folyamatokat is befolyásol. Ezenkívül a C3/C4 és a FASS alegységeknek specifikus hatásuk lehet a mitózis szabályozására a PP2A holoenzim általános szerepeitől eltérően, ami további vizsgálatokat igényel a növényi mitotikus szabályozás mélyebb megértése érdekében.

Állati sejtekben a hiszton H3 foszforilációja a szerin 10-es és 28-as aminosavnál (phH3S10/S28) a kromoszóma kondenzációval áll összefüggésben, míg növényi sejtekben ez a poszttranszlációs módosítás inkább a kromoszóma szegregációban játszik szerepet. Ezt Houben és munkatársai (2007) igazolták hesperadin (Aurora kináz gátló) kezelés következtében növényi sejtekben, hisz kezelés hatására is normál kromoszóma kondenzációt detektáltak a hiszton H3S10/S28 foszforilációja nélkül is, ugyanakkor a hesperadinnal kezelt dohány sejtekben gyakran lemaradó anafázisos kromoszómákat figyeltek meg. Ebből következtethető, hogy a hiszton H3S10/S28 foszforilációja inkább a megfelelő testvérkromatidák szegregációhoz szükséges növényi sejtekben (Houben *et al.*, 2007).

A vizsgálatainkban a Col0 esetében az irodalomban leírtaknak megfelelő phH3S10 mintázatot detektáltunk (Houben *et al.*, 2007), ahol a korai mitotikus fázisokban növekszik a foszforiláció mértéke, majd a metafázis után defoszforilálódik a fehérje. A vizsgált *Arabidopsis thaliana* mutáns genotípusok közül a *fass-5* HZ esetében tapasztaltunk erőteljes eltérést, ahol a phH3S10 szintje a teljes mitózis alatt igen alacsony a Col0 és a többi mutáns genotípushoz is viszonyítva (16. ábra). Ez összefüggésben állhat a megnövekedett PP2A és PP1 aktivitásokkal, azonban a megfigyelt mitotikus blokkokat önmagában nem indokolná az ilyen alacsony szintű phH3S10 szint. A gyengébb fenotípusú *fass-15* HZ esetében számottevő eltérést nem tapasztaltunk a phH3S10 szintjében a Col0-hoz képest, bár némi változás detektálható, hasonlóan a *c3c4* mutánsokhoz. Szignifikáns hiszton H3 foszforiláció növekedést tapasztaltunk a *c3c4* mutáns esetében a profázisban, illetve az anafázisban (16. ábra) a PP2A és a PP1 aktivitásának gátlásával párhuzamosan (10. ábra), de mitotikus blokk nem tapasztalható ennél a mutáns genotípusnál (13. ábra). Az eredményeink alapján összefüggés lehet a foszfatáz aktivitás változás és a phH3S10 szintek között, de az lúdfüben megfigyelt mitotikus blokkok és a hiszton H3 foszforilációja között nincs

összefüggés, vagy jóval összetettebb mechanizmusról van szó, mint azt korábban feltételeztük.

A hiszton módosítások szerepének részletesebb vizsgálatához gyakran alkalmaznak protein foszfatáz és kináz gátlókat a kutatók, mert ezek eltérő módon befolyásolhatják a hisztonok foszforilációs állapotát (Manzanero *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2014). A mikrocisztin hatására már tapasztaltunk korábbi kísérleteink alatt hiszton H3 hiperfoszforilációt *Vicia faba* (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018) és *Ceratophyllum submersum* (Ujvárosi *et al.*, 2019) esetében. Ezenkívül más protein foszfatáz gátló szerekekkel is vizsgálhatjuk a hiszton H3 reverzibilis foszforilációjának a szabályozását. Kantharidin kezelés következtében több kutató is erősen megnövekedett hiszton H3 foszforilációs szintet detektált a profázistól a telofázisig, ami végig kiterjed a kromoszóma karokra is (Manzanero *et al.*, 2002; Gernand *et al.*, 2003).

Mikrocisztin kezelést követően *A. thaliana* Col0 növényekben a foszforilációs mintázat nem változik, de szignifikáns pH3S10 szintbeli emelkedést tapasztalhatunk a kései osztódási fázisokban, azonban a telofázisra eltűnik a fluoreszcens jel (17/a. ábra). Ezzel párhuzamosan a MCY-LR a Col0 esetében csökkentette a mitotikus aktivitást (14. ábra) és gátolta a PP2A aktivitását a gyökér merisztéma sejtekben (11/e. ábra), azonban mitotikus blokk továbbra sem tapasztalható. A mutáns növények esetében is a mikrocisztin kezelés következtében leginkább pH3S10 szint növekedést tapasztaltunk dózis-függő módon. Ez arra utalhat, hogy ezen specifikus alegységek működésének zavara az egész PP2A holoenzim készlet aktivitására hatással lehet, mivel a MCY-LR az összes lehetséges PP2A holoenzim kombinációt gátolja.

Legmeglepőbb eredményt a *fass-5* homozigóta foszfo-hiszton H3 vizsgálata után kaptuk, ahol a mikrocisztin kezelést követően a foszforilációs mintázat helyreállt, vagyis a pH3S10 a vad-típusú növényekre jellemző módon növekedett a korai osztódási fázisokban, a csúcsot a metafázisban érte el, majd a testvérkromatida szegregációjával defoszforilálódik, csökken a fluoreszcens jelintenzitás (18/b. ábra). Ez az eredmény arra utalhat, hogy a PP2A inkább csak indirekt módon vesz részt a pH3S10 szintek szabályozásában, mert a PP2A foszfatáz mutációja a hiszton H3 foszforilációjának a csökkenéséhez vezetett (16. ábra). Ez ellentétben áll a várt eredményekkel, hiszen foszfatáz gátlás hatására korábban hiperfoszforilációt tapasztaltak növényi sejtekben (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018; Ujvárosi *et al.*, 2019). Az Aurora kináz aktivitása – ami a hiszton H3 foszforilációjáért felel a szerin 10-es aminosavnál (Demidov *et al.*, 2005; Kawabe *et al.*, 2005; Kurihara *et al.*, 2006) – foszforiláció függő módon szabályozott, ami egy konzervált treonin aminosav maradékon megy végbe a kináz

katalitikus doménjének aktivációs hurkában (Walter *et al.*, 2000). Ez a foszforilációs hely megtalálható az *Arabidopsis thaliana* Aurora kinázok doménjében is (Kawabe *et al.*, 2005). Emlős sejtekben a PP2A aktivitása elősegíti az Aurora kináz inaktivációját (Carmena *et al.*, 2009), közvetlenül a kináz defoszforilálásával (Eyers *et al.*, 2003) és közvetve a PTTG1 (agyalapi mirigy tumor transzformáló gén 1) stabilizálásával, ami egy Aurora kináz inhibitor (Tong *et al.*, 2008). A várakozások ellenére a PP2A aktivitása a *fass* mutációt követően igen erőteljesen megemelkedett (10. ábra), a Western blot kísérletekkel is megnövekedett szintű PP2A-C fehérje szintet detektáltunk (Függelék F1/a. ábra). A *fass-5* HZ kontroll növényeknél tapasztalt igen alacsony szintű pH3S10 szint (16. ábra) azért tapasztalható, mert a megnövekedett protein foszfatáz aktivitás az Aurora kinázt gátolhatja direkt defoszforilációval, így közvetve befolyásolja a hiszton H3 foszforilációs állapotát. Mikrocisztin kezelés hatására viszont csökken a PP2A aktivitás (12. ábra), illetve ezzel párhuzamosan csökkent PP2A-C fehérje szintet is megfigyeltünk (Függelék F1/b. ábra). Arra következtetünk, hogy az inhibitor gátolja azt a foszfatázt, ami az Aurora kinázt defoszforilálta. Így az Aurora kináz visszanyeri funkcionális állapotát és képes foszforilálni a hiszton H3-at a szerin 10-es aminosavnál a korai osztódási fázisokban (22/b. ábra).

Korábbi modellnövényeken a mikrocisztin jelentős kromatin és citoszkeleton rendellenességeket idézett elő (Máthé *et al.*, 2009; Beyer *et al.*, 2012; Máthé *et al.*, 2013b; Garda *et al.*, 2016), míg lúdfű esetében egyik vizsgált genotípusban sem figyeltünk meg hasonló elváltozásokat. Bár a citoszkeleton károsodása gyakran ROS szint emelkedéshez köthető, lóbabnál inkább a toxin által okozott foszfatáz gátlás a fő kiváltó tényező (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2016). Lúdfűben tapasztalhatunk MCY-LR hatására megemelkedett γ H2A.X szintet, ami az oxidatív stressz hatására bekövetkező dupla szálú DNS törések legelső jele, illetve mutánsok esetében fokozott ROS szint emelkedést, de ezzel párhuzamosan antioxidáns védekezés is aktiválódik: 24 óra után nő a szuperoxid dizmutáz (SOD) fehérje tartalom (Freitag *et al.*, 2023), 48 óra után pedig a peroxidáz (POD) aktivitás (Garda *et al.*, 2025). Mindez hatékony oxidatív stressz elleni védekező mechanizmusra utal MCY-LR kezelés következtében. Elképzelhető, hogy az *A. thaliana* sajátos molekuláris jellemzői, antioxidáns rendszerei, vagy a mikrocisztin felvételét és lebontását befolyásoló folyamatai miatt kevésbé érzékeny a toxin okozta mikrotubulus és kromatin elváltozásokra. Ezzel szemben más növényfajok esetében ezek a toxikus hatások sokkal markánsabban jelentkeznek.

A *fass* heterozigóta (HeZ) növények vizsgálata során a kontroll és mikrocisztin kezelt mintákban is megfigyelhetőek voltak sejt szintű elváltozások (pl. megemelkedett PP2A aktivitás, hiszton H3 hiperfoszforiláció MCY-LR kezelés

következtében), annak ellenére, hogy a minta Col0 és HeZ növények keveréke volt (az adatokat itt nem mutatom be). Ez arra utal, habár a heterozigóta mutánsok fenotípusa nagyon hasonló a vad-típusú növényekhez, a mutáció sejtciklus zavart okoz, tovább erősítve a PP2A mitózisban betöltött szerepét és foszforiláció-függő szabályozó funkcióját.

A kutatási projektünk második részében elemeztük a PP2A részvételét a sejtosztódás folyamata alatt oxidatív stresszkörülmények között (Kelemen *et al.*, 2024). Oxidatív stresszkörülményeket előidézve és protein foszfatáz mutáns növényeket vizsgálva, célunk volt feltárni a PP2A lehetséges kapcsolatát a ROS-függő jelátviteli útvonalakkal és a sejtciklus oxidatív stressz alatti szabályozásával. A kísérletek során elsősorban általános oxidatív stresszre adott válaszokat figyeltünk meg, és az eredmények nem szolgáltatottak egyértelmű bizonyítékot a PP2A közvetlen szerepére (lásd röviden „[Függelék](#)” fejezetben, illetve részletesen a megjelent publikációban). Összességében a PP2A funkcióvesztéses mutánsok érzékenyebbek voltak az oxidatív stresszre, ami genotípus-függő módon eltérő stresszválaszokhoz vezetett. A vad-típusú növényekben és a *fass-5* HZ mutánsokban apoptózis jeleit detektáltuk, emellett egyes mintákban korai mitotikus blokkot és erőteljes mitotikus gátlást is tapasztaltunk. Ezzel párhuzamosan a PP2A aktivitása nem változott oxidatív stresszkörülmények között (mutáció által súlyosabban érintett mutánsokban a PP1 aktivitása csökkent) és a pH3S10 szintekben sem volt szembevetendő eltérés oxidatív stressz hatására. Ez alátámasztja azt is, hogy a mikrocisztin által kiváltott elváltozások kizárólag a toxin protein foszfatáz gátló hatásából ered és nem a ROS indukáló hatása miatt alakul ki.

Vicia faba esetében a MCY-LR kezelések nemcsak a PP2A, hanem a PP1 aktivitását is gátolják (Garda *et al.*, 2018). A lóbab modellnövényvel végzett vizsgálatok arra utalnak, hogy mind a PP2A, mind a PP1 foszfatázok – valamint ezek komplex kölcsönhatásai – szerepet játszanak a hiszton H3 megfelelő foszforilációs állapotának fenntartásában, valamint a mitózisba való belépés és kilépés szabályozásában (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018). *Arabidopsis thaliana* esetében azonban a foszfatáz-mitózis-hiszton foszforilációs összefüggés összetettebb. Habár a MCY-LR kezelések gátolják a teljes PP2A holoenzim állományt és növelik a pH3S10 szintet, nem okoznak mitotikus blokkot a Col0-ban. Ha direkt kapcsolat lenne, akkor a lóbabhoz hasonlóan a PP2A aktivitás csökkenése hiszton H3 hiperfoszforilációt és korai mitotikus blokkot okozott volna. A PP2A aktivitás növekedése pedig ellentétes hatást váltott volna ki.

5.2. A hiszton H3 foszforiláció félautomata kvantifikálása 3D-ben további és még pontosabb szabályozó folyamatot tár fel a sejtsztódás alatt

A franciaországi együttműködés (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin for Plant Science (IJPB), Versailles, Franciaország) alkalmából Dr. David Bouchez és SPACE (Spatial Control of Cell Division) kutatócsoportja közreműködésével kifejlesztettünk egy új képelemzési módszert, amely lehetővé teszi a pH3S10 szint precíz mérését 3D-ben a gyökér merisztéma osztódó sejtjeiben. A módszer magába foglalja a konfokális mikroszkopizálás alkalmával tapasztalható Z-mélység jelerősség csökkenés korrekciót, mely lehetővé teszi a még kisebb eltérések értékelését különböző genotípusok és kezelések között. A módszer egyik fő előnye, hogy lehetővé teszi a dinamikusan változó és a sejtciklus fázisokra specifikus hiszton H3S10 foszforilációs jelek részletes vizsgálatát és kvantifikálását.

Konfokális mikroszkópiát alkalmaztunk a H3S10 foszforilációs jel háromdimenziós rögzítésére és elemzésére. A 3D képek rögzítésével lehetőségünk nyílt a pH3S10 jel teljes térbeli integrálására minden egyes sejtben, ami jelentősen növelte a mérés pontosságát a hagyományos 2D elemzésekhez képest, amit a korábbi kísérletek alkalmával is használtunk a Debreceni Egyetemen végzett kutatások alatt (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018; Ujvárosi *et al.*, 2019; Kelemen *et al.*, 2024). Olyan elemzési folyamatot dolgoztunk ki, amely lehetővé teszi a dinamikusan változó és a sejtciklus fázisokra specifikus hiszton H3S10 foszforilációs jelek részletes vizsgálatát és kvantifikálását mindezt teljes 3D-ben (a teljes gyökér merisztémában). A módszer a nyílt forráskódú Fiji programban (Schindelin *et al.*, 2012) futtatható, így a kutató közösség számára szabadon hozzáférhető.

A módszer kifejlesztése közben a legnagyobb kihívást a Z-mélységgel arányos jelintenzitás csökkenés jelentette. Elsőként a jelintenzitás csökkenés kompenzálására klasszikus módszereket próbáltunk alkalmazni, mint például a Fiji programba beépített „Attenuation Correction” plugint (Biot *et al.*, 2008), ami egy háttér alapú korrekciós eljárás. Azonban ez olyan feltételeket igényel, amelyek a mi esetünkben nem valósultak meg, mert a pH3S10 esetében a háttér megbízhatóan alacsony és állandó, míg a detektálni kívánt objektumok száma alacsony és intenzitása változó, így szórt eredményeket adhat ez a módszer. Próbáltuk a „Bleach Correction” plugint (Miura, 2020), ami egy arányosítási módszerre épülő korrekciós bővítmény, azonban ez egy olyan referenciát igényel, ami stabil marad. A mi esetünkben nem volt ilyen megbízható referencia marker. Ahhoz, hogy a DAPI vagy egyéb más jelölés, mint például a mikrotubulusok belső kontrollként szolgálhasson, mélység szerinti csökkenésének hasonló mintázatot kellene

mutatnia, mint a pH3S10 jelé, és intenzitásának állandónak kellene maradnia a sejtciklus során. Azonban egyik feltétel sem teljesült.

Az általunk kifejlesztett MCorr módszer – Z-mélységgel összefüggő jelerősség csökkenés korrigálására – az egyes képek analízisén alapul, amely során a legstabilabb (jelen esetben metafázisos) objektumokat választjuk ki, majd ennek segítségével számoljuk ki a jelerősség csökkenés korrekciós meredekségét. A módszer egyetlen feltétele, hogy a vizsgált biológiai struktúrák szegmentálással megbízhatóan elkülöníthetők legyenek. Az MCorr módszerrel végzett korrekciók hatékonyan csökkentették az objektumok szórását és így a 95%-os konfidencia intervallum (CI95) csökkenését, különösen a kései profázis, prometáfázis és metafázis során detektált jelek esetében (20/c. és 23. ábra). Az MCorr módszer emellett rendkívül hatékony az egyenlőtlen eloszlású objektumok (24. ábra) miatt létrejövő jelintenzitás korrigálásában is a 3D „Z-stack”-en belül, hiszen az objektumok véletlenszerű, egyenlőtlen eloszlása a biológiai mintákban befolyásolhatja a pH3S10 jelintenzitás pontos mérését, így torzíthatja a mért eredményeket. Amíg a nyers adatok nem mutattak szignifikáns különbséget például a vad-típusú és *a2/a3* mutáns növények között a prometáfázisban, addig a korrekció után szignifikáns különbségeket detektáltunk a foszforilációs szint pontosabb elemzéséből kifolyólag (23. ábra). Sikerült kiküszöbölni a Z-mélységbeli eltérésekből eredő térbeli variabilitást is, így a pH3S10 fluoreszcens jel mérése során a kapott értékek kizárólag az időbeli változásokhoz, vagyis a sejtciklus előrehaladásához köthetők. Ez lehetővé tette, hogy a sejtciklus fázisaihoz kapcsolódó valódi különbségeket mérjük, függetlenül a mélységből adódó jelintenzitás csökkenésétől. Ennek eredményeként ez a módszer lehetővé tette a biológiai kezelések vagy genotípusok közötti kisebb különbségek kimutatását is, jelentősen megnövelt statisztikai érzékenységgel. Az MCorr módszer eredetileg a metafázisos objektumok Z-mélység menti jelcsökkenés becslésére lett kifejlesztve, alkalmas viszont arra is, hogy a jelerősség korrekciót az összes objektum alapján elvégezze. Ez olyan esetekben alkalmazható, amikor például a sejtosztódás mértéke rendkívül lecsökken – ahogyan az általunk tanulmányozott erős fenotipikus elváltozásokat mutató mutánsok esetében is (25. ábra) – így nem áll rendelkezésre elegendő metafázisos sejt a korrekció kiszámítására. A mindkét összehasonlításban szereplő kontroll Col0 minták korrekció után (csak a metafázisos sejteken alapulva vs. az összes sejtet figyelembe véve) nagyon hasonló értékeket mutattak (23/a. és 25. ábra), ami arra utal, hogy bár várhatóan kevésbé pontos az összes objektumon végzett korrekció, hasznos alternatíva lehet, ha a metafázisos sejtek száma nem elegendő az MCorr módszer alkalmazásához.

A mitotikus fázisok pontos meghatározásához mikrotubulus jelölést is alkalmaztunk, amely lehetővé teszi a pH3S10 jel dinamikájának precíz követését a mitózis során. Az első pH3S10 jel a korai profázisban jelenik meg a centromerekben, ahol a preprofázisos köteg (PPB) már teljesen kialakult (22/f. ábra). A Col0 esetében a legmagasabb foszforilációs szintet már a kései profázisban eléri, fennmarad metafázisig, majd a testvérkromatida szegregációval csökkenni kezd a pH3S10 jel intenzitása (26. ábra). Mikorra a fragmoplaszt megjelenik (telofázisban), a pH3S10 jel már teljesen eltűnik (22/l. ábra). Az interfázisos sejtekben nem detektáltunk pH3S10 szintet ellentétben az állati sejtekben vagy a differenciálódott dohány mezofillum sejtekben megfigyelttel (bár nagyon alacsony szintű) (Hendzel *et al.*, 1997; McManus & Hendzel, 2006; Granot *et al.*, 2009; Sawicka & Seiser, 2012).

A mikrotubulus és foszfo-hisztón H3 együttes jelölése lehetővé tette, hogy a profázisban két külön kategóriát különítsünk el a mikrotubulusok szerveződése alapján. Ezt korábban nem tudtuk megtenni, kizárólag a foszfo-hisztón H3 és DAPI jel alapján kategorizáltuk a fázisokat, a korai osztódási fázis során nevezetesen: profázis-prometafázis-metafázis. Ezekben a kísérletekben azt láthatjuk, hogy a pH3S10 jel intenzitás maximumát csak a metafázisban éri el, nem hamarabb (16. ábra). Noha a mikrotubulus és pH3S10 együttes jelölése időben pontosabban elkülöníti a sejtosztódás előremenetelét és mélyebb betekintést nyújt a különböző pH3S10 dinamika alakulásába, a franciaországi mérések csupán egy biológiai ismétlésen alapultak. Ezek célja elsősorban az új módszer működésének a tesztelése volt, amivel az irodalomnak megfelelő foszforilációs mintázatot detektáltunk, így módszerünk alkalmas a további elemzésekre. További kísérletek segíthetnek tisztázni a Debreceni Egyetemen és az INRAE Kutatóközpontban tapasztalt eltérések hátterét és pontosíthatják az eddigi ismereteinket a reverzibilis hisztón H3 foszforiláció alakulásáról a sejtciklus során. Hasonló helyzet áll fenn a sejtosztódás későbbi szakaszaiban is, ahol Debrecenben a mikrotubulus jelölés hiányában nem tudtuk azonosítani a fragmoplasztot, így a kései anafázis és korai telofázis kategóriákat kizárólag a pH3S10 és a DAPI jelek alapján állapítottuk meg.

A kísérleteket a vad-típusú *Arabidopsis thaliana* mellett különböző genotípusú PP2A mutánsokkal is elvégeztük, amelyeket a mutáció eltérő mértékben érintett. Az *a2a3* dupla A „scaffolding” alegység mutánsok fenotipikusan nem mutatnak változást a Col0-hoz hasonlítva, azonban a pH3S10 jelintenzitás mértéke már ennél a mutánsnál is szignifikánsan csökkent (23/a. ábra). A mutáció erősebb morfológiai elváltozást okozott az *ala3* és *c3c4* mutáns növények esetében, illetve ebből adódóan a gyökér merisztéma sejtekben is kevesebb osztódó sejt detektálható. A Col0-hoz viszonyítva ezekben a mutánsokban is szignifikánsan

csökkent a hiszton H3 foszforilációs szintje (25. ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PP2A aktivitása szükséges a hiszton H3 foszforilációjának aktiválásához. A PP2A mutációja miatt bekövetkező jelentős phH3S10 csökkenés ez esetben is tovább erősíti azt a feltevést, miszerint a PP2A indirekt szabályozza a hiszton H3 defoszforilációját az Aurora kinázok által (lásd előző alfejezet – [phH3S10 eredmények tárgyalása](#)).

Fontos megjegyezni, hogy a *c3c4* mutáns növényekben a 2D elemzési módszer nem mutatott ilyen erőteljes elváltozásokat, illetve ez esetben a phH3S10 szintje inkább emelkedett a profázisban és anafázisban (16. ábra). A különbség nagy valószínűséggel onnan származik, hogy a 3D kiértékelési módszerrel végzett kísérletek csupán egy biológiai ismétlésben lettek megismételve, illetve a két labor körülmény között is előfordul eltérés. Azonban a *c3c4* gyökér a mutáció hatására sokkal vastagabb, így egy-egy gyökér felvétele során sokkal több képszelet készült. Lehetséges, hogy a természetes fluoreszcencia szint csökkenés ezekben a mutáns növényekben sokkal variábilisabb, így a korrekciós módszer alkalmazása feltárhat még kisebb eltéréseket is. Az eredmények tisztázása érdekében több biológiai ismétlés számban elvégzett kísérletek mélyebb betekintést nyújthatnak a PP2A egyes alegységeinek pontos szabályozó szerepéről a reverzibilis hiszton H3 foszforilációja során.

A PP2A – a C3/C4 és a FASS katalitikus alegység holoenzim kombinációban – a TTP (TON1-TRM-PP2A) foszfatáz komplex része, ami a kortikális mikrotubulusok szabályozásában játszik szerepet a sejtosztódás alatt (Spinner *et al.*, 2013; Bouchez *et al.*, 2014; Schaefer *et al.*, 2017). A TRM6-TRM7-TRM8 fehérjéről már ismert, hogy fontos szerepet játszanak a PPB kialakításában. Ennek ellenére a *trm678* tripla mutáns csupán csak enyhébb fenotipikus elváltozásokat mutat a vad-típusú modellnövényhez képest (Schaefer *et al.*, 2017). A kutatások alatt kíváncsiak voltunk, hogy a reverzibilis hiszton H3 foszforiláció szabályozásában részt vesz-e a TTP komplex más alegysége is. A *trm678* tripla mutáns növényeket vizsgálva is azt kaptuk, hogy a phH3S10 szintje szignifikánsan csökkent a Col0-hoz viszonyítva (23/a. ábra). A növényi morfogenezis a sejtosztódás pontos irányának és sebességének a szabályozásától függ. Több elmélet is létezik arra vonatkozóan, hogy a növényi sejtek hogyan határozzák meg az osztódási síkot, melyek közül van, amelyik összetett celluláris mechanizmuson alapul, magába foglalva a sejtmag és a citoskeleton szerepét. A legújabb kutatások szerint a PPB inkább az osztódási orsó kialakításában játszik szerepet, nem pedig közvetlenül az osztódási sík meghatározásában. Az interfázisos mikrotubulus hálózatból a PPB kialakulásához citoskeletonális átrendeződések szükségesek, amelyeket mikrotubulus-asszociált fehérjék (MAP), aktin filamentumok és ciklin-

függő kinázok (CDK) szabályoznak, bár a molekuláris kapcsolatok a sejtciklus szabályozói és a citoskeleton komponensei között még nem teljesen ismertek (Bouchez *et al.*, 2024). A TTP komplex szerepe a reverzibilis hiszton H3 foszforiláció szabályozásában váratlan, ez az első olyan alkalom mikor kimutattuk, hogy ennek a multiprotein komplexnek nemcsak a kortikális mikrotubulus szabályozásban lehet szerepe, hanem a kromoszóma kontrollban is a sejtosztódás alatt. Ezek az eredmények utalhatnak az interfázisos és a mitotikus mikrotubulus hálózat közötti összefüggésre, valamint a PPB szabályozó szerepére az osztódási orsó kialakítása során (Bouchez *et al.*, 2024).

A különböző feltételek között detektálható eltérések érdekében a vad-típusú *Arabidopsis* növényeket hesperadinnal kezeltük. Az Aurora kinázok egy szerin/treonin kináz családot alkotnak, amelyek aktivitása a sejtosztódás során éri el a csúcspontját és számos folyamatot szabályoz foszforiláció révén (Demidov *et al.*, 2005; Kawabe *et al.*, 2005). A hesperadin egy ATP-kompetitív gátlószer, amely állati és növényi sejtekben is hatékonyan blokkolja az Aurora kináz aktivitását (Hauf *et al.*, 2003; Kurihara *et al.*, 2006). Ahogy várható volt, ez az inhibitor erőteljesen befolyásolta a mitotikus aktivitást, illetve a hiszton H3 foszforilációját (Kurihara *et al.*, 2006, 2008; Demidov *et al.*, 2009). 1 μM hesperadin kezelés következtében a pH3S10 szint drasztikusan lecsökkent (75%-kal) a gyökér merisztéma sejtekben (26. ábra). Azonban a korai profázisban lévő sejtek pH3S10 szintjét nem befolyásolta a kezeletlen növényekhez képest, ami egy eddig még nem azonosított kináz jelenlétére utalhat, amely a sejtosztódás ezen korai szakaszában felelős lehet a H3S10 foszforilációjáért vagy a hesperadin még nem befolyásolta az Aurora kináz működését ebben a szakaszban. A nagyobb koncentrációjú, 5 μM hesperadin már olyan mértékben gátolta a sejtosztódást, hogy osztódó sejtet szinte nem is találtunk öt napos lúdfű csíranövényekben (Függelék F2/a. ábra), azonban az egyes mitotikus fázisok relatív gyakorisága még ilyen alacsony osztódási szint ellenére is többnyire változatlan maradt (Függelék F2/b. ábra). A dohány BY-2 és lúdfű sejt kultúrák kevésbé érzékenyek a hesperadindra, mint az *A. thaliana* gyökér merisztéma sejtek, mert 5 μM hesperadin kezelés követően ezekben a sejtenyészetekben látszólag nem befolyásolta a mitotikus aktivitást a drog és detektálható volt a hiszton H3 foszforiláció (Kurihara *et al.*, 2006; Demidov *et al.*, 2009).

Az általunk kidolgozott elemzési módszer lehetővé teszi a hiszton H3S10 foszforiláció pontos kvantifikálását és elsőként nyújt nagy felbontású betekintést a jel mitózis alatti dinamikájába növényi sejtekben. A mikrotubulusokat és pH3S10-t célzó ellenanyagok kombinált alkalmazásával a mitózis összes fázisát egyértelműen azonosítani tudtuk. Igény esetén a sejtciklus pontosabb követésére

további markerek is bevonhatók. Ez az új megközelítés lehetővé teszi finom, de megbízható különbségek kimutatását genotípusok vagy kezelések között, izgalmas lehetőségeket nyitva a hiszton foszforiláció szabályozását vizsgáló kutatásokban, különösen *Arabidopsis thaliana* modellrendszerben, ahol gazdag genetikai eszköztár áll rendelkezésre.

6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS TOVÁBBI TERVEK

A disszertációm középpontjában a foszforiláció-függő hiszton H3 dinamika vizsgálata állt a mitózis alatt. Már növények esetében is ismert, hogy a mitózis elején a hiszton H3 foszforilációjáért az Aurora kináz a felelős, azonban a testvérkromatida szegregációt követően a hiszton H3 defoszforilációjáért felelős protein foszfatázzról még kevesebb információnk van.

A PP2A a sejtciklus szabályozásában betöltött szerepe miatt az egyik legjelentősebb foszfatáznak bizonyult (Wlodarchak & Xing, 2016). Számos tanulmány foglalkozik a PP2A sejtosztódásban betöltött szerepéről állati és humán sejtekben, melyek szerint a PP2A aktivitása befolyásolja a hiszton H3 foszforilációját (Nowak *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Emellett a PP1 kulcsfontosságú szerepet játszik a G2/M, illetve metafázisból anafázisba történő átmenet szabályozásában (Fernandez *et al.*, 1992; Pinsky *et al.*, 2009; Wlodarchak & Xing, 2016). Ezenkívül állati sejtekben a mitózis végén egy PP1 komplex távolíthatja el a foszfátcsoportokat a hiszton H3-ről (Gil & Vagnarelli, 2019).

Korábbi tanulmányok szerint a növényekben csakúgy, mint más eukarióta szervezetekben a PP1 is kulcsszerepet tölt be a hiszton H3 defoszforilációjában, ugyanakkor a PP2A esetleges szerepét is felvetették ebben a folyamatban (Manzanero *et al.*, 2002; Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018). A protein foszfatáz gátló szerekkel történő kísérletek alátámaszthatják ezt, de különböző PP2A inhibitorok változó eredményeket adtak (Manzanero *et al.*, 2002; Houben *et al.*, 2007; Beyer *et al.*, 2012).

A mikrocisztin-LR (MCY-LR) egy cianobakteriális hepatotoxin, amely gátolja a PP2A és PP1 enzimek működését, valamint fokozza az intracelluláris ROS termelést, oxidatív stresszt okozva (MacKintosh & Diplexcito, 2010). Stabil vegyületként hónapokig megmaradhat a vízterekben, és öntözővízzel a táplálékláncba is bekerülhet, veszélyt jelentve az emberi egészségre. A szennyezett víz a mezőgazdasági növények növekedését is károsíthatja, mivel a toxin felhalmozódása gátolja a normál fiziológiai és biokémiai folyamatokat (Jiang *et al.*, 2024). A cianotoxinok szubcelluláris hatásainak feltárása hozzájárul a hatásmechanizmus pontosabb megértéséhez és a védekezési stratégiák kialakításához (Máthé *et al.*, 2021).

Kutatásunk célja a PP2A szerepének feltárása volt a mitózis szabályozásában, különös tekintettel a mitotikus aktivitás, a foszfatáz aktivitás és a hiszton H3 foszforiláció közötti összefüggésekre. Vizsgálatainkhoz vad-típusú *Arabidopsis thaliana* (Columbia ökotípus) mellett olyan PP2A mutánsokat használtunk, amelyekben a C3 és C4 katalitikus alegységek, illetve a FASS B”

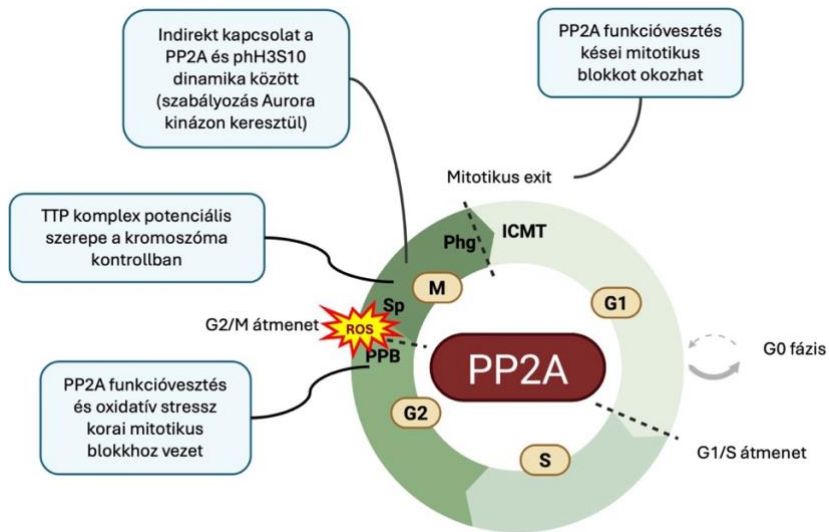
regulátor alegység működése sérült. A PP2A funkciójának mélyebb megértése érdekében MCY-LR kezelést is alkalmaztunk, mivel ez a cianotoxin specifikusan gátolja az összes PP2A holoenzim komplexet, így lehetőség nyílt a különböző foszfatázok közötti esetleges funkcionális kompenzációk vizsgálatára is. Emellett az MCY-LR alkalmazása alkalmat adott a toxin farmakológiai hatásainak feltérképezésére is lúdfű modellnövényben.

Arabidopsis thaliana esetén megállapíthattuk, hogy a foszfatáz-mitózis-hiszton foszforiláció szabályozás kapcsolata összetett folyamat és további vizsgálatok szükségesek a pontosabb összefüggések és mitotikus ellenőrző folyamatok megértéséhez. Az eredményeink alapján a hiszton H3 foszforiláció részben függ a PP2A foszfatázok aktivitásától, de a pH3S10 magasabb szintje többnyire nem jár együtt közvetlen mitotikus blokkal, függetlenül a MCY-LR kezelésektől. Ez arra utalhat, hogy lúdfűben a foszfatázok eltérő és összetettebb módon szabályozzák a mitózishoz kapcsolódó folyamatokat, mint más modellnövényben (pl. lóbab esetében (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2016, 2018)).

Eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze (27. ábra):

1. A FASS B'' regulátor alegység hozzájárul a PP2A enzim optimális aktivitásának és expressziójának fenntartásához is. A *fass-5* mutáns allél ugyanakkor nem csökkenti, hanem fokozza a PP2A aktivitását. Ezzel szemben a C3 és C4 katalitikus alegységekre mutáns *A. thaliana* növényben csökkent a PP2A aktivitása.
2. A FASS és a C3/C4 alegységek fontos szerepet töltenek be a mitózis szabályozásában, mutánsaikban csökken a mitotikus aktivitás. Ezenkívül a MCY-LR toxin kezelés hatása – mind vad-típusú, mind mutáns növényekben – alátámasztja, hogy a PP2A megfelelő működése elengedhetetlen a mitotikus folyamatok szabályozásához.
3. A PP2A holoenzim részt vesz a metafázis-anafázis átmenet közvetlen szabályozásában, azonban *A. thaliana* esetében ezt más molekuláris mechanizmus is befolyásolja. A C3 és C4 katalitikus alegységek kiesése nem okoz mitotikus blokkot, szemben a FASS regulátor alegység mutánsaival, amelyekben MCY-LR kezelés követően tovább erősödik a mitotikus blokk a korai és kései mitotikus fázisokban is. Ez a jelenség eredményeink alapján nem áll közvetlen kapcsolatban a hiszton H3 foszforilációval. Összességében a mitózisból való kilépés szabályozása összetett, és lúdfűben még számos részlet további vizsgálatot igényel.

4. A FASS hiánya megváltoztathatja a hiszton H3 foszforiláció dinamikáját, *fass-5* mutánsban a mitózis alatt végig alacsony a pH3S10 szintje, ami MCY-LR kezelés hatására a vad-típusú foszforilációs mintázatot mutatja. Feltételezzük, hogy a PP2A indirekt módon, az Aurora kináz működésén keresztül befolyásolhatja a hiszton H3 foszforilációját. Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy a FASS hiányában helytelenül lokalizálódik a PP2A enzimkomplex a kromatinhoz, így nem tudja ellátni funkcióját. A PP2A indirekt szabályozó szerepét a hiszton H3 reverzibilis foszforilációjában a PP2A-A „scaffolding” alegység mutánsok vizsgálata is alátámasztja, hiszen ezekben a mutánsokban szintén alacsony foszfo-hiszton H3 szinteket detektáltunk a mitózis szinte teljes folyamata alatt.
5. A FASS és az általa befolyásolt C3/C4 alegységek a PP1 aktivitására is hatással vannak, bár ennek pontos biokémiai háttere jelenleg még nem ismert. Tekintettel arra, hogy mind a PP2A, mind a PP1 kulcsszerepet játszanak a növényi sejtek szabályozásában, ez a kapcsolat további vizsgálatokat igényel.
6. Érdemes megemlíteni, hogy oxidatív stressz hatására a PP2A hiánya szintén befolyásolja a sejtciklus előremenetelét: csökkent mitotikus aktivitások mellett a *fass* regulátor alegység mutánsokban korai mitotikus blokkok detektálhatók, *c3c4* esetében pedig a PP1 aktivitása gátlás alá kerül. Nem zárható ki tehát, hogy a C3 és C4 alegységek direkt módon befolyásolják a PP2A és a PP1 közötti kapcsolatot, azonban ennek bizonyításához további kutatások szükségesek.
7. Már korábbi kutatások is leírták, hogy a *fass* és *c3c4* mutánsok merisztéma sejtjeiben hiányzik a preprofázisos köteg (PPB). Vizsgálataink alapján azonban ez az eltérés nem okoz mitotikus blokkot *fass-15* és *c3c4* mutánsokban a jelen tanulmányban alkalmazott növekedési időszak során. A *fass-5* mutánsban mitotikus blokk figyelhető meg, bár a fenotípus erőteljes morfológiai változásai is befolyásolhatják ezt a jelenséget.
8. A versailles-i együttműködésünk során, az új félautomata ImageJ makrók segítségével, amelyek lehetővé teszik a pH3S10 jelek pontosabb, 3D-ben történő mérését, vizsgáltuk a TRM mutánsokat. A kapott váratlan eredmények egy lehetséges kapcsolatot sejtetnek a TTP komplex aktivitása és a kromoszóma kontroll között, azáltal, hogy a TTP komplex szabályozó szerepet játszhat a hiszton H3 reverzibilis foszforilációjában. Bár a TTP komplex kulcsfontosságú szerepe már ismert a kortikális mikrotubulusok, így a PPB és az interfázisos kortikális mikrotubulusok szabályozásában (Schaefer *et al.*, 2017), az összefüggés a kromoszóma kontroll és a mikrotubulus szabályozás között további tanulmányokat igényel.



27. ábra: A PP2A szerepének összefoglalása a sejtciklus szabályozásában *Arabidopsis thaliana* modellnövény gyökércsúcs merisztéma sejtjeiben

Rövidítések: PPB – preprofázisos köteg; Sp – mitotikus osztódási orsó; Phg – fragmoplaszt; ICMT – interfázisos kortikális mikrotubulus hálózat. (*Biorender-ben szerkesztve*)

Az újonnan kifejlesztett félautomata program a hiszton foszforilációs jel 3D kvantifikálására más modellszervezetekben is könnyen alkalmazható. Különösen előnyös a Z-mélységbeli jelerősség csökkenésének korrekciója, amely lehetővé teszi a még pontosabb és megbízhatóbb adatgyűjtést. Ezáltal részletesebb és összehasonlíthatóbb képet kaphatunk a hiszton foszforiláció változásairól különböző genotípusokban és környezeti feltételek mellett. Ez az eszköz így jelentősen hozzájárulhat a sejtosztódás molekuláris folyamatai mélyebb megértéséhez.

Ez a munka számos további fontos kérdést vet fel a jövőbeni kutatások számára. Azok a pontos molekuláris események, amelyek funkcionális FASS hiányában a vártnál nagyobb foszfatáz aktivitás emelkedéséhez vezettek, még nem ismertek, és további vizsgálatokat igényelnek. Szükség van további kulcsfontosságú szubsztrátok azonosítására is, amelyek a fehérje defoszforiláció révén szabályozzák a metafázis-anafázis átmenetet *A. thaliana* esetében. Ennek a kérdésnek a megválaszolása különösen fontos, mert úgy tűnik, hogy ebben a modellnövényben a hiszton H3 foszforiláció nem, vagy csak közvetve vesz részt ebben a kritikus sejtciklus ellenőrző pont szabályozásában.

Már ismert, hogy a FASS kulcsszerepet játszik a sejtosztódás szabályozásában a kortikális mikrotubulusok szerveződésén keresztül (Spinner *et al.*, 2013; Bouchez *et al.*, 2014; Schaefer *et al.*, 2017), azonban ezen felül további funkcióiról eddig semmit sem tudunk. A *fass* mutáció csökkenti a hiszton

foszforilációját a szerin 10-es aminosavnál, ami arra utal, hogy a FASS csak közvetetten befolyásolja ezt a folyamatot. Ha közvetlen hatása lenne, akkor inkább fokozott foszforilációt látnánk, így valószínűleg a PP2A-FASS holoenzim komplex az Aurora kináz defoszforilálásán keresztül fejt ki hatását. Elképzelhető, hogy egy másik PP2A komplex, amely eltérő B regulátor alegység izoformát tartalmaz, közvetlenül defoszforilálja a hiszton H3-at. A jövőbeni kutatások során érdemes lenne az összes, a mitózis során aktív PP2A szabályozó alegység vizsgálatára fókuszálni, továbbá transzkriptomikai adatokat, különösen sejtciklus-specifikus adatokat (Menges *et al.*, 2003) elemezni, hogy pontosan meghatározhassuk, mely alegységek expresszálódnak a mitózis alatt.

A TTP komplex azon pontos szubsztrátjai, amelyek révén a kortikális mikrotubulusokat szabályozza, még nem teljesen ismertek, ezért további kutatások szükségesek a komplex működésének részletesebb megértéséhez. Különösen fontos a TTP komplex további funkcióinak feltárása, például annak vizsgálata, hogy a TRM alegységen kívül más komponensek, mint például a TON1, részt vehetnek-e a hiszton H3 reverzibilis foszforilációjának szabályozásában. A versailles-i együttműködésünk során Dr. Martine Pastuglia kutatóval megkezdtuk a foszfohiszton H3S10 szint meghatározását *ton1* mutánsokban az újonnan kifejlesztett félautomata ImageJ módszer segítségével. Az első eredmények ígéretesek, de alaposabb és további elemzések szükségesek. Emellett a Debreceni Egyetemen is folyamatban vannak a TTP komplex mutánsok foszfatáz aktivitásának vizsgálatai is, amelyek révén pontosabb képet kaphatunk a TTP komplex szerepéről.

7. ENGLISH SUMMARY

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

Reversible protein phosphorylation, controlled by kinases and phosphatases, is crucial for processes like metabolism, signalling, and cell cycle regulation (Smith & Walker, 1996). Protein phosphatase 2A (PP2A) plays a critical role in the regulation of the cell cycle. It is known to dephosphorylate over 300 substrates involved in the cell cycle, thereby regulating almost all major pathways and transitions between different phases as well as ensuring proper mitotic progression (Wlodarchak & Xing, 2016), which was in a central focus of my PhD research. Additionally, PP2As are involved in ROS signalling, which plays a role in cell cycle regulation (Considine & Foyer, 2021). PP2A is a multifunctional heterotrimeric enzyme, composed of three variable subunits, including A “scaffolding”, C catalytic and B regulatory subunits which play a crucial role in substrate specificity and in the localization of the enzyme complex to fulfil its various functions. The existence of multiple isoforms for each subunit contributes to the functional diversity of the PP2A holoenzyme (Luan, 2003).

The main focus of my PhD project was to shed light on the role of the protein phosphatases during cell division in *Arabidopsis thaliana* root meristems. We approached the topic of the PP2A’s involvement in cell cycle regulation from two different aspects. First, we investigated the role of PP2A in cell cycle regulation during the precise timing of chromosomes segregation and progression through mitosis (Kelemen *et al.*, 2025a,b). And secondly, we explored PP2A’s involvement in ROS signalling during cell division under oxidative stress conditions, where the aim was to explore the potential connection between PP2A and ROS-dependent signalling pathways, as well as the regulation of the cell cycle under oxidative stress (Kelemen *et al.*, 2024). However, I will not go into detail about this section, as the experiments primarily revealed general responses to oxidative stress, and the results did not provide clear evidence of a direct role for PP2A.

Reversible histone H3 phosphorylation plays a critical role in chromosome condensation and cohesion during mitosis. In plants, phosphorylation at serine 10 residues in particular is needed for chromosome cohesion and ensures the proper timing of sister chromatid segregation, with Aurora kinase known as a key regulator of this modification (Houben *et al.*, 2007); however, the protein phosphatase responsible for H3 dephosphorylation remains unknown in plants. Studies in plants like *Vicia faba* (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018), *Ceratophyllum submersum*

(Ujvárosi *et al.*, 2019), as well as in *Drosophila* (Nowak *et al.*, 2003), and human cells (Huang *et al.*, 2005) suggest that PP2A is involved in histone H3 dephosphorylation, as its inhibition or mutation leads to histone H3 hyperphosphorylation at serine 10 residue (Ser10) and mitotic defects. However, it remains unclear whether PP2A is directly responsible for this process and which of its subunits may be essential. To tackle this question, I used a combination of biochemical and cytological approaches.

Radioisotopic biochemical methods were applied to quantify *in vivo* protein phosphatase activity using [³²P]-MLC20 (³²P-labeled 20 kDa turkey myosin light chain) as substrate for isotopic activity assay measurements, which is known to be dephosphorylated primarily by PP2A and PP1 in cell cultures (Erdodi *et al.*, 1995). To assay PP1 and PP2A activities separately *in vivo*, Inhibitor-2 (I-2) protein was added, which is known as a natural inhibitor of PP1 in all eukaryotes, including plants. PP2A activity was measured from the extracts after the addition of I-2, while PP1 activity was determined by subtracting PP2A activity from the total protein phosphatase activity (Dedinszki *et al.*, 2015). The use of a specific phospho-histone H3 (Ser10) antibody (Hendzel *et al.*, 1997) allowed us to characterize histone H3 dynamics during mitosis using whole-mount immunolocalization, confocal microscopy, and quantitative image analysis. The phospho-histone fluorescent signals were specifically detected in the dividing cells in a black background (*Fig. 8/a-b and Fig. 22/c-d*), which first appears in prophase, reaches its peak around prometaphase-metaphase, then decreases during anaphase and disappears by cytokinesis. Using a fluorescent dye (DAPI) for chromosome visualization and antibodies against microtubules allowed us to quantify the mitotic activity in percentage of total dividing cells, as well as early and late mitotic cells separately.

We first took a genetic approach and examined *Arabidopsis thaliana* root meristems in Columbia wild-type (Col0) and PP2A mutant backgrounds, including double catalytic subunit mutants *pp2ac3 pp2ac4* (hereafter referred to as *c3c4*) (Spinner *et al.*, 2013) and two single regulatory subunit mutants (*fass-15* (Kirik *et al.*, 2012) and *fass-5* (Camilleri *et al.*, 2002)). The mutations caused varying degrees of morphological alterations, with the most severe phenotype observed in the KO *fass-5 allele*, where the tissues from the shoot and root barely were distinguishable to the naked eye (*Fig. 7*). We showed that these mutations significantly impacted general PP2A activity, which is increasing in *fass* mutants and decreasing in *c3c4* (*Fig. 10*). The mitotic activity however decreased only in the more affected mutants (*c3c4* and *fass-5*), where early mitotic arrest can be observed in case of *fass-5* (*Fig. 13*). Measuring the mean histone signal intensities in 2D revealed that in Columbia wild-type plants, phosphorylation follows the

pattern described in the literature, peaking in metaphase. In *c3c4* and weak *fass-15* phenotypes, the pattern shows slight changes, whereas in the *fass-5* KO mutant, phosphorylation remains very low throughout the whole mitosis (Fig. 16).

We then used a pharmacological approach and treated the samples with microcystin-LR (MCY-LR), a cyanobacterial toxin, which specifically inhibit PP2A and PP1 (MacKintosh & Diplexcito, 2010; Máthé *et al.*, 2013a). By combining PP2A mutants with PP2A inhibitors, we can gain even more precise insights into the regulation of protein phosphatase activity and study its role in mitotic activities and reversible phosphorylation of histone H3. Toxin treatment inhibits not only a specific PP2A complex but also all isoforms of the PP2A and PP1 as MCY-LR is a general inhibitor (MacKintosh & Diplexcito, 2010), thereby allowing us to investigate potential interactions and compensations between different protein phosphatases. We used an environmental relevant concentration (0,05 μM) (Ujvárosi *et al.*, 2019) and a higher concentration (1 μM) which do not cause cell death within the toxin exposure period (24 hours), but it can cause cellular changes. In *A. thaliana* wild-type the cyanotoxin inhibited the PP2A activity in whole seedlings (Fig. 11/b) and in primary roots (Fig. 11/e), however PP1 activity was not affected as compared to different model plants (Máthé *et al.*, 2013b; Garda *et al.*, 2018). The root was more sensitive to the microcystin, as lower concentration already caused inhibitory effects (Fig. 11/e). This suggests that MCY-LR is an excellent tool for studying PP2A functions in *A. thaliana*. The PP2A activity was decreased in all mutant genotypes after MCY-LR treatment, however higher concentration had greater impact (Fig. 11/b and Fig. 12/b). Interestingly in *fass-5* mutant the PP1 activity was also inhibited significantly (Fig. 12/c), but not in other genotypes. This mutant exhibits more pronounced phenotypic alterations, making it more sensitive to various stress factors at the subcellular level, as also detected by Juhász *et al.* (2023). Therefore, we can conclude that PP1 inhibition caused by MCY-LR is not directly related to the alteration of the FASS-C3/C4 interaction.

In plants, the regulatory role of PP1 or PP2A in the timing of mitosis is still poorly understood. However, it has been observed that in several plant species, microcystin treatment inhibits both PP2A and PP1, which affects the metaphase-anaphase transition and delays the progression of mitosis (Máthé *et al.*, 2009; Beyer *et al.*, 2012; Máthé *et al.*, 2013b; Garda *et al.*, 2016, 2018). Based on previous experiments we expected that phosphatase inhibitory treatments would cause severe disruptions in the mitotic apparatus, inhibiting or even completely blocking mitosis. In Col0 MCY-LR inhibits the mitotic activity (Fig. 14) in parallel with the PP2A inhibitory effects, however mitotic arrest was not observed. The 0.05 μM MCY-LR treatment inhibited mitosis more effectively than the higher concentration, even

though only the higher concentration significantly inhibited PP2A activity. This can be explained that after treatment with 1 μ M MCY-LR the expression of the PP2A catalytic subunit can be raised as detected before in rice and cucumber seedlings, which contribute to the development of tolerance to microcystin (Ma *et al.*, 2023). This suggests that low concentrations of microcystin-LR may disrupt the balance between phosphatase activity and expression, while at higher concentrations, maintained PP2A levels may partially offset the inhibition.

MCY-LR had interesting effects on mitotic activity in PP2A mutant plants. Following 0.05 μ M MCY-LR treatment, both *fass-5* and *c3c4* showed an increased level in mitotic activity (Fig. 14-15). However, in case of *fass-5*, this increase was primarily due to a mitotic block occurring in the early mitotic phases, which led to an elevated calculated mitotic index (Fig. 15/b). In *fass-15* control roots there is no mitotic block like in the phenotypically more affected *fass-5* (Fig. 13) and 24 hours of MCY-LR treatment caused only late mitotic arrest (Fig. 15/c), however, after 48 hours of toxin exposure in *fass-15* early mitotic arrest was detected (Garda *et al.*, 2025). These findings support the idea that the absence of the FASS regulatory subunit affects more than just PP2A activity, suggesting broader roles. Additionally, C3/C4 and FASS may have specific functions in mitotic regulation distinct from the general role of the PP2A holoenzyme, highlighting the need for further investigation.

While we expected strong histone H3 hyperphosphorylation after toxin treatments, mostly only a mild increase was observed, except in the severely affected *fass-5* mutant. In the *c3c4* and *fass-15* mutant plants, we detected a slightly elevated level of pH3S10 following toxin treatments, which was more pronounced than in Col0 (Fig. 17-18). This suggests that disruption of these specific subunits may affect the activity of the entire PP2A holoenzyme pool, since MCY-LR inhibits all possible PP2A holoenzyme combinations (MacKintosh & Diplexcito, 2010). Most interestingly, MCY-LR appeared to restore the phosphorylation pattern (Houben *et al.*, 2007) of the *fass-5* KO mutant, with a peak at metaphase (Fig. 18). We suppose that PP2A regulates pH3S10 levels indirectly, as PP2A mutations led to decreased histone H3 phosphorylation, contrary to earlier reports of hyperphosphorylation upon phosphatase inhibition in plants (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018; Ujvárosi *et al.*, 2019). This result suggests a regulation through the phosphorylation-dependent Aurora kinase activity, which was verified by using biochemical assays to determine protein phosphatase activity. Elevated level of PP2A may inhibit Aurora kinase activity through direct dephosphorylation (Eyers *et al.*, 2003), reducing histone H3 phosphorylation in *fass-5* mutant, while microcystin treatment lowers PP2A activity, allowing Aurora kinase to gain back

its function and phosphorylate histone H3 during early mitosis. Thus, PP2A's role in histone H3 phosphorylation likely involves modulation of Aurora kinase rather than direct action on histone substrates.

In summary, although histone H3 phosphorylation levels depend in part on phosphatase activity, elevated pH3S10 levels generally did not correlate with mitotic arrest in most *Arabidopsis thaliana* genotypes, regardless of MCY-LR treatment. This suggests that phosphatases regulate these processes in a more complex and distinct manner in *A. thaliana* compared to *Vicia faba* (Beyer *et al.*, 2012; Garda *et al.*, 2018). Additionally, our results imply that the absence of functional FASS protein may disrupt histone phosphorylation by causing mislocalization of the PP2A holoenzyme on chromatin. Also, the increased level of PP2A in *fass* mutants can suggest that other PP2A holoenzyme complexes may compensate the lack of this specific PP2A with FASS subunit, which influence the histone phosphorylation through the phosphorylation-dependent Aurora kinase activity. Overall, in *Arabidopsis thaliana* the phosphatase-mitosis-histone phosphorylation relationship may rely on more complex mechanisms which require further detailed investigation.

During the course of my PhD, I developed a collaboration with David Bouchez's group at the INRAE research centre in Versailles (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin for Plant Science (IJPB), Versailles, France) under Dr. Martine Pastuglia's supervision. This collaboration had two main goals: Scientific, first, because this group studies a phosphatase complex named TTP, that regulates cortical microtubule arrays and spatial control of cell division. This multiprotein complex comprising PP2A holoenzyme with FASS as the regulatory subunit for its phosphatase activity, an assembly subunit named TON1, and TRM which involved in recruiting TON1 to the microtubules (Schaefer *et al.*, 2017). And technically, to get introduced to image analysis and quantification. I conducted a three-month on-site project, including immunolocalization (phospho-histone H3S10 and microtubules) and microscopy imaging of different *A. thaliana* mutant genotypes, followed by phospho-histone signal analysis using a newly developed semi-automatic 3D workflow.

Indeed, up to this collaboration, I did signal intensity measurements only in 2D. But analysing histone signals in 3D might increase statistical power and allow to detect even smaller differences between mutants and treatments. During my stay in Versailles and after coming back in Hungary, I contributed to developing an advanced semi-automatic 3D image analysis pipeline.

The purpose of the project was to design a pipeline in Fiji software (Schindelin *et al.*, 2012) to quantify the total signal intensities within each nucleus

whatever the phase is. The analysis uses three ImageJ macro programs based on the Fiji built-in plugins, namely MorphoLibJ (Legland *et al.*, 2016) and BoneJ2 (Domander *et al.*, 2021). We utilized the high specificity and low background of the pH3S10 signal (Fig. 8/a-b and Fig. 22/c-d) in the 3D images to develop an ImageJ pipeline for automatic segmentation and quantification of the total pH3S10 signal in each mitotic cell. One of the challenges was the natural decrease in signal intensities during confocal scanning (Fig. 20/a). The first macro addresses this issue by correcting signal attenuation with depth based on metaphase plates (metaphase objects are determined by segmentation) to ensure spatial homogeneity (Fig. 20/b and Fig. 21). Another challenge was that the signal pattern varies depending on the mitotic phase. The second macro is able to segment each individual nuclei (Fig. 19) and quantify the total signal intensity for each object in 3D on the corrected images. The third macro allows to determine the corresponding mitotic phases based on microtubule organization and histone signal patterns (Fig. 22/e-l) and choose the corresponding mitotic phase for each nucleus from a menu (based on pH3S10 positive cells: early prophase, late prophase, prometaphase, metaphase, anaphase; visually see consequently Fig. 22/f-j).

To validate our pipeline, we tested the ImageJ macro programs on different *Arabidopsis thaliana* genotypes. In *A. thaliana*, PP2A-A subunits are encoded by three genes, with PP2A-A1 being the most critical. Mutants lacking PP2A-A1 exhibit severe developmental defects, like the *pp2aa1 pp2aa3* double mutant (hereafter referred as *ala3*), while *pp2aa2 pp2aa3* double mutant (hereafter referred to as *a2a3*) shows no issues (Zhou *et al.*, 2004). TRM6-TRM7-TRM8 proteins are essential for PPB assembly, and the *trm6 trm7 trm8* triple mutant (hereafter referred as *trm678*) has a mild phenotype (Schaefer *et al.*, 2017). First, we measured histone pH3S10 signals in mildly affected *a2a3* and *trm678* mutants. Since *trm678* cells lack the PPB, histone signals were classified into four stages in this analysis: prophase, prometaphase, metaphase, and anaphase. In case of the phenotypically mildly affected genotypes, pH3S10 levels were significantly reduced in both mutants compare to Col0 at all stages except anaphase (Fig. 23/a). Data correction revealed previously undetected statistical differences in prometaphase in *a2a3* mutants. Our correction method significantly reduced the confidence intervals (CI95) (Fig. 20/c) and can correct uneven localization of objects. The correction macro takes the centre slice as reference and then applies a correction coefficient based on the predicted values of regression. As a result, the signal of the top slices is lowered, while signals from the bottom are increased. In addition to reducing confidence intervals, this method also accounts for uneven object distribution within 3D stacks. For example, when observing the distribution

of prometaphase cells (*Fig. 24*), we found that in Col0 images these cells tended to appear in the lower part of the root image stacks, while in *a2a3* they were more often located in the upper slices. Without correction, the natural signal attenuation with Z-depth could therefore distort the measured intensity values; however, this correction method compensates for intensity differences arising from such spatially heterogeneous distributions. As a result, it is especially well-suited for detecting subtle genetic or experimental effects that might otherwise be obscured by depth-related signal loss.

We further quantified pH3S10 dynamics in severely impaired *ala3* and *c3c4* double mutants, both lacking PPB formation like *trm678*. These mutants exhibited severe root morphogenesis defects and a strong reduction in dividing cells (Zhou *et al.*, 2004; Spinner *et al.*, 2013), making metaphase-based correction impractical. Instead, we used all pH3S10 objects for regression. Again, this showed that the level of pH3S10 is strongly reduced in the phenotypically strongly affected mutants (*Fig. 25*). A comparison performed on Col0 samples, where correction could be done either using only metaphase cells or all pH3S10 positive cells, showed that the values obtained were very similar (*Fig. 23/a and Fig. 25*), suggesting that although correction based on all objects is expected to be less precise, it can serve as a useful alternative when the number of metaphase cells is insufficient for applying the correction method based on metaphase plates.

Next, to evaluate the ability of our pipeline to detect and quantify pH3S10 signals under different conditions we treated the wild-type plants with the Aurora kinase inhibitor hesperadin (Hauf *et al.*, 2003). As expected from previous experiments (Kurihara *et al.*, 2006, 2008; Demidov *et al.*, 2009), this Aurora kinase inhibitor had a strong effect on mitotic activity and histone H3 phosphorylation. Our pipeline precisely measured pH3S10 levels and revealed that in wild-type plants without treatment the signal peaked in late prophase and remained high through metaphase, decreasing during anaphase. Hesperadin treatment reduced pH3S10 by up to 75% from late prophase to anaphase, with no significant effect in early prophase, suggesting other kinases may also regulate H3S10 phosphorylation at this stage.

Measurement of pH3S10 signals in PP2A mutants suggests that PP2A may regulate histone H3 reversible phosphorylation at serine 10 residue indirectly, as impaired phosphatase activity led to reduced histone H3 phosphorylation. In mammalian cells, where PP2A promotes Aurora kinase inactivation (Carmena *et al.*, 2009) either directly through dephosphorylation (Eyers *et al.*, 2003) or indirectly via stabilization its inhibitor, the PTTG1 (Pituitary Tumor-Transforming Gene 1) (Tong *et al.*, 2008) correlates our findings. Our approach, capable of

detecting subtle yet robust differences across genotypes or treatments, offers a promising path to unravel histone phosphorylation pathways in plants, especially using the many genetic resources available in *Arabidopsis thaliana*.

What have we learned about the role of PP2A in cell cycle in *Arabidopsis thaliana* model plant? Our findings suggest that PP2A does not directly regulate histone H3 phosphorylation during mitosis. Instead, we observed an indirect effect, possibly through the phospho-regulation of Aurora kinase activity. On the other hand, PP2A impairment affected mitotic progression by causing mitotic arrests, which can be related to the PP2A activity, but not to the histone H3 phosphorylation. Mutation of PP2A-FASS subunit caused strong mitotic blocks at the metaphase-anaphase transition and also induced milder cell cycle arrest during mitotic exit. The unexpected results obtained using TRM mutant suggests a possible connection between the TTP complex activity and chromosome control, which may be associated to microtubules or not. This question can be a perspective for future research. Regarding cell cycle regulation, I didn't explain it here, but I've shown that PP2A impairment induced mitotic blocks causing arrest at the early mitotic stages under oxidative stress. These findings underscore PP2A's broader involvement in mitotic control, affecting not just entry into mitosis but also progression through it and the exit (*Fig. 27*).

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Prof. Dr. Máthé Csaba** egyetemi tanárnak, hogy a kezdetektől fogva támogatta és szakmai tapasztalatával egyengette utamat, az alapképzéstől egészen a doktori képzésig. Hálás vagyok, hogy mindig bátorította elképzeléseimet, bizalmat szavazott terveimnek, és hogy megosztotta velem azt a rendkívül széleskörű tudást, amely nagyban hozzájárult szakmai fejlődésemhez és céljaim eléréséhez.

Külön köszönöm **Dr. Garda Tamásnak** és **Dr. Freytag Csongornak**, hogy szakmailag segítettek és koordinálták a kísérletek elvégzését, valamint köszönöm az évek során kapott értékes tanácsokat. Hálás vagyok önzetlen segítségükért a laboratóriumi munkák során, amelyek megalapozták a technikai tudásomat, és biztos alapot nyújtanak jövőbeli pályafutásomhoz.

Köszönöm **Dr. David Bouchez** és **Dr. Martine Pastuglia** kutatóknak (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin for Plant Science (IJPB), Versailles, Franciaország) a lehetőséget, hogy nemzetközi szakmai tapasztalatokat szerezhsek doktori tanulmányaim során. Különösen hálás vagyok Dr. Martine Pastuglia-nak, amiért odaadóan felügyelte és segítette a munkámat a kutatóközpontban eltöltött idő alatt.

Szeretnék köszönetet mondani **Prof. Dr. Vasas Gábor** professzor úrnak és kutatócsoportjának, hogy biztosította a kísérleteinkhez használt MCY-LR cianobakteriális toxint. Köszönöm **Dr. Riba Milán** (Debreceni Egyetem, Gyógyszertudományi Kar, Farmakognózia Tanszék, Debrecen, Magyarország) munkáját a cianotoxin tisztítása során.

Ezúton is köszönöm **Dr. Martine Pastuglia**-nak, hogy rendelkezésünkre bocsájtotta az értekezésben vizsgált PP2A protein foszfatáz mutáns *Arabidopsis thaliana* magokat.

Köszönöm **Dr. Ujlaky-Nagy Lászlónak** (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, Debrecen, Magyarország) a Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal végzett munkáját. Köszönöm **Dr. Garda Tamásnak** a Nikon-Ti-E konfokális mikroszkóppal készült felvételeket.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Erdődi Ferencnek** és **Dr. Kónya Zoltánnak** (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Vegytani Intézet, Debrecen, Magyarország) a protein foszfatáz izotópos aktivitás mérésekben nyújtott segítségükért.

Köszönöm **Dr. Taras Pasternak** (Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain) tanácsait a whole-mount immunhisztokémiai jelöléssel kapcsolatban.

A 3D fluoreszcens jelintenzitás analízishez használt képfeldolgozó makrók fejlesztését **Dr. David Bouchez** kiváló munkája tette lehetővé. A program további finomhangolásában és optimalizálásában Dr. Martine Pastuglia, **Dr. Philippe Andrey** és **Dr. Magalie Uyttewaal** (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, IJPB, Versailles, Franciaország) értékes szakértelemmel és

elkötelezettséggel járultak hozzá. Hálásan köszönöm mindannyiuk munkáját és támogatását, amely nagyban hozzájárult a kutatás sikeréhez.

Köszönöm az adatok statisztikai elemzését **Dr. Freytag Csongornak** és **Dr. David Bouchez-nek**.

Hálás köszönettel tartozok a kutatócsoportunk PhD hallgatójának, **Juhász Gabriella Petrának**, szakdolgozóinak, **Pózer Erik Tamásnak** és **Tóth-Várady Baláznak**, illetve technikusunknak **Magi Dorottyának**, amiért segítették a kísérletek kivitelezését és köszönöm, hogy a munkámat kellemes és baráti légkörben végezhettem.

Továbbá szeretném megköszönni a **Növénytani Tanszék** jelenlegi és korábbi oktatóinak, munkatársainak és hallgatóinak a hozzájárulását a kutatási projektek kivitelezéséhez, valamint köszönöm minden publikáció társszerzőjének a hozzájárulását a projektek sikeres megvalósításában.

Végül de nem utolsó sorban elmondhatatlanul sok hálával és köszönettel tartozom **szüleimnek**, akik mindvégig biztosították tanulmányaim háttérét, mindig támogattak, bátorítottak és bíztak bennem, amikor elköteleztem magam ezen az olykor rögös úton. Folyamatos figyelmük és bizalmuk nagyban hozzájárult a fejlődésemhez, és megnyugtató tudni, hogy mindig számíthatok rájuk. Hasonló hálával gondolok a **húgomra**, **nagyszüleimre**, **családtagjaimra**, **barátaimra** és **páromra** is, akik szeretetükkel, kitartó támogatásukkal és biztatásukkal végig mellettem álltak, és erőt adtak a nehezebb pillanatokban is.

9. TÁMOGATÓK

- A munka a Nemzeti **Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) OTKA K 120638-as** pályázatának, valamint a **DE Tudományos Kutatási Alap (DETKA) Áthidaló Pályázat** támogatásával készült.
- A dolgozat az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-2-1-DE-129 kódszámú **Új Nemzeti Kiválóság Program**jának szakmai támogatásával készült, melyet a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal finanszírozott.
- A külföldi együttműködés az „**EMBO Scientific Exchange Grant**” (SEG-9500) támogatása által valósulhatott meg. Továbbá a projekt az **IJPB Plant Observatory (PO-Cyto)** platform, valamint a **Saclay Plant Sciences (SPS)** támogatásával készült (ANR-20-CE13-0026-02; ANR-17-EUR-0007).



10. IRODALOMJEGYZÉK

1. **Ábrahám E, Yu P, Farkas I, Darula Z, Varga E, Lukács N, Ayaydin F, Medzihradzky KF, Dombrádi V, Dudits D, Horváth GV. 2015.** The B'' regulatory subunit of protein phosphatase 2A mediates the dephosphorylation of rice retinoblastoma-related protein-1. *Plant Molecular Biology* **87**: 125–141.
2. **Abràmoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. 2004.** Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* **11**: 36–42.
3. **Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, et al. 2003.** Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
4. **Azimzadeh J, Nacry P, Christodoulidou A, Drevensek S, Camilleri C, Amiour N, Parcy F, Pastuglia M, Bouchez D. 2008.** *Arabidopsis* TONNEAU1 Proteins Are Essential for Preprophase Band Formation and Interact with Centrin. *The Plant Cell* **20**: 2146–2159.
5. **Ballesteros I, Domínguez T, Sauer M, Paredes P, Duprat A, Rojo E, Sanmartín M, Sánchez-Serrano JJ. 2013.** Specialized functions of the PP2A subfamily II catalytic subunits PP2A-C3 and PP2A-C4 in the distribution of auxin fluxes and development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **73**: 862–872.
6. **Beyer D, Tándor I, Kónya Z, Bátori R, Roszik J, Vereb G, Erdódi F, Vasas G, M-Hamvas M, Jambrovics K, Máthé C. 2012.** Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*. *Annals of Botany* **110**: 797–808.
7. **Bheri M, Mahiwal S, Sanyal SK, Pandey GK. 2021.** Plant protein phosphatases: What do we know about their mechanism of action? *The FEBS Journal* **288**: 756–785.
8. **Bheri M, Pandey GK. 2019.** Protein phosphatases meet reactive oxygen species in plant signaling networks. *Environmental and Experimental Botany* **161**: 26–40.
9. **Biot E, Crowell E, Hofte H, Maurin Y, Vernhettes S, Andrey P. 2008.** A new filter for spot extraction in n-dimensional biological imaging. In: *2008 5th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*. Paris: IEEE, 975–978.
10. **Blokhina O. 2003.** Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* **91**: 179–194.
11. **Bode AM, Dong Z. 2005.** Inducible Covalent Posttranslational Modification of Histone H3. *Science's STKE* **2005**.
12. **Bouchez D, Uyttewaal M, Pastuglia M. 2024.** Spatiotemporal regulation of plant cell division. *Current Opinion in Plant Biology* **79**: 102530.
13. **Bouchez D, Van Damme D, Boruc J, Schaefer E, Pastuglia M. 2014.** Cell Division Plane Determination in Plant Development. In: Assmann S, Liu B, eds. *Cell Biology*. Springer, New York, NY, US, 1–26.
14. **Boudolf V, Inze D, Deveyllder L. 2006.** What if higher plants lack a CDC25 phosphatase? *Trends in Plant Science* **11**: 474–479.
15. **Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
16. **Camilleri C, Azimzadeh J, Pastuglia M, Bellini C, Grandjean O, Bouchez D. 2002.** The *Arabidopsis* TONNEAU 2 Gene Encodes a Putative Novel Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit Essential for the Control of the Cortical Cytoskeleton. *The Plant Cell* **14**: 833–845.
17. **Campos A, Vasconcelos V. 2010.** Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **11**: 268–287.

18. **Carmena M, Ruchaud S, Earnshaw WC. 2009.** Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Current opinion in cell biology* **21**: 796–805.
19. **Chen L, Duan L, Sun M, Yang Z, Li H, Hu K, Yang H, Liu L. 2023.** Current trends and insights on EMS mutagenesis application to studies on plant abiotic stress tolerance and development. *Frontiers in Plant Science* **13**: 1052569.
20. **Chen J, Han FX, Wang F, Zhang H, Shi Z. 2012.** Accumulation and phytotoxicity of microcystin-LR in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **76**: 193–199.
21. **Collins TJ. 2007.** ImageJ for Microscopy. *BioTechniques* **43**: 5.
22. **Considine MJ, Foyer CH. 2021.** Stress effects on the reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany* **72**: 5795–5806.
23. **Cortelezzi JI, Zubillaga M, Scardino VR, Muñiz García MN, Capiati DA. 2025.** Plant PP2A: A Versatile Enzyme with Key Physiological Functions. *Kinases and Phosphatases* **3**: 5.
24. **Dedinszki D, Sipos A, Kiss A, Bátori R, Kónya Z, Virág L, Erdődi F, Lontay B. 2015.** Protein phosphatase-1 is involved in the maintenance of normal homeostasis and in UVA irradiation-induced pathological alterations in HaCaT cells and in mouse skin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1852**: 22–33.
25. **Demidov D, Hesse S, Tewes A, Rutten T, Fuchs J, Karimi Ashtiyani R, Lein S, Fischer A, Reuter G, Houben A. 2009.** Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in Arabidopsis. *The Plant Journal* **59**: 221–230.
26. **Demidov D, Van Damme D, Geelen D, Blattner FR, Houben A. 2005.** Identification and Dynamics of Two Classes of Aurora-Like Kinases in Arabidopsis and Other Plants. *The Plant Cell* **17**: 836–848.
27. **Domander R, Felder A, Doube M. 2021.** BoneJ2 - refactoring established research software. *Wellcome Open Research* **6**: 37.
28. **Doube M, Klosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordelières FP, Dougherty RP, Jackson JS, Schmid B, Hutchinson JR, Shefelbine SJ. 2010.** BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone* **47**: 1076–1079.
29. **Drevensek S, Goussot M, Duroc Y, Christodoulidou A, Steyaert S, Schaefer E, Duvernois E, Grandjean O, Vantard M, Bouchez D, Pastuglia M. 2012.** The Arabidopsis TRM1–TON1 Interaction Reveals a Recruitment Network Common to Plant Cortical Microtubule Arrays and Eukaryotic Centrosomes. *The Plant Cell* **24**: 178–191.
30. **Elshobaky A, Lillo C, Hodén KP, Kataya ARA. 2023.** Protein–Protein Interactions and Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveal Potential Mitochondrial Substrates of Protein Phosphatase 2A-B ζ Holoenzyme. *Plants* **12**: 2586.
31. **Erdodi F, Toth B, Hirano K, Hirano M, Hartshorne DJ, Gergely P. 1995.** Endothall thioanhydride inhibits protein phosphatases-1 and -2A in vivo. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **269**: C1176–C1184.
32. **Eyers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL. 2003.** A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Current Biology* **13**: 691–697.
33. **Farkas I, Dombradi V, Miskei M, Szabados L, Koncz C. 2007.** Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends in plant science* **12**: 169–176.
34. **Faulkner S, Sweetman C, Hutson J, Soole K, Hobson P, Fallowfield H. 2025.** Uptake of the cyanobacterial toxin microcystin by crop plants irrigated with contaminated wastewater: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **24**: 217–238.
35. **Ferjani A, Tsukagoshi H, Vassileva V. 2023.** Editorial: Model organisms in plant science: Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Plant Science* **14**: 1279230.

36. **Fernandez A, Brautigam DL, Lamb N. 1992.** Protein phosphatase type 1 in mammalian cell mitosis: chromosomal localization and involvement in mitotic exit. *The Journal of cell biology* **116**: 1421–1430.
37. **Foroozani M, Holder DH, Deal RB. 2022.** Histone Variants in the Specialization of Plant Chromatin. *Annual Review of Plant Biology* **73**: 149–172.
38. **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.
39. **Freytag C, Garda T, Kónya Z, M-Hamvas M, Tóth-Várady B, Juhász GP, Ujlaky-Nagy L, Kelemen A, Vasas G, Máthé C. 2023.** B^γ and C subunits of PP2A regulate the levels of reactive oxygen species and superoxide dismutase activities in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **195**: 182–192.
40. **Fuchs J, Demidov D, Houben A, Schubert I. 2006.** Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends in Plant Science* **11**: 199–208.
41. **Gácsi M, Antal O, Vasas G, Máthé C, Borbély G, Saker ML, Győri J, Farkas A, Vehovszky Á, Bánfalvi G. 2009.** Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro* **23**: 710–718.
42. **Gallagher SR. 2014.** Digital Image Processing and Analysis with ImageJ. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* **9**.
43. **Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* **50**: 151–158.
44. **Garda T, Juhász GP, Kelemen A, Mathur J, Ujlaky-Nagy L, Freytag C, M-Hamvas M, Riba M, Máthé C. 2025.** Long-term treatments with microcystin-LR and diquat reveal their differences in the induction of oxidative stress responses and mitotic alterations in terms of stress recovery in *Arabidopsis* roots. *Environmental Pollution* **382**: 126748.
45. **Garda T, Kónya Z, Freytag C, Erdődi F, Gonda S, Vasas G, Szücs B, M-Hamvas M, Kiss-Szikszai A, Vámosi G, Máthé C. 2018.** Allyl-Isothiocyanate and Microcystin-LR Reveal the Protein Phosphatase Mediated Regulation of Metaphase-Anaphase Transition in *Vicia faba*. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1823.
46. **Garda T, Kónya Z, Tándor I, Beyer D, Vasas G, Erdődi F, Vereb G, Papp G, Riba M, M-Hamvas M, Máthé C. 2016.** Microcystin-LR induces mitotic spindle assembly disorders in *Vicia faba* by protein phosphatase inhibition and not reactive oxygen species induction. *Journal of Plant Physiology* **199**: 1–11.
47. **Gernand D, Demidov D, Houben A. 2003.** The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* **101**: 172–176.
48. **Gil RS, Vagnarelli P. 2019.** Protein phosphatases in chromatin structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1866**: 90–101.
49. **Granot G, Sikron-Persi N, Li Y, Grafi G. 2009.** Phosphorylated H3S10 occurs in distinct regions of the nucleolus in differentiated leaf cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1789**: 220–224.
50. **Hauf S, Cole RW, LaTerra S, Zimmer C, Schnapp G, Walter R, Heckel A, Van Meel J, Rieder CL, Peters J-M. 2003.** The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore–microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *The Journal of Cell Biology* **161**: 281–294.
51. **Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD. 1997.** Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **106**: 348–360.

52. Horio T, Murata T. 2014. The role of dynamic instability in microtubule organization. *Frontiers in Plant Science* 5.
53. Houben A, Demidov D, Caperta AD, Karimi R, Agueci F, Vlasenko L. 2007. Phosphorylation of histone H3 in plants—A dynamic affair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1769: 308–315.
54. Houben A, Wako T, Furushima-Shimogawara R, Presting G, Künzel G, Schubert I, Fukui K. 1999. The cell cycle dependent phosphorylation of histone H3 is correlated with the condensation of plant mitotic chromosomes. *The Plant Journal* 18: 675–679.
55. Huang W, Batra S, Atkins BA, Mishra V, Mehta KD. 2005. Increases in intracellular calcium dephosphorylate histone H3 at serine 10 in human hepatoma cells: Potential role of protein phosphatase 2A–protein kinase C β II complex. *Journal of Cellular Physiology* 205: 37–46.
56. Hush JM, Hawes CR, Overall RL. 1990. Interphase microtubule re-orientation predicts a new cell polarity in wounded pea roots. *Journal of Cell Science* 96: 47–61.
57. Inzé D, De Veylder L. 2006. Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annual Review of Genetics* 40: 77–105.
58. Jia Y, Li H, Qu Y, Chen W, Song L. 2018. Phytotoxicity, bioaccumulation and potential risks of plant irrigations using cyanobloom-loading freshwater. *Science of The Total Environment* 624: 704–712.
59. Jiang Y. 2006. Regulation of the Cell Cycle by Protein Phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 440–449.
60. Jiang J, Shi Y, Tian F, Long T, Li X, Ying R. 2024. Bioaccumulation of Microcystin-LR and Induced Physio-Biochemical Changes in Rice (*Oryza sativa* L.) at Vegetative Stage under Hydroponic Culture Conditions. *Toxins* 16: 82.
61. Jones GM, Vale JA. 2000. Mechanisms of Toxicity, Clinical Features, and Management of Diquat Poisoning: A Review. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 38: 123–128.
62. Juhász GP, Kéki S, Dékány-Adamoczky A, Freytag C, Vasas G, Máthé C, Garda T. 2023. Microcystin-LR, a Cyanobacterial Toxin, Induces Changes in the Organization of Membrane Compartments in Arabidopsis. *Microorganisms* 11: 586.
63. Kaszás É, Cande WZ. 2000. Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *Journal of Cell Science* 113: 3217–3226.
64. 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: 1–13.
65. Kelemen A, Garda T, Kónya Z, Erdódi F, Ujlaky-Nagy L, Juhász GP, Freytag C, M-Hamvas M, Máthé C. 2024. Treatments with Diquat Reveal the Relationship between Protein Phosphatases (PP2A) and Oxidative Stress during Mitosis in Arabidopsis thaliana Root Meristems. *Plants* 13: 1896.
66. Kelemen A, Kónya Z, Ujlaky-Nagy L, Garda T, Erdódi F, Freytag C, Juhász GP, Pasternak TP, Riba M, Máthé C. 2025a. FASS and C3/C4 contribute to the activities and levels of the protein phosphatase 2A catalytic subunit pool and regulate mitotic events in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry* 227: 110187.
67. Kelemen A, Uyttewaal M, Máthé C, Andrey P, Bouchez D, Pastuglia M. 2025b. Semiautomatic quantification of 3D Histone H3 phosphorylation signals during cell division in Arabidopsis root meristems. *New Phytologist* 247: 3010–3023.
68. Kirik A, Ehrhardt DW, Kirik V. 2012. TONNEAU2/FASS Regulates the Geometry of Microtubule Nucleation and Cortical Array Organization in Interphase Arabidopsis Cells. *The Plant Cell* 24: 1158–1170.

69. **Kos P, Gorzo G, Suranyi G, Borbely G. 1995.** Simple and Efficient Method for Isolation and Measurement of Cyanobacterial Hepatotoxins by Plant Tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry* **225**: 49–53.
70. **Kurihara D, Matsunaga S, Kawabe A, Fujimoto S, Noda M, Uchiyama S, Fukui K. 2006.** Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *The Plant Journal* **48**: 572–580.
71. **Kurihara D, Matsunaga S, Uchiyama S, Fukui K. 2008.** Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant and cell physiology* **49**: 1256–1261.
72. **Lacroix B, Lorca T, Castro A. 2022.** Structural, enzymatic and spatiotemporal regulation of PP2A-B55 phosphatase in the control of mitosis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**: 967909.
73. **Legland D, Arganda-Carreras I, Andrey P. 2016.** MorphoLibJ: integrated library and plugins for mathematical morphology with ImageJ. *Bioinformatics* **32**: 3532–3534.
74. **Li Y-W, Zheng Q-J, Zheng N-J, Meng J-Z, Liu B-L, Liu X, Zhao H-M, Feng N-X, Cai Q-Y, Xiang L, Mo C-H, Li QX. 2025.** Novel Insights into Microcystin-LR Uptake, Accumulation, and Toxicity Mechanisms in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Using a Protoplast Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **73**: 7620–7631.
75. **Livanos P, Apostolakos P, Galatis B. 2012.** Plant cell division: ROS homeostasis is required. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 771–778.
76. **Loginova DB, Silkova OG. 2017.** H3Ser10 histone phosphorylation in plant cell division. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* **7**: 46–56.
77. **Luan S. 2003.** Protein Phosphatases in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 63–92.
78. **Ma X, Gu Y, Liang C. 2023.** Adaptation of protein phosphatases in *Oryza sativa* and *Cucumis sativus* to microcystins. *Environmental Science and Pollution Research* **30**: 7018–7029.
79. **Machado J, Campos A, Vasconcelos V, Freitas M. 2017.** Effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on plant-soil systems: A review of their relevance for agricultural plant quality and public health. *Environmental Research* **153**: 191–204.
80. **MacKintosh C, Diplexcito J. 2010.** Naturally occurring inhibitors of protein serine/threonine phosphatases. In: Bradshaw RA, Dennis EA, eds. *Handbook of Cell Signaling*. Elsevier, 683–687.
81. **Manzanero S, Rutten T, Kotscheruba 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**: 467–476.
82. **Martindill DMJ, Riley PR. 2008.** Cell cycle switch to endocycle: The nucleolus lends a hand. *Cell Cycle* **7**: 17–23.
83. **Máthé C, Beyer D, Erdódi F, Serfőző Z, Székvölgyi L, Vasas G, M-Hamvas M, Jámbrik K, Gonda S, Kiss A. 2009.** Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets. *Aquatic Toxicology* **92**: 122–130.
84. **Máthé C, Beyer D, Vasas G. 2016.** The effects of microcystins (cyanobacterial heptapeptides) on the eukaryotic cytoskeletal system. *Mini reviews in medicinal chemistry* **16**: 1063–1077.
85. **Máthé C, Bóka K, Kónya Z, Erdódi F, Vasas G, Freytag C, Garda T. 2024.** Microcystin-LR, a cyanotoxin, modulates division of higher plant chloroplasts through protein phosphatase inhibition and affects cyanobacterial division. *Chemosphere* **358**: 142125.
86. **Máthé C, Freytag C, Kelemen A, M-Hamvas M, Garda T. 2023.** “B” Regulatory Subunits of PP2A: Their Roles in Plant Development and Stress Reactions. *International Journal of Molecular Sciences* **24**: 5147.

87. Máthé C, Garda T, Freytag C, M-Hamvas M. 2019. The Role of Serine-Threonine Protein Phosphatase PP2A in Plant Oxidative Stress Signaling—Facts and Hypotheses. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 3028.
88. Máthé C, M-Hamvas M, Vasas G. 2013a. Microcystin-LR and Cylindrospermopsin Induced Alterations in Chromatin Organization of Plant Cells. *Marine Drugs* **11**: 3689–3717.
89. Máthé C, M-Hamvas M, Vasas G, Garda T, Freytag C. 2021. Subcellular Alterations Induced by Cyanotoxins in Vascular Plants—A Review. *Plants* **10**: 984.
90. Máthé C, M-Hamvas M, Vasas G, Surányi G, Bácsi I, Beyer D, Tóth S, Tímár M, Borbély G. 2007. Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, induces growth inhibition and histological alterations in common reed (*Phragmites australis*) plants regenerated from embryogenic calli. *New Phytologist* **176**: 824–835.
91. Máthé C, Vasas G, Borbély G, Erdódi F, Beyer D, Kiss A, Surányi G, Gonda S, Jámbrik K, M-Hamvas M. 2013b. Histological, cytological and biochemical alterations induced by microcystin-LR and cylindrospermopsin in white mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Acta Biologica Hungarica* **64**: 71–85.
92. McManus KJ, Hendzel MJ. 2006. The relationship between histone H3 phosphorylation and acetylation throughout the mammalian cell cycle. *Biochemistry and cell biology* **84**: 640–657.
93. Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**: 662–682.
94. Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA. 2003. Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant molecular biology* **53**: 423–442.
95. M-Hamvas M, Máthé C, Molnár E, Vasas G, Grigorszky I, Borbély G. 2003. Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. *Aquatic Toxicology* **62**: 1–9.
96. 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**: 35–48.
97. M-Hamvas M, Vasas G, Beyer D, Nagylaki E, Máthé C. 2021. Microcystin-LR, a Cyanobacterial Toxin, Induces DNA Strand Breaks Correlated with Changes in Specific Nuclease and Protease Activities in White Mustard (*Sinapis alba*) Seedlings. *Plants* **10**: 2045.
98. Mittler R. 2017. ROS Are Good. *Trends in Plant Science* **22**: 11–19.
99. Miura K. 2020. Bleach correction ImageJ plugin for compensating the photobleaching of time-lapse sequences. *F1000Research* **9**: 1494.
100. Mochida S, Ikeo S, Gannon J, Hunt T. 2009. Regulated activity of PP2A–B55 δ is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *The EMBO Journal* **28**: 2777–2785.
101. Motta MR, Schnittger A. 2021. A microtubule perspective on plant cell division. *Current Biology* **31**: R547–R552.
102. Moura M, Conde C. 2019. Phosphatases in mitosis: roles and regulation. *Biomolecules* **9**: 55.
103. Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497.
104. Nowak SJ, Pai C-Y, Corces VG. 2003. Protein Phosphatase 2A Activity Affects Histone H3 Phosphorylation and Transcription in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* **23**: 6129–6138.
105. Nunez-Vazquez R, Desvoyes B, Gutierrez C. 2022. Histone variants and modifications during abiotic stress response. *Frontiers in Plant Science* **13**: 984702.
106. Oh J, Park Y, Park S, Woo O-G, Lee J-H, Lee J-S, Kim T. 2025. Phosphatase regulation in cell division: with emphasis on PP2A-B56. *Molecules and Cells*: 100255.

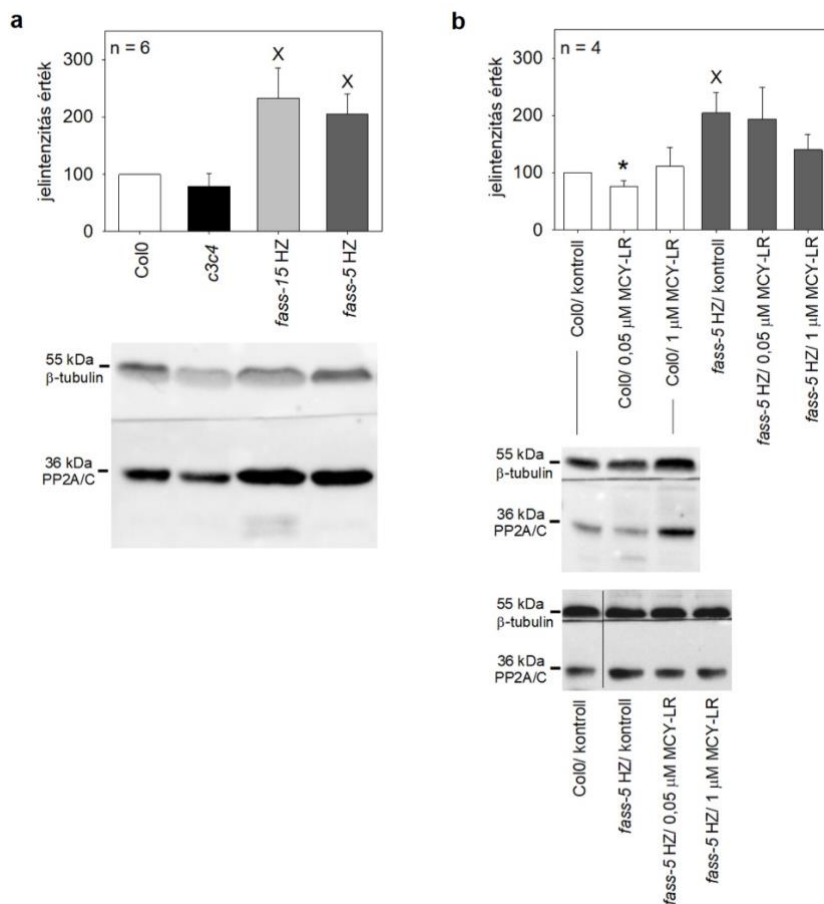
107. Ohser J, Haas P, Fahrbach F, Menstell P, Schwämmle A, Osterroth S, Dobrovolskij D. 2020. Attenuation correction for confocal laser scanning microscopy and its application in chromatography. *Journal of Microscopy* **278**: 76–88.
108. Østergaard L, Yanofsky MF. 2004. Establishing gene function by mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **39**: 682–696.
109. Page DR, Grossniklaus U. 2002. The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* **3**: 124–136.
110. Pasternak T, Tietz O, Rapp K, Begheldo M, Nitschke R, Ruperti B, Palme K. 2015. Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. *Plant Methods* **11**: 50.
111. Peer WA, Mahmoudian M, Freeman JL, Lahner B, Richards EL, Reeves RD, Murphy AS, Salt DE. 2006. Assessment of plants from the Brassicaceae family as genetic models for the study of nickel and zinc hyperaccumulation. *New Phytologist* **172**: 248–260.
112. Pflugmacher S. 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology* **70**: 169–178.
113. Pinsky BA, Nelson CR, Biggins S. 2009. Protein phosphatase 1 regulates exit from the spindle checkpoint in budding yeast. *Current Biology* **19**: 1182–1187.
114. Raabe K, Sun L, Schindfessel C, Honys D, Geelen D. 2024. A word of caution: T-DNA-associated mutagenesis in plant reproduction research. *Journal of Experimental Botany* **75**: 3248–3258.
115. Rahikainen M, Pascual J, Alegre S, Durian G, Kangasjärvi S. 2016. PP2A Phosphatase as a Regulator of ROS Signaling in Plants. *Antioxidants* **5**: 8.
116. Ramos F, Villoria MT, Alonso-Rodríguez E, Clemente-Blanco A. 2019. Role of protein phosphatases PP1, PP2A, PP4 and Cdc14 in the DNA damage response. *Cell Stress* **3**: 70–85.
117. Rasmussen CG, Wright AJ, Müller S. 2013. The role of the cytoskeleton and associated proteins in determination of the plant cell division plane. *The Plant Journal* **75**: 258–269.
118. Rédei G. 1970. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. A review of the genetics and biology. *Bibliographia Genetica*. **20**: 151 pp.
119. Rédei GP. 1974. *Arabidopsis thaliana*. In: King RC, ed. *Handbook of Genetics: Plants, Plant Viruses, and Protists*. Springer, Boston, MA, US, 151–180.
120. Reichheld J, Vernoux T, Lardon F, Van Montagu M, Inzé D. 1999. Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *The Plant Journal* **17**: 647–656.
121. Ricou A, Géry C, Horlow C, Loudet O, Camilleri C. 2025. The Versailles *Arabidopsis* Stock Center (VASC): original genetic resources exploiting both induced and natural diversity to investigate gene functions and analyze the impact of variation on plant biology. *Genetic Resources (S2)* 70–77.
122. Sablowski R, Carnier Dornelas M. 2014. Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *Journal of Experimental Botany* **65**: 2703–2714.
123. Sawicka A, Seiser C. 2012. Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* **94**: 2193–2201.
124. Schaefer E, Belcram K, Uyttewaal M, Duroc Y, Goussot M, Legland D, Laruelle E, De Tauzia-Moreau M-L, Pastuglia M, Bouchez D. 2017. The preprophase band of microtubules controls the robustness of division orientation in plants. *Science* **356**: 186–189.
125. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**: 676–682.

126. Schindelin J, Rueden CT, Hiner MC, Eliceiri KW. 2015. The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Molecular Reproduction and Development* **82**: 518–529.
127. Scholl RL, May ST, Ware DH. 2000. Seed and Molecular Resources for Arabidopsis. *Plant Physiology* **124**: 1477–1480.
128. Shi Y. 2009. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* **139**: 468–484.
129. Shimotohno A, Aki SS, Takahashi N, Umeda M. 2021. Regulation of the Plant Cell Cycle in Response to Hormones and the Environment. *Annual Review of Plant Biology* **72**: 273–296.
130. Smith RD, Walker JC. 1996. Plant protein phosphatases. *Annual review of plant biology* **47**: 101–125.
131. Spinner L, Gadeyne A, Belcram K, Goussot M, Moison M, Duroc Y, Eeckhout D, De Winne N, Schaefer E, Van De Slijke E, Persiau G, Witters E, Gevaert K, *et al.* 2013. A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nature Communications* **4**: 1863.
132. Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41–45.
133. Szigeti ZM, Jámbrik K, Roszik J, M-Hamvas M, Tándor I, Beyer D, Vasas G, Vereb G, Surányi G, Máthé C. 2010. Cytoskeletal and developmental alterations in *Ceratophyllum demersum* induced by microcystin-LR, a cyanobacterial toxin. *Aquatic Botany* **92**: 179–184.
134. Talbert PB, Ahmad K, Almouzni G, Ausió J, Berger F, Bhalla PL, Bonner WM, Cande WZ, Chadwick BP, Chan SWL, Cross GAM, Cui L, Dimitrov SI, *et al.* 2012. A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics & Chromatin* **5**: 7.
135. Tong Y, Ben-Shlomo A, Zhou C, Wawrowsky K, Melmed S. 2008. Pituitary tumor transforming gene 1 regulates Aurora kinase A activity. *Oncogene* **27**: 6385–6395.
136. Traas J, Bellini C. 1995. Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature* **375**.
137. Uhrig RG, Labandera A-M, Moorhead GB. 2013. Arabidopsis PPP family of serine/threonine protein phosphatases: many targets but few engines. *Trends in Plant Science* **18**: 505–513.
138. Ujvárosi AZ, Riba M, Garda T, Gyémánt G, Vereb G, M-Hamvas M, Vasas G, Máthé C. 2019. Attack of *Microcystis aeruginosa* bloom on a *Ceratophyllum submersum* field: Ecotoxicological measurements in real environment with real microcystin exposure. *Science of The Total Environment* **662**: 735–745.
139. Valério E, Vasconcelos V, Campos A. 2016. New Insights on the Mode of Action of Microcystins in Animal Cells - A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **16**: 1032–1041.
140. Vasas G, Gáspár A, Páger C, Surányi G, Máthé C, Hamvas MM, Borbely G. 2004. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **25**: 108–115.
141. Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E. 2000. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* **19**: 4906–4916.
142. Wang F, Higgins JMG. 2013. Histone modifications and mitosis: countermarks, landmarks, and bookmarks. *Trends in Cell Biology* **23**: 175–184.
143. Wang J, Lian N, Zhang Y, Man Y, Chen L, Yang H, Lin J, Jing Y. 2022. The Cytoskeleton in Plant Immunity: Dynamics, Regulation, and Function. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 15553.

144. **Weigel D, Mott R. 2009.** The 1001 Genomes Project for *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology* **10**: 107.
145. **Weiss T, Crisp PA, Rai KM, Song M, Springer NM, Zhang F. 2022.** Epigenetic features drastically impact CRISPR–Cas9 efficacy in plants. *Plant Physiology* **190**: 1153–1164.
146. **Wickham H. 2016.** Data analysis. In: *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer, Cham, 189–201.
147. **Winter Z. 2018.** Regulation of endoreduplication by protein phosphatase 2A in *Arabidopsis thaliana* leaves. Master's thesis, University of Turku, Department of Biochemistry, Molecular System Biology, Turku, Finland
148. **Wlodarchak N, Xing Y. 2016.** PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **51**: 162–184.
149. **Yagi N, Fujita S, Nakamura M. 2024.** Plant microtubule nucleating apparatus and its potential signaling pathway. *Current Opinion in Plant Biology* **82**: 102624.
150. **Yoon J-T, Ahn H-K, Pai H-S. 2018.** The subfamily II catalytic subunits of protein phosphatase 2A (PP2A) are involved in cortical microtubule organization. *Planta* **248**: 1551–1567.
151. **Zhang B, Dong Q, Su H, Birchler JA, Han F. 2014.** Histone Phosphorylation: Its Role during Cell Cycle and Centromere Identity in Plants. *Cytogenetic and Genome Research* **143**: 144–149.
152. **Zhang K, Tsukitani Y, John PC. 1992.** Mitotic arrest in tobacco caused by the phosphoprotein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Plant and cell physiology* **33**: 677–688.
153. **Zhou H-W, Nussbaumer C, Chao Y, DeLong A. 2004.** Disparate Roles for the Regulatory A Subunit Isoforms in *Arabidopsis* Protein Phosphatase 2A. *The Plant Cell* **16**: 709–722.

11. FÜGGELÉK

11.1. Függelék ábrák

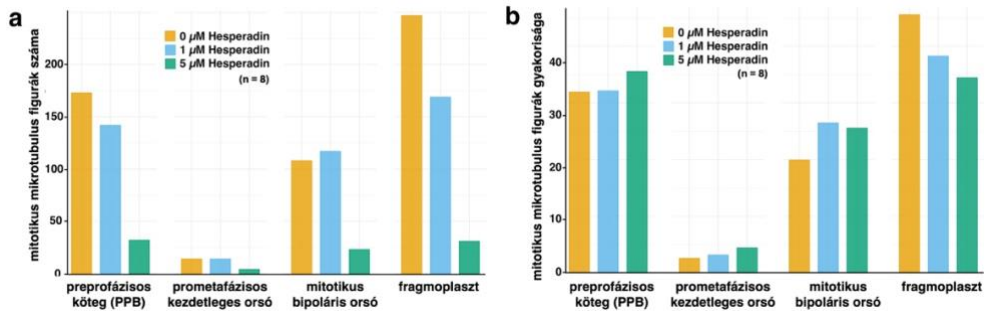


F1. ábra: Western blot analízis a PP2A-C katalitikus alegység szint meghatározására vad-típusú, illetve PP2A mutáns *Arabidopsis thaliana* egész csíranövényekben. (a) A kezeletlen minták összehasonlítása során szignifikánsan megnövekedett PP2A-C fehérje szintet detektáltunk a *fass* homozigóta mutánsokban. A *c3c4* mutánsok esetében enyhe gátlás tapasztalható a vad-típushoz képest. (b) 0,05 μM MCY-LR toxinkezelést követően szignifikáns gátlást tapasztaltunk a Col0 esetében, míg a nagyobb koncentrációjú toxinkezelések hatására inkább növekedett a PP2A-C fehérje szintje. *fass-5* HZ mutánsokban a toxinkezelés gátló hatást fejtett ki.

Belső kontrollként a mikrotubulusokat használtuk.

A „X” szimbólumok minden minta szignifikáns különbségét mutatja a Col0 kontrollhoz képest, míg a „*” szimbólumok az adott genotípuson belüli MCY-LR kezelések és a kontrollok közötti szignifikáns különbségeket mutatják.

X, * = $p < 0,05$; XX, ** = $p < 0,01$; XXX, *** = $p < 0,001$



F2. ábra: A hesperadin kezelés következtében detektált mitotikus aktivitás változások *Col0* gyökércsúcs merisztéma sejtekben. A mitotikus figurákat hesperadin kezelés következtében a mikrotubulus jelölés után kvantifikáltuk. **(a)** Az 5 μ M hesperadin kezelés után mitotikus sejtek száma erőteljesen lecsökkent, szinte alig detektálható osztódó sejt. **(b)** Azonban a különböző fázisokban megjelenő mitotikus figurák gyakorisága és eloszlása hesperadin kezelést követően alig változik a nagy mértékű mitotikus aktivitás csökkenés következtében sem.

11.2. A diquat (DQ) kezelése PP2A mutánsokon történő alkalmazása rávilágít a PP2A és az oxidatív stressz közötti összefüggésekre a sejtosztódás során az *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcs merisztéma sejtekben

A növényi anyagcsere normál melléktermékeként számos reaktív oxigén forma (ROS) képződhet különféle sejtalkotókban, például a mitokondriumban, a kloroplasztban, a peroxiszómában, illetve az apoplasztban is (Livanos *et al.*, 2012; Máthé *et al.*, 2019). A stresszválaszokban betöltött szerepük mellett a ROS-ok kulcsfontosságú szabályozói a növényi fejlődésnek, mivel képesek közvetlenül befolyásolni a sejtciklus kulcsfehérjéinek működését, és akár meg is állíthatják a sejtciklus előrehaladását (Reichheld *et al.*, 1999; Considine & Foyer, 2021). Oxidatív stresszről akkor beszélünk, ha a sejten belüli ROS szint olyan mértékben megemelkedik, hogy az meghaladja a védekező mechanizmusok kapacitását, így ezek a káros vegyületek oxidatív károsodásokat idéznek elő a sejtben (Blokhina, 2003; Livanos *et al.*, 2012)

Az oxidatív jelátviteli utak szabályozása reverzibilis fehérje foszforilációt igényel, így ezekben a folyamatokban fontos szerepet töltenek be a különböző protein kinázok és foszfatázok. Több tanulmány is kimutatta, hogy a PP2A foszfatázok szabályozzák az intracelluláris és extracelluláris ROS jelek által kiváltott anyagcsere változásokat és sejtihalált. A különböző PP2A alegységek – feltehetően eltérő PP2A holoenzim komplex formájában – a stresszválaszok pozitív és negatív szabályozását egyaránt közvetítik, lehetővé téve a válaszreakciók finomhangolását a különféle biotikus és abiotikus kihívások során, megőrizve élettani stabilitásukat és optimális fejlődésüket (Rahikainen *et al.*, 2016; Máthé *et al.*, 2019; Bheri *et al.*, 2021).

A kutatás fő célja annak vizsgálata, hogy az egyes PP2A alegységek milyen szerepet töltenek be a reaktív oxigénformák (ROS) jelátvitelében a

sejtciklus szabályozásával összefüggésben növényekben. Ehhez vad-típusú, illetve a PP2A mutáns (*c3c4*, *fass-5*, *fass-15*) *Arabidopsis thaliana* növényeket a ROS termelést serkentő diquat (DQ) gyomirtó szerrel kezeltük, mely megfelelő redox potenciál esetén elektronfelvevőként működik, így elektronokat von el a fotoszintetikus elektrontranszport rendszertől, versenyezve a természetes elektronfelvevőkkel (Jones & Vale, 2000). A protein foszfatáz mutánsok oxidatív stresszt kiváltó DQ-val történő kezelése lehetővé teszi a protein foszfatázok (PP2A) és a reaktív oxigénformák (ROS) közötti kapcsolatok vizsgálatát a mitózis során az *Arabidopsis thaliana* gyökérszucs merisztéma sejtjeiben.

Fő hipotézisünk szerint a PP2A gátlása és a sejten belüli ROS szint emelkedése károsan befolyásolja a sejtosztódást, mivel a stresszválasz – amelyet általában protein foszfatázok szabályoznak – nem működik megfelelően. Feltételezésünk szerint ez (i) a mitotikus aktivitás csökkenését, (ii) a foszforilált hiszton H3 szintjének növekedését eredményezi a mitózis során, (iii) a foszfatáz aktivitás csökkenése következtében. Az így kapott eredmények alátámaszthatják a PP2A enzim kiemelt szerepét az oxidatív stresszválasz és a sejtosztódás szabályozásában.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a vizsgált PP2A funkcióvesztéses mutánsok érzékenyebbek a DQ kezelésre és az általa kiváltott megnövekedett intracelluláris ROS szintre (Freytag *et al.*, 2023), genotípus-függő módon eltérő válaszreakciókat detektáltunk az oxidatív stressz hatására. A DQ kezelés következtében sejthalál jeleit (apoptózis) detektáltuk, például nukleáris „blebbing” (vagy sejtmag lebenyesezés) és/vagy fokozott kromatin kondenzációt. A vad-típusban gyakori volt a nukleáris „blebbing” megjelenése erőteljes mitotikus aktivitásbeli gátlással, de mitotikus blokkot nem idézett elő a herbicid. A *fass-5* HZ esetében fokozott kromatin kondenzációt tapasztaltunk az oxidatív stressz hatására. A B” regulátor aleggység mutánsokban a DQ mitotikus blokkokat okozott a korai fázisban és erőteljesen csökkentette a mitotikus aktivitást is. A diquat által kiváltott sejtosztódási blokkok feltehetően a megnövekedett intracelluláris ROS szint következményei, amelyek a G2/M ellenőrző pontnál állítják meg a sejtciklust, különösen akkor, ha a PP2A működése sérült, így nem tudja biztosítani a sejtosztódás zavartalan lezajlását (Reichheld *et al.*, 1999; Considine & Foyer, 2021). Ezek a megfigyelések azonban nem köthetők közvetlenül a hiszton H3 foszforiláció szabályozásához, sokkal inkább általános oxidatív stresszválaszként értelmezhetők a megnövekedett ROS szintre, ahol az enzimikus védekező mechanizmusok szintén igen aktívak (Freytag *et al.*, 2023). A DQ nem változtatott a PP2A aktivitásán, azonban a mutáció által erősebb fenotipikus elváltozást mutató növények esetében (*fass-5* HZ és *c3c4*) a PP1 aktivitása csökkent. Várakozásainkkal ellentétben az oxidatív stressz és a PP2A működésének zavara különféle sejtszintű hatásokat eredményezett, amelyek alapján inkább közvetett kapcsolat feltételezhető a PP2A és a ROS indukálta hiszton H3 foszforiláció között. Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a PP2A holoenzim – valószínűleg a PP1-gyel való kölcsönhatáson keresztül – közvetett módon járul hozzá a sejtciklus megfelelő szabályozásához oxidatív stresszhelyzetekben.

11.3. Az értekezés témájában született publikációk

Az értekezés alapját képző idegen nyelvű közlemények nemzetközi folyóiratban:

1. **Kelemen A.**, Kónya Z., Ujlaky-Nagy L., Garda T., Erdődi F., Freytag C., Juhász G.P., Pasternak T.P., Riba M., Máthé C. *Fass and C3/C4 contribute to the activities and levels of the protein phosphatase 2A catalytic subunit pool and regulate mitotic events in Arabidopsis*. (2025) *Plant Physiology and Biochemistry*, 227: 110187
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.110187>

Impakt faktor: 5,7

2. **Kelemen A.**, Uyttewaal M., Máthé C., Andrey P, Bouchez D., Pastuglia M. *Semiautomatic quantification of 3D Histone H3 phosphorylation signals during cell division in Arabidopsis root meristems*. (2025) *New Phytologist*, 247: 3010-3023
<https://doi.org/10.1111/nph.70365>

Impakt faktor: 8,1

3. **Kelemen A.**, Garda T., Kónya Z., Erdődi F., Ujlaky-Nagy L., Juhász G.P., Freytag C., M-Hamvas M., Máthé C. *Treatments with diquat reveal the relationship between protein phosphatases (PP2A) and oxidative stress during mitosis in Arabidopsis thaliana root meristems*. (2024) *Plants*, 13(14): 1896
<https://doi.org/10.3390/plants13141896>

Impakt faktor: 4,1

Egyéb idegen nyelvű közlemények társszerzője nemzetközi folyóiratban:

1. Garda T., Juhász G.P., **Kelemen A.**, Mathur J., Ujlaky-Nagy L., Freytag C., M-Hamvas M., Riba M., Máthé C. *Long-term treatments with microcystin-LR and diquat reveal their differences in the induction of oxidative stress responses and mitotic alterations in terms of stress recovery in Arabidopsis roots*. (2025) *Environmental Pollution*, 382: 126748;
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2025.126748>
2. Máthé C., Freytag C., **Kelemen A.**, M-Hamvas M., Garda T. *“B” regulatory subunits of PP2A: their roles in plant development and stress reactions*. (2023) *Int. J. Mol. Sci.* 24(6): 5147
<https://doi.org/10.3390/ijms24065147>
3. Freytag C., Garda T., Kónya Z., M-Hamvas M., Tóth-Váradly B., Juhász G.P., Ujlaky-Nagy L., **Kelemen A.**, Vasas G., Máthé C. *B” and C subunits of PP2A regulate the levels of reactive oxygen species and superoxide dismutase activities in Arabidopsis*. (2023) *Plant Physiology and Biochemistry*, 195: 182-192
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.031>

4. Freytag C., Máthé C., Rigó G., Nodzyński T., Kónya Z., Erdődi F., Cséplő Á., Pózer E., Szabados L., **Kelemen A.**, Vasas G., Garda T. *Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin affects root development by changing levels of PIN proteins and auxin response in Arabidopsis roots.* (2021) *Chemosphere*, 276: 130183
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130183>

Az értekezés témakörében elhangzott magyar és idegen nyelvű konferencia előadások:

1. Máthé C., Kónya Z., Erdődi F., **Kelemen A.**, Garda T., M-Hamvas M., Juhász G.P., Freytag C. *The roles of PP2A subunits Foss and C3/C4 in the regulation of mitosis and oxidative stress responses in Arabidopsis – studies with phosphatase mutants and inhibitors.* (2025) *Plant Biology Europe*, Budapest, Magyarország; 2025. 06. 25 – 28.
2. Máthé C., Garda T., Freytag C., **Kelemen A.**, Juhász G.P., M-Hamvas M. *A protein foszfatázok szerepe a növényi sejt szubcelluláris dinamikájában.* (2024) 24. Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, Románia; 2024. 04. 19 – 20.
3. **Kelemen A.**, Garda T., Freytag C., Máthé C. *A reverzibilis hiszton H3 foszforiláció szerepe a sejtosztódás szabályozásában Arabidopsis thaliana gyökércsúcs merisztéma sejtekben.* (2023) 26. Tavaszi Szél Konferencia, Miskolc, Magyarország; 2023. 05. 05 – 07. (második helyezett pályamunka)
4. **Kelemen A.**, Bouchez D., Pastuglia M., Máthé C. *3D analysis of the histone H3 fluorescent signals: Application to the study of histone reversible phosphorylation during cell division in Arabidopsis root meristems.* (2023) RMS Botanical Microscopy Meeting, Norwich, UK; 2023. 04. 02 – 06.
5. **Kelemen A.**, Bouchez D., Pastuglia M., Garda T., Freytag C., Máthé C. *A reverzibilis hiszton foszforiláció vizsgálata 3D fluoreszcens szignál analízis segítségével az osztódó Arabidopsis thaliana gyökércsúcs sejtjeiben.* (2023) 23. Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, Románia; 2023. 03. 31 – 04. 01.
6. Máthé C., M-Hamvas M., Garda T., Freytag C., **Kelemen A.**, Juhász G.P., Pózer E., Riba M. *Amikor a sejtbiológia és a környezeti toxikológia találkozik: a mikro-cisztin-LR, egy cianobakteriális toxin hatásai modell- és vizenövényekben.* (2023) 23. Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, Románia; 2023. 03. 31 – 04. 01.
7. Máthé C., **Kelemen A.**, Freytag C., Kónya Z., Ujlaky-Nagy L., Pastuglia M. *The regulation of mitosis by the protein phosphatases PP2A and PPI in the Arabidopsis root apical meristem.* (2022) 8th International Symposium on Structure and Function of Roots, Horný Smokovec, Magastátra, Szlovákia; 2022. 06. 12 – 16.
8. **Kelemen A.**, Garda T., Freytag C., Máthé C., Ujlaky-Nagy L., Pastuglia M. *The role of the PP2A in the regulation of cell division in Arabidopsis root meristems.*

- (2022) Society's Lecture Series for Young Plant Biologists (FIANÖVELŐ), ZOOM Platform, Magyarország; 2022. 02. 25.
9. Máthé C., Garda T., **Kelemen A.**, Kónya Z., Ujlaky-Nagy L., Pastuglia M., Erdődi F. *Mitotic responses of Arabidopsis PP2A mutants reveal the roles of both regulatory and catalytic subunits in the regulation of cell division.* (2021) XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország; 2021. 08. 24 – 27.
 10. Garda T., Máthé C., Freytag C., **Kelemen A.**, Erdődi F., Kónya Z. *A foszforilált hiszton H3 és H2Ax vizsgálata PP2A mutáns Arabidopsis thaliana növényekben.* (2021) XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország; 2021. 08. 24 – 27.
 11. Máthé C., Garda T., Freytag C., M-Hamvas M., **Kelemen A.**, Kónya Z., Erdődi F. *Effects of serine-threonine protein phosphatase inhibition and ROS induction on mitotic activity, cytoskeletal and chromatin organization in model higher plants.* (2019) RMS Botanical Microscopy Meeting, Oxford, UK; 2019. 04. 14 – 18.
 12. **Kelemen A.** *A protein foszfatáz gátlás és az oxidatív stressz citológiai hatásai Arabidopsis thaliana gyökércsúcs merisztéma sejtekben.* (2019) 34. OTDK Konferencia, Budapest, Magyarország; 2019. 04. 15 – 17. (harmadik helyezett pályamunka)

Az értekezés témakörében bemutatott magyar és idegen nyelvű poszterek:

1. **Kelemen A.**, Garda T., Freytag C., Máthé C., Bouchez D., Pastuglia M. *Role of the TTP complex in the reversible histone H3 phosphorylation during mitosis in Arabidopsis thaliana root meristems.* (2024) Science for Life Conference, Utrecht, Hollandia; 2024. 12. 02.
2. **Kelemen A.**, Bouchez D., Pastuglia M., Máthé C., Garda T., Freytag C. *Application of 3D fluorescent histone signal analysis to investigate the role of its reversible phosphorylation during mitosis in Arabidopsis root meristems.* (2023) 13th EMBO Young Scientists' Forum, Lisszabon, Portugália; 2023. 10. 12 – 13.
3. Máthé C., Kónya Z., **Kelemen A.**, Garda T., M-Hamvas M., Juhász G.P., Freytag C. *New insights into the roles of PP2A subunits FASS and C3/C4 in the regulation of mitosis and oxidative stress responses in Arabidopsis.* (2023) RMS Botanical Microscopy Meeting, Norwich, UK; 2024. 04. 02 – 06.
4. **Kelemen A.**, Garda T., Ujlaky-Nagy L., Máthé C., Freytag C. *A protein foszfatáz gátlás rövid- illetve hosszútávú hatásai az Arabidopsis gyökércsúcsok mitotikus aktivitására.* (2021) XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország; 2021. 08. 24 – 27.

Tudományos teljesítményemhez kapcsolódó egyéb magyar és idegen nyelvű előadások és poszterek jegyzéke:

1. Máthé C., Freytag C., **Kelemen A.**, Garda T., M-Hamvas M. *Hogyan befolyásolják az Arabidopsis PP2A protein foszfatáz C3-C4 és Fass alegységei a ROS szintet és az antioxidáns enzimaktivitásokat- rövid- és hosszú távon?* (2025) A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság XIII. Kongresszusa, Debrecen, Magyarország; 2025. 08. 28 – 29.
2. Máthé C., Garda T., **Kelemen A.**, Juhász G.P., Freytag C., M-Hamvas M. *Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin is inducing biotic stress and serves as a tool in plant cell biology research.* (2024) VISCEA Plant Biotic Stresses & Resistance Mechanisms V, Bécs, Ausztria; 2024. 02. 05 – 06.
3. Máthé C., Freytag C., Garda T., **Kelemen A.**, Juhász G.P., M-Hamvas M. *A PP2A protein foszfatáz speciális alegységeinek szerepe az oxidatív stresszválaszok szabályozásában Arabidopsis csiranövényekben.* (2023) A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság XII. Kongresszusa, Martonvásár, Magyarország; 2023. 08. 24 – 25.
4. Freytag C., Juhász G.P., Máthé C., **Kelemen A.**, M-Hamvas M. *SOD izoformák aktivitása Arabidopsis thaliana protein foszfatáz 2A, C és B” alegység mutánsok gyökereiben.* (2023) A Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság XII. Kongresszusa, Martonvásár, Magyarország; 2023. 08. 24 – 25.
5. **Kelemen A.**, Máthé C., Garda T., Beyer D., M-Hamvas M., Freytag C., Erdődi F., Kónya Z., Riba M. *Cyanotoxin induced microtubular alterations that affect the development of plant roots.* (2023) European Plant Cytoskeletal Club (EPCC), Halle (Saale), Németország; 2023. 06. 29 – 30.
6. Freytag C., Máthé C., Rigó G., Nodzyński T., Kónya Z., Erdődi F., Cséplő Á., Pózer E., Szabados L., **Kelemen A.**, Vasas G., Garda T. *A Microcystin-LR cianobakteriális toxin képes megváltoztatni a gyökér fejlődését a PIN fehérjék és az auxin szint megváltoztatásával Arabidopsis gyökérben.* (2021) XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország; 2021. 08. 24 – 27.
7. Tóth-Várady B., Máthé C., Freytag C., M-Hamvas M., Garda T., Kónya Z., Juhász G.P., **Kelemen A.**, Pózer E. *Az oxidatív stressz eliminálását elősegítő enzimek vizsgálata Arabidopsis thaliana vad típusban és protein foszfatáz mutánsokban.* (2021) XIII. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, Magyarország; 2021. 08. 24 – 27.