



1949

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

Egyetemi doktori (PhD) értekezés

Freytag Csongor

témavezető:

Prof. Dr. Máthé Csaba

Debreceni Egyetem

Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2023

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

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

Debrecen, 20.

.....

a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Freytag Csongor doktorjelölt 2018- 2022. 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 javaslom.

Debrecen, 20.

.....

a témavezető aláírása

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

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

Írta: Freytag Csongor 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:

tagok:

Dr.
Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20...

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés	1
2	Irodalmi áttekintés	2
2.1	Protein-foszfatazok a növényekben	2
2.1.1	A protein-foszfatazok csoportosítása	3
2.1.2	PP1 felépítése és funkciói növényekben	5
2.1.3	PP2A felépítése és funkciói növényekben	5
2.2	Az auxin-transzport szabályozása	8
2.3	ROS keletkezése és biológiai semlegesítése	14
2.3.1	SOD szerepe, formái és szabályozása	16
2.3.2	A H2AX szerepe növényekben	17
2.3.3	A PP2A szerepe az oxidatív stressz útvonalakban	17
2.4	A Mikrocisztin-LR hatásairól.....	20
2.5	A diquat hatásairól	23
3	Célkitűzések.....	24
4	Anyag és módszer.....	25
4.1	Növények és kezelésük	25
4.1.1	Vizsgált növények és mutánsaik	25
4.1.2	Nevelési körülmények.....	26
4.1.3	A Mikrocisztin-LR tisztítása	26
4.1.4	Kezelési koncentrációk megválasztása	27
4.2	Mikroszkópos és Western-blot módszerek.	28
4.2.1	Élő sejtek vizsgálata a GFP szignál detektálása révén	28
4.2.2	PIN immunjelölés.....	28
4.2.3	γ H2AX immunjelölés.....	29
4.2.4	γ H2Ax Western blot	31

4.2.5	ROS kimutatása.....	32
4.3	Növekedési és gravistimulációs vizsgálatok.....	33
4.4	SOD aktivitás gél „Native PAGE”-n	35
4.5	Protein-foszfataz aktivitás vizsgálata	36
4.6	Statisztikai módszerek.....	37
5	Eredmények	38
5.1	MCY-LR hatása az auxin eloszlásra	38
5.1.1	PIN1 és PIN2 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatai	38
5.1.2	PIN3 és PIN7 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatai	42
5.1.3	DR5rev:GFP riporter mikroszkópos vizsgálata.....	45
5.1.4	Gravistimuláció és növekedési vizsgálatok.....	48
5.1.5	A MCY-LR hatása a ROS termelésre és a protein-foszfataz aktivitásra a Col-0 gyökerekben	50
5.1.6	A MCY-LR hatása az oldalgökök megjelenésére ...	51
5.2	PP2AB” és C alegység szerepe az oxidatív stressz során ..	52
5.2.1	A szuperoxid-dizmutáz (SOD) izoenzimek aktivitása .	55
5.2.2	Foszforilált γ H2AX szintjének változása IHC és Western blot alapján.....	60
5.2.3	PP2A aktivitása foszfataz mutánsokban.....	63
6	Diszkusszió.....	65
6.1	Mikrocisztin-LR befolyásolja a PIN fehérjék lokalizációját és az auxin szinteket <i>Arabidopsis thaliana</i> gyökerében.....	65
6.1.1	Mi a következménye ezeknek a változásoknak a gyökérfejlődésre nézve?	66
6.2	A PP2AC3 és C4 valamint a B” alegységek lehetséges szerepei a növényi stresszválaszban	69

6.2.1	A PP2AB” és C3-C4 alegységei befolyásolják a ROS szinteket és azok SOD általi semlegesítését	71
6.2.2	Záró megállapítások és következtetések	76
7	További tervek	78
8	Összefoglaló	79
9	Summary.....	82
10	Köszönetnyilvánítás.....	86
11	Irodalomjegyzék	88

Rövidítések:

32P-MLC20	myosine light chain (foszfor 32-es izotópjával jelölt, 20 kDa miozin könnyű lánc)
ABA	abszcezinsav
AGC VIIIa	AGC VIIIa Serine/Threonine Kinase gene family (cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C)(protein-kináz család)
AIOD	Area Integrated Optical Density (terület integrált optikai denzitás)
ANOVA	analysis of variance (varianciaanalízis)
APX	L-ascorbate peroxidase (L-aszorbát-peroxidáz)
ARF-GEF	ADP-ribosylation factors (ARF)–guanine-nucleotide exchange factor
ATM/ATR	Serine-threonine protein-kinase ATM/ATR and RAD3-related (foszfatidil-inozitol-3-kináz család)
AUX1/LAX	AUXIN1/LIKE-AUX1 (auxin influx protein komplex)
BSA	bovine serum albumin (szarvasmarha szérum albumin)
BCA	bicinchoninic acid (bicinkoninsav)
C/LSM	confocal laser scanning microscopy (konfokális/lézeres pásztázó mikroszkópia)
C3-C4	PP2AC3 és PP2AC4 katalitikus alegységek
c3c4	PP2AC katalitikus alegység kettős mutáns
CaMKII	Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (Ca ²⁺ /kalmodulinfüggő protein-kináz)
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (ciklikus adenzin-monofoszfát)
CAT	catalase (kataláz)
CCV	clatrin coated vesicle (klatrin-bevonatú vezikulák)
CDPK	calcium-dependent protein kinases (kálciumfüggő protein-kinázok)
cGMP	cyclic guanidine monophosphate (ciklikus guanidin-monofoszfát)
CPR5	CONSTITUTIVE EXPRESSION OF PR GENES5
CRK5	cysteine-rich receptor-like kinase 5 (ciszteinben gazdag receptor-szerű kináz)

Cu/Zn-SOD	copper zinc superoxide d ismutase (szuperoxid-dizmutáz réz- és cink-iont tartalmazó izoformája)
D6PK	D6 protein kinase (protein-kináz)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DCFH-DA	dikloro-dihidro-fluoreszcein diacetát
DMSO	dimetil-szulfoxid
DR5rev:GFP	auxin-responsive DR5 promoter (auxin- indukált génextpresszió riporter génje)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav, két- és háromértékű fémion-kelátor
EGTA	trietilén-glikol-diamin-tetraecetsav, kalcium- ion-kelátor
FCP/SCP	FCP (TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD p hosphatase) és SCP (small CTD p hosphatase) (aszpartát függő foszfatázok)
Fe-SOD	iron superoxide d ismutase szuperoxid- dizmutáz vas-iont tartalmazó izoformája
GFP	g reen f luorescent p rotein (zöld fluoreszcens protein)
GNOM	ARF guanine-nucleotide exchange factor GNOM, GDP/GTP cserefaktor, az ADP riboszilációs faktor (RAF) osztályba tartozó kis G-fehérje
GR	g lutathione r eductase (glutation-reduktáz)
GSH	reduced glutathione redukált glutation
GST	g lutathione S -transferase (glutation-S- transzferáz)
GTP-GDP	guanozin-trifoszfát guanozin-difoszfát cserefaktor
H2AX	histone 2 A X variant (hiszton H2A fehérje változat)
HPLC	nagynyomású folyadékkromatográfia
IAA	indol-ecetsav
IGEPAL	nem-ionos detergens
LED	fény-elektromos dióda
MAPK	m itogen- a ctivated p rotein k inase (mitogén- aktivált protein-kinázok)
MCY-LR	Mikrocisztin-LR
MES	2-morfolino-etánszulfonsav puffer

Mn-SOD	manganase superoxide dismutase (szuperoxid-dizmutáz mangán-iont tartalmazó izoformája)
MTSB	mikrotubulus stabilizáló puffer
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát)
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis technika
PBS	NaCl tartalmú foszfát puffer
PCV/MVB	prevacuolar compartment/multivesicular bodies (prevakuoláris kompartment/multivezikuláris test)
PFA	paraformaldehid
PIN 1 2 3 4 7	Protein PIN-FORMED (auxin efflux transzmembrán fehérje izoformái)
PID	PINOID (szerin-treonin foszfatáz, az auxin efflux pozitív szabályozója)
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid, egy szerin- proteáz inhibitor
POD	peroxidase (peroxidáz)
PP1 PP2A PP2B (avagy calcineurin) PP2C PP4, PP5, PP6 PP7	serine/treonin protein-phosphatase (szerin/treonin protein-foszfatáz izoformái)
PPM	fémion-függő foszfatázok
PPP	foszfoprotein-foszfatázok
PR	pathogen reaction (patogén reakció)
PrxR	peroxiredoxin (peroxiredoxinok)
PSI-II	fotokémiai rendszer 1 és 2
PVP	poli-vinil-pirrolidon
RBOH	respiratory burst oxidase homolog proteins (NADPH-oxidáz homológok)
RCNI	ROOTS CURL IN NAPHTHYLPHTHALAMIC ACID 1 (PP2AA alegységét kódoló egyik gén)
ROS	reactive oxygen species (reaktív oxigénformák)
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SOD	superoxide dismutase (szuperoxid-dizmutáz)
TEMED	tetrametil-etilén-diamin
ton2/fass	TONNEAU 2 (PP2AB” szabályozó alegység mutáns)

WAG1, 2	Serine-threonine protein-kinase WAG1, 2 (protein-kináz, amely szerepet játszik a poláris auxin-transzportban)
WAV3	WAVY GROWTH 3
WAVH	WAV3 HOMOLOG

1 Bevezetés

A klímaváltozás korunk nagy kihívásai közé tartozik, különösen a mezőgazdaság számára. A klímaváltozás nemcsak gazdasági, hanem egészségügyi kockázatot is hordoz. Az emelkedő évi átlag középhőmérséklet és a vizek nitrogén terhelése egyre gyakrabban vezetnek állóvizeinkben toxikus cianobakteriális vízvirágzáshoz (O’Neil *et al.*, 2012). A Mikrocisztin-LR (MCY-LR) az egyik leggyakoribb ilyen heptapeptid toxin, amelyet főként édesvízi cianobaktériumok termelnek. Erősen gátolja a szerin/treonin protein-foszfataz 2A-t és 1-et (PP2A és PP1) (MacKintosh *et al.*, 1990). Emellett a MCY-LR fontos tulajdonságának tartják, hogy képes oxidatív stresszfolyamatokat indukálni (Máthé *et al.*, 2019).

A disszertációs munkám során vizsgáltuk a MCY-LR káros hatásait a gyökér fejlődésére *Arabidopsis thaliana* csíranövényekben. Feltártuk, hogy a MCY-LR zavart okoz a PIN eloszlásban és az auxin-válaszban, a protein-foszfataz gátlása révén. Az auxin efflux Protein PIN-FORMED (PIN) fehérjecsaldjának működése kulcsfontosságú a növényi ontogenezis szempontjából, és funkciójuk reverzibilis foszforilációjuktól függ (Zwiewka *et al.*, 2019) A PIN-ek defoszforilációjában a PP2AC3 és C4 protein-foszfatazoknak van jelentős szerepe (Ballesteros *et al.*, 2013).

A PP2AC3 és C4 katalitikus továbbá a B” szabályozó alegységekről ismert, hogy fontos szubcelluláris események szabályozói a növények fejlődése során, de a reaktív oxigénformák (ROS) szintjeinek szabályozásában és/vagy a semlegesítésben betöltött szerepükről jóval kevesebbet tudunk (Durian *et al.*, 2020; Máthé *et al.*, 2023).

Igyekeztünk újszerű betekintést adni a PP2AB” és C alegységek szerepébe, a növényi oxidatív stressz-válasz során. Továbbá vizsgáltuk a PP2A szabályozó szerepét a kettősszálú DNS törés jelzőmolekula, a H2AX hiszton foszforilációs állapotában.

2 Irodalmi áttekintés

Ebben a fejezetben bemutatom a protein-foszfatazok legfontosabb jellemzőit, felépítésüket és csoportosításukat, különös tekintettel az általunk vizsgált alegységekre. A fejezet további 2 alfejezetében a dolgozat alapjául szolgáló két publikáció szakirodalmi előzményeit mutatom be. A 2.2 alfejezetben részletezem a PIN-ek funkcióját a poláris auxin-transzportban, továbbá a foszforiláció szerepét a PIN fehérjék működésében. A 2.3 alfejezetben a ROS-ok keletkezéséről, eliminációjukról (elsősorban szuperoxid-dizmutáz által (SOD)) és a ROS okozta egyik jellemző molekuláris „tünetről” a DNS kettős törésről lesz szó, valamint vizsgáljuk a foszforiláció lehetséges szerepeit az oxidációs stressz folyamatok során.

2.1 Protein-foszfatazok a növényekben

Egy fehérje vagy enzim megjelenését és működését a poszttranszlációs módosítások befolyásolja és/vagy szabályozza, utóbbi egy része már a fehérje *folding* során megvalósul, míg mások egy jelátvitel útvonal részeként megvalósuló szabályozási formák.

Az egyik ilyen poszttranszlációs szabályozási forma a protein foszforiláció és defoszforiláció, amely gyakran egyfajta „ki-be” kapcsolóként szolgál (Luan, 2003; Smith & Walker, 1996). Az *Arabidopsis thaliana* genom egy jelentős része kódol kinázokat és foszfatazokat, ezek az enzimek katalizálják a reverzibilis foszforilációt. Az optimális szabályozás érdekében ezeknek a kinázoknak és foszfatazoknak tökéletes összhangban kell működniük minden egyes sejtben (Luan, 2003).

A reverzibilis foszforiláció jelentőségét az is jól bizonyítja, hogy az eukarióta sejtek fehérjéinek legalább egyharmada foszforilálható és a foszforiláció módosítja ezen fehérjék szerkezetét és funkcióját. Például *Arabidopsis thaliana*-ban 86,4 %-ban szerin (Ser), 11,2 %-ban treonin (Thr),

1,8 %-ban pedig tirozin (Tyr) oldalláncon foszforilálódnak (Sugiyama *et al.*, 2008; Nakagami *et al.*, 2010)

A reverzibilis fehérje foszforilációnak számos kulcsfontosságú anyagcsere- sejtfolymat szabályozásában van szerepe, ide tartozik az anyagcsere, a sejtciklus kontrollálása, az iontranszport, a fejlődés szabályozása és a stresszreakciók (Luan, 2003). A sejtfunkciók e sokféle spektrumát tükrözi növényekben a reverzibilis foszforiláció függő intracelluláris fehérjék nagy száma (*Arabidopsis thaliana*-ban kb.: ~10800 foszfoprotein ismert PhosPhAt v4.0), valamint a reakciókat katalizáló protein-kinázok és foszfatázok száma (~28 foszfatáz ~350 kináz PhosPhAt v4.0)(“PhosPhAt 4.0 - Entry Statistics,” <https://phosphat.uni-hohenheim.de/statistics.html> 2023-07-26).

Az *Arabidopsis thaliana* genomszekvenálási projektek közelmúltbeli befejezése lehetővé tette az összes feltételezett Ser-Thr foszfatázt kódoló gén azonosítását. A genomszekvenálási projektekkel kapcsolatos vizsgálatok és néhány további, genomra kiterjedő felmérés feltárta a Ser-Thr foszfatázokkal kapcsolatos fehérjéket. Ezek közül legalább 7 gén a PP1 katalitikus alegységeket, 6 gén a PP2A katalitikus alegységeket, 70 gén a PP2C-t, és körülbelül egy tucat egyéb foszfatáz génje, amelyek a PP4-t, PP5-t, PP6-t és PP7-t kódolják (Luan, 2003).

Disszertációm a PP2A és B” alegység szerepére és közvetve a PP1, valamint a CRK5 (ciszteinben gazdag receptor-szerű kináz) vizsgálatára terjed ki.

2.1.1 A protein-foszfatázok csoportosítása

A szubsztrátspecifitás szerint a protein-kinázokat és foszfatázokat két nagy csoportba sorolják aszerint, hogy melyik aminosav oldalláncot foszforilálják. Az érintett aminosavak a Ser-Thr és a tirozin az állatokban, ugyanakkor növényekben jellemzőbb a tirozin helyett a hisztidin. A protein-foszfatázokat legalább három különálló családba lehet besorolni (Luan, 2003).

A foszfatázok 3 fő családja a katalizált reakció mechanizmusa, valamint a résztvevő enzimek térszerkezete alapján (Shi, 2009) a következő: foszfoprotein-foszfatázok (PPP), fémion-függő foszfatázok (PPM) és aszpartát-függő foszfatázok (FCP/SCP) (Shi, 2009).

A PPPk szerin és treonin aminosav oldalláncokat defoszforilálnak. Jellemző családokra vagy csoportokra oszthatóak: PP1, PP2A, PP2B (avagy calcineurin) PP4, PP5, PP6 és PP7. A PP2 enzimek tovább oszthatók PP2A, 2B és 2C enzimekre, a kétértékű kationoktól való függésük alapján. Ca^{2+} illetve Mg^{2+} szabályozza a PP2B-t és a PP2C-t, ezzel szemben a PP2A-nak - hasonlóan a PP1-hez - nincs szüksége kétértékű kationok jelenlétére az aktivitáshoz. A PP1- és PP2A-típusú enzimek tagjainak megkülönböztetésében az okadainsav, a kalikulin A és a kantaridin hasznosak. Például mind az okadainsav, mind a kaliculin A erősen gátolja a PP1 és PP2A aktivitását, de nem hatékony a PP2B és PP2C esetében. A kantaridin csak a PP2A-t gátolja, másokat nem (Li & Casida, 1992; Luan, 2003). A MCY-LR a szerin-treonin protein-foszfatázok PP1 és PP2A, valamint a PP4, PP5 és PP6 kisebb foszfatázok erős inhibitora. (Fontanillo & Köhn, 2018; MacKintosh et al., 1990; Máthé et al., 2016).

A PPM fő tagja a $\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -függő PP2C és a piruvát-dehidrogenáz foszfatáz (Shi, 2009). Növényekben sokféle PP2C található, ez adja a PP repertoárjának több mint felét. Szerepük elsősorban a ROS szignalizáció során, a biotikus és abiotikus stressz-reakciókban van (Jiang *et al.*, 2018).

A PPP-vel ellentétben a PPM család tagjai nem rendelkeznek szabályozó alegységekkel, hanem egyetlen fehérje több funkcionális domént és konzervált szekvencia-motívumokat tartalmaz, amelyek segíthetnek meghatározni a szubsztrát-specifitást. Mind a PPP, mind a PPM esetében a fémionok katalitikus és központi szerepet játszanak a defoszforilációs reakcióban (Máthé *et al.*, 2019). Ezzel szemben az FCP/SCP aszpartát alapú

katalitikus mechanizmust használ, szerepe valószínűleg az RNS polimeráz II szabályozásában van (Uhrig *et al.*, 2013).

Még ugyanazon a családon belül is jelentős szerkezeti diverzitást generálhat az egyedi szabályozó és célzó domének jelenléte vagy szabályozó alegységek kapcsolódása a katalitikus alegységekhez. Ezek a szabályozó domének vagy szabályozó alegységek lokalizálhatják a fehérjekomplexeket egy specifikus szubcelluláris kompartmentben, módosíthatják a szubsztrát specifitását vagy megváltoztathatják a katalitikus aktivitást (Luan, 2003; Shi, 2009). Mindezek a tények azt mutatják, hogy a foszforiláció egyike azon biokémiai tényezőknek, amelyek integrálják a sok egyidejű eseményt egy eukarióta sejtben (Máthé *et al.*, 2021).

2.1.2 PP1 felépítése és funkciói növényekben

A PP1 a nem-fémfüggő szerin-treonin protein-foszfatazok PPP (foszfoprotein-foszfataz) családjába tartozik (Farkas *et al.*, 2007).

A PP1 kiemelkedő szerepet játszik a sejt folyamatok széles körében, úgymint a meiózis és a mitotikus sejtosztódás, az apoptózis, a fehérjeszintézis, az anyagcsere, a citoskeletonális átrendeződés, valamint a membránreceptorok és csatornák szabályozása (Ceulemans & Bollen, 2004). Két alegységből áll, egy katalitikus és egy specifikus szabályozó alegységből (R alegység) (Shi, 2009). A katalitikus alegység aktív része erősen konzervált az egész PPP családban (Shi, 2009).

2.1.3 PP2A felépítése és funkciói növényekben

A PP2A a nem-fémfüggő szerin-treonin protein-foszfatazok PPP (foszfoprotein-foszfataz) családjába tartozik. Univerzálisak az eukariótákban, és a PP2A a legnagyobb mennyiségben előforduló protein-foszfataz (Shi, 2009; Virshup & Shenolikar, 2009).

Arabidopsis thaliana-ban a PP2A katalitikus alegységnek öt izoformája van (Farkas *et al.*, 2007; Uhrig *et al.*, 2013).

A PP2A fehérjekomplex (holoenzim) egy heterotrimer fehérje. A holoenzim tagjai: az enzim vázát az A alegység (PP2AA, *Arabidopsis thaliana*-ban 3 izoforma létezik kb 65 kDa molekulatömeeggel) adja, a katalitikus C alegység (PP2AC, 5 féle izoforma, kb. 26 kDa), valamint a variábilis B szabályozó alegység (PP2AB, 17 izoformája ismert) (Farkas *et al.*, 2007; Uhrig *et al.*, 2013) (1. ábra).

Számos tanulmány azonosította *Arabidopsis thaliana*-ban a PP2AA1 alegységet [ROOTS CURL IN NAPHTHYLPHTHALAMIC ACID 1 (RCN1)] és többféle B alegységet, amelyek a gyökér növekedése során a stresszreakciók szabályozó szereplői (Blakeslee *et al.*, 2007; Uhrig *et al.*, 2013).

Az *RCN1* gén a PP2A 65 kDa-os A alegységét kódolja (Garbers *et al.*, 1996). Az *RCN1* gén mutációja *Arabidopsis thaliana*-ban zavart okoz a gravitropizmusban és a hipokotil kampó kialakulásában. Ezenkívül az *rcn1* mutáns auxin-transzportja érzékenyebb a poláris transzportot gátló naftilftálaminsavra (Garbers *et al.*, 1996). A további elemzések összefüggésbe hozták az *RCN1* gén mutációját az *rcn1* mutáns fehérjekivonatában a PP2A aktivitás csökkenésével és a differenciális sejtmegnyúlás hibájával is (Deruère *et al.*, 1999). Ezenkívül úgy tűnik, hogy a gravitációs válasz és a bazipetális auxin-transzport megváltozik az *rcn1* mutánsban (Rashotte *et al.*, 2001). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PP2A szerepet játszik az auxin-transzport szabályozásában.

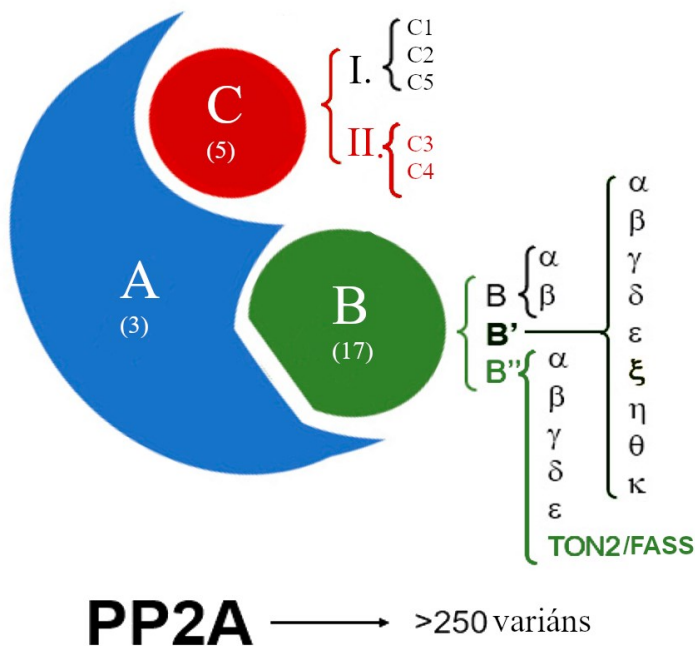
Ahogy más eukariótákban is, a növényi B alegységek is tovább oszthatóak alcsoportokra: B, B' és B'', melyek molekulatömege széles tartományban mozog (54-130 kDa) (Farkas *et al.*, 2007; Shi, 2009) (1. ábra). Az egyik legismertebb ilyen fehérje a TONNEAU 2 (TON/FASS) az *Arabidopsis thaliana*-ban, ez a B'' alegység alapvető szerepet játszik a mikrotubulus organizációban mind a mitotikus, mind a nem mitotikus sejtek

esetében (Camilleri *et al.*, 2002; Spinner *et al.*, 2013). A B alegység felelős a PP2A komplex pontos lokalizálásáért és funkcióiért, továbbá azt is szabályozza a katalitikus aktivitás módosítása révén, hogy mely foszforilációs helyek defoszforilálódnak és melyek maradjanak érintetlenek egy célfehérjén, ha annak több szerin-treonin foszforilációs helye is van (Virshup & Shenolikar, 2009).

Ezeknek az alegységeknek számos funkciója ismert, de a ROS jelzésekben való részvételükről egyelőre kevesebb ismerettel rendelkezünk. A *ton2/fass* mutánsok diszfunkcionális PP2AB” szabályozó alegységekkel rendelkeznek vagy hiányoznak, a homozigóta recesszív fenotípusok pedig törpék, gyakorlatilag nem rendelkeznek gyökerekkel és nem jelenik meg bennük preprofázis gyűrű (Camilleri *et al.*, 2002; Spinner *et al.*, 2013).

A katalitikus C3 és C4 alegységek a PP2AC II. alcsaládjába tartoznak (C1, C2, C5 = I. alcsalád) (Yoon *et al.*, 2018) (1. ábra). Részt vesznek a mitotikus és nem mitotikus mikrotubulusok szervezésében, a nitrát-reduktáz fényfüggő szabályozásában és a PIN-foszforiláció szabályozásában, amely az embriókban és a gyökereken belül meghatározza az auxin eloszlását és befolyásolja azok fejlődési mintázatait; továbbá (Ballesteros *et al.*, 2013; Spinner *et al.*, 2013; Creighton *et al.*, 2017).

A *c3c4* kettős mutánsra jellemző a gyökér- és hajtásfejlődés súlyos károsodása, és ehhez kapcsolódóan súlyosan megváltozott mikrotubulus-szerveződés (Spinner *et al.*, 2013).



I. ábra Szerin/treonin protein-foszfátáz 2A holoenzim felépítése és az alegységel csoportosítása Elshobaky és mtsai nyomán (Elshobaky *et al.*, 2023). (A) Váz alegység (*scaffold*). (B) Regulátor alegység. (C) Katalitikus alegység. Zárójelben az alegységeket kódoló gének száma *Arabidopsis thaliana*-ban.

2.2 Az auxin-transzport szabályozása

Az auxinok (beleértve a legnagyobb mennyiségben előforduló indol-3-ecetsavat/IAA-t) eloszlása a növényi testben elengedhetetlen a növényi fejlődés szinte minden aspektusában, beleértve a sejtciklus szabályozását, az embrió- és vegetatív szervek fejlődését, vagy éppen a tropizmusok szabályozását (Habets & Offringa, 2014; Xu *et al.*, 2019). Az auxin egyik fontos tulajdonsága, hogy sejtről sejtre polárisan transzportálódik, mely folyamatot influx és efflux transzmembrán fehérjék mediálnak. A sejtekbe elsősorban az AUX1/LAX permeáz által jutnak, és a PIN-ek révén jutnak ki az ellenoldali plazmamembrán felszínre (Michniewicz, Brewer, *et al.*, 2007;

Barbosa *et al.*, 2018). A sejten keresztül a deprotonált IAA-t az endomembránban lokalizált PIN-ek veszik fel, majd az influx-szal ellentétes plazmamembrán oldalon szállítják ki a sejtől. A PP2A defoszforilálja a PIN-eket, amelyek ezután a citoszolon keresztül történő vezikuláris transzport révén újra hasznosulnak, és készen állnak a következő IAA-ion felvételére. A PP2A tehát döntő szerepet játszik a növényben az auxin eloszlását szabályozó PIN-ek poláris lokalizációjának és működésének szabályozásában (Zwiewka *et al.*, 2019) (2. ábra).

Arabidopsis thaliana-ban a PIN (PIN-FORMED) család nyolc tagja ismert (Adamowski & Friml, 2015; Barbosa *et al.*, 2018). Ezek közül, a poláris auxin-transzport szempontjából a nagyobb molekulatömegű „hosszú” 10 transzmembrán doménnel rendelkező PIN1-4 és PIN7 tagok a legfontosabbak, mivel ezek megfelelő szöveti eloszlása kulcsfontosságú a növekedésszabályozásban (Adamowski & Friml, 2015; Barbosa *et al.*, 2018). Továbbá a PIN3, a PIN7 és különösen a PIN2 fontos szerepet játszik a gravitropikus válaszokban (Adamowski & Friml, 2015; Barbosa *et al.*, 2018; Habets & Offringa, 2014). A PIN1 és PIN2 mellett a PIN3 és PIN7 is részt vesz az oldalgyökér fejlődésében – a periciklus sejtosztódások megfelelő szervezésében, és az oldalgyökér primordium iniciációjában (Benková *et al.*, 2003; Michniewicz, Brewer, *et al.*, 2007; Okumura *et al.*, 2013).

A poláris auxin-transzport szállítási iránya szövet-specifikus, gyökerek esetében a PIN1 az IAA-t a gyökérszúrtól a gyökércsúcs felé szállítja a sztelén keresztül, míg a PIN2 a csúcstól a gyökérszúrt felé irányítja a transzportot a gyökér epidermiszben és mindkét irányban a gyökérszúrtban. A PIN3 és a PIN7 az IAA újraelosztói a gyökérszúrt kolumellában és sztelében (Michniewicz, Brewer, *et al.*, 2007).

A PIN-ek működését és stabilitását olyan poszttranszlációs módosítások szabályozzák, mint például PIN-ek reverzibilis foszforilációja,

és legalább a PIN2 esetében az ubiquitináció (Zwiewka *et al.*, 2019). A PIN-ek reverzibilis foszforiláció fő partnerei a PID kináz (szerin-treonin kináz) és a szerin-treonin protein-foszfataz PP2A. A PID képes foszforilálni a korábban vizsgált összes PIN-t (Ganguly *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2018). A PIN-ek reverzibilis foszforilációja szabályozza a plazmamembrán lokalizációt, defoszforilációjuk az internalizációt, valamint transzcitózist vált ki általában az ellenkező sejtoldalra (Kleine-Vehn *et al.*, 2009; Yao & Xue, 2011). A protein-foszfataz inhibitorok fenntartják a PIN1 foszforilált állapotát, amelyet a PID aktivitása okoz (Michniewicz, Zago, *et al.*, 2007). A kantaridin és az okadainsav erősen gátolják a PP2A aktivitást, ezáltal képesek megváltoztatni az auxin-transzportot és csökkentik a gyökércsúcsok auxin tartalmát [PP1- és PP2A-típusú enzimek tagjainak megkülönböztetésében használatos toxinok. A kantaridin kizárólag a PP2A-t gátolja, másokat nem (Li & Casida, 1992; Luan, 2003) részletesebben lásd: 2.1.1 A protein-foszfatazok csoportosítása]. A kantaridin egyúttal képes megváltoztatni a gyökérfejlődést is (Shin *et al.*, 2005). Az MCY-LR esetében ez idáig igen keveset lehetett tudni a PIN-k sorsára és az ebből következő auxin eloszlására gyakorolt hatásáról. Ehhez kapcsolódóan a rizsgyökerekben csökkentette az auxin szintet, gátolva a gyökér megnyúlását és az oldalgöyökér kialakulását (Chen *et al.*, 2013). Az első célunk az volt, hogy újszerű betekintést nyújtsunk egy természetes, PP2A gátló cianotoxinnak a PIN-fehérjék (PIN 1, 2, 3 és 7) és így az auxin (IAA) szintjének változásaiba az *Arabidopsis thaliana* gyökereiben.

Az újrahasznosítást és a PIN transzcitózist az auxin efflux helyére a *ARF guanine-nucleotide exchange factor GNOM* (GNOM) fehérjék szabályozzák, legalábbis a PIN1 és PIN3 esetében (Habets & Offringa, 2014; Luschnig & Vert, 2014). A GNOM fehérjék GTP-GDP cserefaktorok (ARF-GEF-ek) a kis G fehérjékhez, amelyek részt vesznek a különféle membránstruktúrákból történő vezikulumainak kialakulásban.

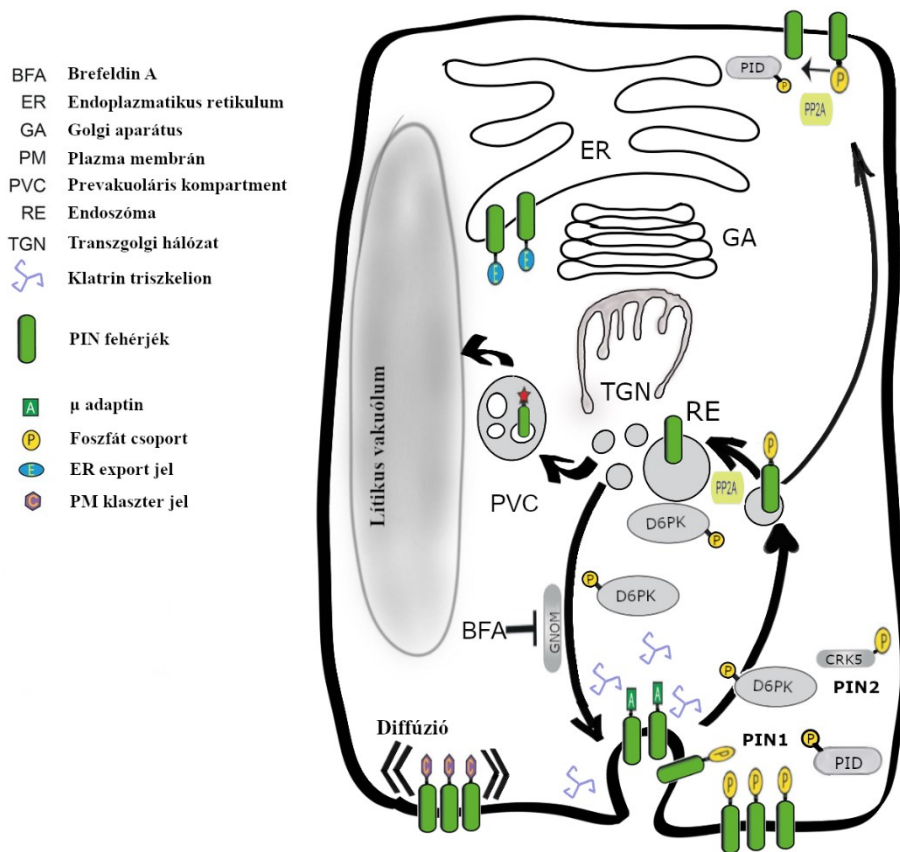
A *gnom* mutánsokat az oldalgöcképződés gátlása és törpeség jellemzi (Feraru & Friml, 2008; Okumura et al., 2013). A GNOM által szabályozott transzcitózis, klattrin-bevonatú vezikulákat (CCV-k) tartalmazó, GNOM által szabályozott IAA-efflux csak akkor következik be, ha a PIN1-et a PP2A defoszforilálja (Gao et al., 2008).

A GNOM családhoz számos izoforma tartozik, amelyek részt vesznek az oldalgöckerek fejlődésében, a fejlődési polaritás szabályozásában és számos más eseményben [79]. Továbbá a GNOM-ok fontos szerepet játszanak a PIN1-et a TGN-en (transz-Golgi hálózat) keresztül szállító vezikulák biogenezisében is (Gao et al., 2008).

A transzcitózis, tehát a PIN1 és PIN2 recirkulációja az ellenkező oldalra - az AUX1/LAX által felszabadított IAA felvételének helyéről - csak akkor történik meg, ha valamelyik PIN-t (PIN1, PIN2, PIN3 és PIN4) a szerintreonin kináz PID vagy más kinázok (lásd alább) foszforilálják, GNOM-független útvonalon keresztül (Gao et al., 2008; Barbosa et al., 2018; Grones et al., 2018; Xu et al., 2019). A GNOM a PIN2 megfelelő lokalizációjában is részt vesz a gyökérekéreg sejtekben, valamint a PIN3 megfelelő lokalizációjában a gravistimuláció során (Rahman et al., 2010; Löffke et al., 2013). Ebben a szakaszban a PIN-ek további sorsa vagy a TGN-en keresztül a plazmamembránba való áthelyeződés és egy új deprotonált IAA-ion megkötése és az efflux-helyre való átvitele, vagy a PIN1 és PIN2 esetében poliubikvitináció: GNOM-független mechanizmussal belépnek egy prevakuoláris kompartmentbe (PVC/MVB) hogy egy lítikus vakuólumban lebontódjanak (DeLong et al., 2002; Löffke et al., 2013; Zwiewka et al., 2019) (2.ábra).

A nagy molekulatömegű ("hosszú") PIN-ek transzmembrán doménnel és egy nagy hidrofil hurokkal rendelkeznek a citoszolban. Ez a hurok a reverzibilis foszforiláció célpontja, és több foszforilációs hely található rajta, amelyet több különböző kináz katalizál (Zwiewka et al., 2019).

A PINOID kináz (PID, egy szerin-treonin kináz) és a szerin-treonin protein-foszfataz PP2A a két legismertebb antagonista partner az intracelluláris PIN-lokalizáció szabályozásában, mivel a PIN-ek hidrofil hurkok azonos helyein hatnak (Feraru & Friml, 2008; Groner et al., 2018). A PID mutánsok nagyon hasonló fenotípust mutatnak, mint a *pin1*, túszerű hajtáscsúcsot és alacsony virágzási rátát, míg a PP2AA szabályozó alegységének mutánsai megváltoztatják az auxin eloszlását, és így a gyökércsúcs merisztéma összeomlását idézik elő, hasonlóan a PID-et túlexpresszáló *Arabidopsis thaliana* növényekhez (Zwiewka et al., 2019). A PID képes foszforilálni az összes nagyobb molekulatömegű PIN-t (Ganguly et al., 2012; Barbosa et al., 2018), amely az AGC VIIIa (cAMP- cGMP-függő G/protein-kináz C) családba tartozó szerin/treonin kináz (Löffke et al., 2013). A PIN foszforilációjában és a PIN-lokalizációjában/auxin-transzportjában részt vevő további kinázok a D6 protein-kináz (D6PK), a WAG1 és WAG2. Ezek mind az AGC VIIIa kináz alcsaládba tartoznak (Barbosa et al., 2018; Zwiewka et al., 2019). Mindegyik kinázzal úgy gondolják, hogy a PP2A az ellensúlyozó partnerük (Zwiewka et al., 2019). A foszfatazok ellenpárjai a PP2A katalitikus alegység C3 és C4 izoformái, amelyekről kimutatták, hogy a PIN defoszforiláció kulcsszereplői (Ballesteros et al., 2013). Két másik protein-kináz család tagjai, a CRK5 és különböző MAP kinázok szintén részt vesznek a PIN foszforilációjában (Rigó et al., 2013; Barbosa et al., 2018; Baba et al., 2019). A vizsgálatban részt vevő CRK5 a kalcium-függő kinázcsalád tagja (CDPK), és fontos a PIN2 megfelelő plazmamembrán lokalizációjában. Az *Arabidopsis thaliana* funkcióvesztett mutánsban a *crk5-1* funkciója kiesik és a gyökér gravitropikus válasza sérül (Rigó et al., 2013; Barbosa et al., 2018).



2. ábra A nagy molekulatömegű PIN fehérjék vezikuláris transzportjának egyszerűsített illusztrációja *Arabidopsis thaliana* általánosított modelljében Zwiewka és mtsai nyomán (2019). Az intracelluláris útvonal azon funkcionális résztvevői láthatóak, amelyek a legkiemelkedőbb szerepet játsszák a vezikuláris transzportban. Az endoplazmatikus retikulumból a PIN fehérjék a citoplazmába jutnak. A korai endoszomális kompartmentekből, például a TGN-ből származó fehérje-újrahasznosítás szabályozója a GNOM, ami BFA szenzitív. A PM lokalizáció és az auxin efflux hordozó aktivitás szempontjából a kinázok (PID, D6PK és CRK5) és a foszfatáz (PP2A) által szabályozott PIN foszforilációs státusz kulcsfontosságú (sárga kör P). A PIN lebomlását ubiquitináció (piros csillag) előzi meg.

2.3 ROS keletkezése és biológiai semlegesítése

A reaktív oxigénformák (ROS) minden eukarióta sejtben keletkeznek mind a belső anyagcsere, mind a külső stresszhatások következményeként. A növények esetében ez magában foglalja az abiotikus tényezők széles skáláját (pl. szárazság, szélsőséges hőmérséklet, magas sótartalom, mechanikai stressz, UV-expozíció stb.) és a biotikus tényezőket, mint például a kórokozók, ahol a különféle metabolitjaik a kiváltó tényezők (Apel & Hirt, 2004). A metabolikus folyamatok következményeként keletkező fő ROS-ok a szingulett oxigén ($^1\text{O}^2$), a szuperoxid-anion (O^{2-}) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2). A hidroxilgyök esetében a termelés másik fő helyszíne a kloroplasztisz tilakoidok PSI-je a Fenton-reakción keresztül (Blokhina *et al.*, 2003). Számos sejtszintű esemény esetében a ROS-okat az anyagcsere természetes következményeinek tartják, vagy akár hasznosnak, mint jelzőmolekulák, pl. a mitózis számára (Mittler, 2017). Általánosságban azonban ismert, hogy a sejtek redox állapotának megváltoztatásával, a fehérjék és lipidek oxidálásával, valamint a DNS-törés kiváltásával sejtkárosodást idéznek elő (Shinozaki *et al.*, 2015; Mittler, 2017). Eközben az úgynevezett „oxidative burst” (oxidatív robbanás) - amelyet a patogén támadást követő helyi oxidatív károsodás jellemez - az érintett szövetekben olyan sejthalálhoz vezet, amely elszigeteli a patogént a többi/egészséges szövetről (Hammond-Kosack & Jones, 2015). A ROS negatív hatásainak elkerülése érdekében a növények többféle védekező rendszert fejlesztettek ki. Ez magában foglalja a nem enzimátikus vegyületeket pl.: α -tokoferol, aszkorbinsav, polifenolok, karotinoidek, flavonoidok, redukált glutation és az enzimátikus rendszereket pl.: aszkorbát-glutation és glutation-peroxidáz ciklus. Az enzimátikus antioxidáns rendszereket, elsősorban olyan ROS semlegesítő enzimek alkotják, mint a katalázok (CAT-ok), szuperoxid-dizmutázok (SOD-ok), peroxidázok (POD-ok), peroxidoxinok (PrxR) és glutation-reduktázok (GR-ok). Az L-aszkorbát-peroxidáz (APX)

egy növény-specifikus enzim (Apel & Hirt, 2004; Shinozaki et al., 2015). A növények fő ROS forrásai a fotoszintetikus és légzési elektronszállítás, a plazmamembrán NADPH-oxidázai és a fotorespiráció során működő glikolát-oxidáz (Noctor *et al.*, 2018).

A ROS keletkezés és a semlegesítők sejtes/szubcelluláris lokalizációi több csoportba sorolhatóak (Shinozaki *et al.*, 2015; Noctor *et al.*, 2018) (i) Plazmamembrán-asszociált NADPH-oxidázok (respiratory burst oxidase homolog proteins, RBOH-k), amik NADP⁺ képzése során szuperoxid-gyököket termelnek, amelyeket aztán a SOD H₂O₂-vé redukál. Ennek a SOD izoformának a természete és lokalizációja sokáig ellentmondásos volt (Sagi & Fluhr, 2006), ám újabb kutatások szerint ez a Cu/Zn-SOD (Choudhury *et al.*, 2017). (ii) A kloroplasztiszok esetében a tilakoid-membránhoz kapcsolódó fotoszintetikus elektrontranszportlánc szinglett oxigént termel a PSII-nél és szuperoxidot a PSII-nél és a PSI-nél egyaránt (ez utóbbit a Mehler-reakció révén). A szuperoxid-aniont ezután a Cu/Zn-SOD és a Fe-SOD H₂O₂-vé semlegesíti. A H₂O₂-t ezután az APX és az aszkorbát-glutation ciklus tovább redukálja. (iii) A mitokondriumokban a szuperoxid a belső membrán I. (NADH-dehidrogenáz) és III. (citokróm b-c komplex) komplexében keletkezik, amit a Mn-SOD H₂O₂-vé redukál. Az aszkorbát-glutation ciklus komponensei mind a membránközi térben, mind a mátrixban semlegesítik a H₂O₂-t. (iv) A peroxiszómákban a H₂O₂ a glikolát-oxidáz aktivitása révén keletkezik a fotorespiráció és a zsírsavak β-oxidációja során. A szintén itt keletkező O²⁻-t a Cu/Zn-SOD és a Mn-SOD, míg a H₂O₂-t a katalázok és az APX semlegesíti (Alscher *et al.*, 2002; Feierabend, 2005). (v) A citoszolban a különféle anyagcsere-folyamatok során keletkező szuperoxid-anionokat a Cu/Zn-SOD, majd az aszkorbát-glutation-ciklus semlegesíti. (vi) Sejtfal/apoplaztikus tér. A közvetlenül a sejtfal szintjén történő ROS termelés és semlegesítés kevésbé ismert, de az apoplaztra vonatkozóan általánosságban

elmondható, hogy a főként a NADPH-oxidázok aktivitása révén termelt ROS-ok patogén támadáskor végső soron szisztémás oxidatív robbanáshoz vezetnek, a sejtek közötti terjedésük révén.

Fontos megjegyezni, hogy a légköri ózon (O_3) hidroxilgyökké (OH^\cdot) vagy perhidroxilgyökké (O_2H^\cdot) alakulhat intracellulárisan vagy az apoplasztikus térben (Shinozaki *et al.*, 2015). Az O_3 expozíció során keletkező ROS-okat az aszkorbát dehidroaszkorbáttá (DHO) történő redukciója semlegesíti, amely szabályozza az intracelluláris ROS szignálokat (Foyer & Noctor, 2005). Ezenkívül a sejtfalhoz lehorgonyzott III. osztályú peroxidázok is hozzájárulhatnak az apoplasztikus H_2O_2 -keletkezéshez (O'Brien *et al.*, 2012).

A reverzibilis protein foszforiláció az oxidatív stressz jelátviteli utak szabályozásában is fontos szerephez jut. Például az ABI1 egy PP2C, amely a fémfüggő protein-foszfatazok közé tartozik (Meinhard & Grill, 2001), negatívan szabályozza az abszcizinsav (ABA) jelátvitelt, növeli a ROS szintjét és viszonylag alacsony szinten tartja a ROS semlegesítő enzimaktivitást (Ludwików *et al.*, 2014).

2.3.1 SOD szerepe, formái és szabályozása

A szuperoxid-diszmutázok (SOD-k) a ROS fő megkötői azáltal, hogy a szuperoxid-aniont H_2O_2 -á alakítják, amely a ROS egyik kevésbé toxikus formája. Fémfüggőségük szerint a SOD-nak több izoformája létezik. A Fe-SOD izoenzimek főként a kloroplasztiszokban lokalizálódnak, de jelen vannak a citoszolban és a sejtmagban is, minden plasztisszal rendelkező szövettípusban fellelhetőek. A gyökereket illetően a Fe-SOD nagy része az apikális régióban lokalizálódik, de jelen van a fiatal csíranövények teljes primer gyökérrendszerében, ahol hozzájárul a sóstressz tolerancia kialakulásához (Dvořák *et al.*, 2021). A Mn-SOD alapvetően a mitokondriumokban és a peroxiszómákban lokalizálódik, de feltételezett

apoplasztikus formát is azonosítottak az *Arabidopsis thaliana* gyökereiben (Chen *et al.*, 2022). A Cu/Zn-SOD főként a plasztiszokban lokalizálódik, de a citoszolban is jelen van (Kliebenstein *et al.*, 1998). A különböző SOD izoformák kapcsán nem sokat tudunk arról, hogy szintjük és/vagy aktivitásuk mennyire függ a növényekben a közvetlen vagy közvetett foszforegulációtól.

2.3.2 A H2AX szerepe növényekben

A H2A hiszton egyik változata eukariótákban (H2AX). A karboxiterminális helyen foszforilált formáját γ H2AX-nek nevezik, amely a DNS kettős szálú szakadásait jelzi, pl. ROS által, és szerepet játszik a kettős szálú DNS-javítás megindításában (Fillingham *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006). Ez utóbbi funkciót úgy érik el, hogy kiváltják a nukleoszómák fellazulását, lehetővé téve a javításban résztvevő fontos fehérjekomplexek hozzáférését és összeszerelődését (Fuchs *et al.*, 2006). Szintén keveset tudunk a foszfatázok, például a PP2A szerepéről a H2AX foszforilációs állapotának közvetlen szabályozásában.

2.3.3 A PP2A szerepe az oxidatív stressz útvonalakban

A ROS közvetlenül az élethez nélkülözhetetlen makromolekulák károsodásával, vagy - mivel fontos szignálmolekulák lehetnek - különböző jelátviteli útvonalakon keresztül sejtes/szubcelluláris változásokat idéznek elő.

A ROS-hoz kapcsolódó jelátviteli utakat általában a keletkezésük helye alapján szokás osztályozni, így lehetnek intracellulárisak pl.: kloroplasztiszban a fotoszintézis vagy extracellulárisak pl.: apoplasztban az RBOH (Kapoor *et al.*, 2019).

Ha a ROS forrásait és a hozzájuk kapcsolódó jelátviteli utakat komplexen vizsgáljuk, akkor 3 egymásra épülő eseménysorozat lejátszódására találunk bizonyítékokat, amelyek között számos ismert és lehetséges kapcsolódási pont van. Ezen túlmenően a ROS olyan jelátviteli utakat indít el,

amelyek növelik a nem enzimatisz antiozidánsok szintjét és fokozzák az enzimatisz antiozidánsokat kódoló gének expresszióját (Máthé *et al.*, 2019)

A ROS által indukált események, jelátviteli útvonalak három forgatókönyv szerint zajlanak (3. ábra) (Máthé *et al.*, 2019):

1. forgatókönyv. Az RBHO-k által termelt külső ROS-ok, főként szuperoxid és H₂O₂ olyan jelátviteli utakat indítanak el, amelyek megváltoztatják az oxidatív stresszre adott válaszokhoz vezető génexpressziót (Hancock *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2012; Shinozaki *et al.*, 2015). A külső ROS keletkezhet a "ROS hullám mechanizmus" révén: az RBOH aktivitása extracelluláris ROS termelődését eredményezi, vagy a kórokozók intracelluláris ROS képződését indukálják, amely felszabadul, és a szomszédos sejtekben ROS képződést stimulál (Zandalinas & Mittler, 2018).

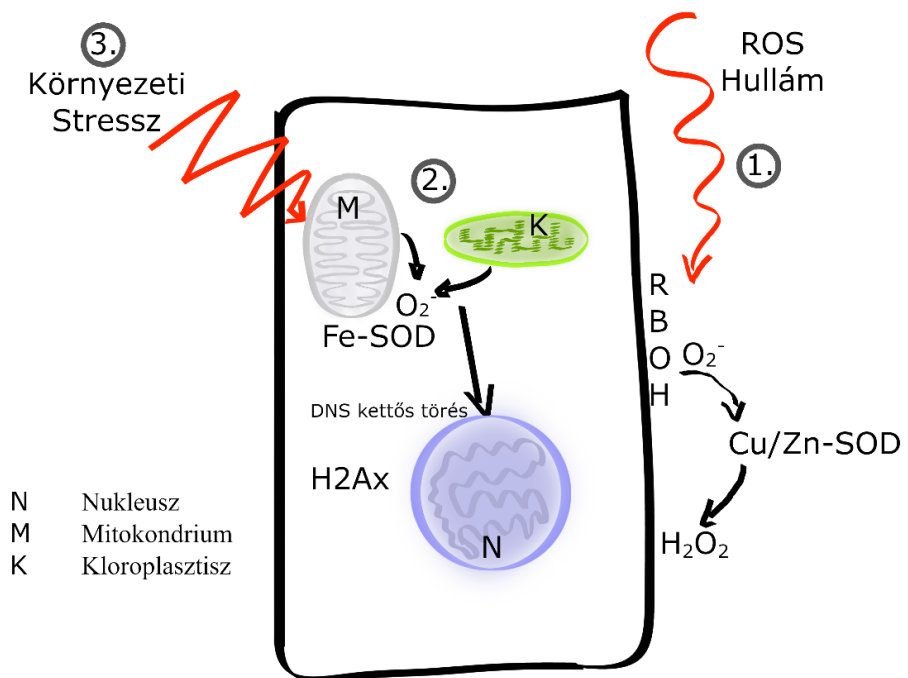
2. forgatókönyv. Ez esetben a ROS intracellulárisan keletkezik, általában valamelyik élettani folyamatban. Ez a legszélesebb körben tanulmányozott forgatókönyv, így az is ismert, hogy a különféle sejt-kompartmentek által generált intracelluláris ROS-ok különböző jelátviteli útvonalakat aktiválnak (lásd Mittler, 2017).

3. forgatókönyv. Itt a környezeti stressz olyan jelátviteli útvonalakat indukál, amelyek ROS generáló enzimek expressziójának indukciója révén ROS termeléshez vezetnek, majd az ezen mechanizmus által generált ROS további intracelluláris változásokat indukál az 1. és 2. forgatókönyv szerint (példát lásd a (Kobayashi *et al.*, 2007) hivatkozásban).

Mindezek a forgatókönyvek protein foszforilációtól függő lépéseket tartalmaznak, elsősorban a mitogén-aktivált protein-kináz (MAPK) kaszkádokat. Mivel eukariótákban, beleértve a növényeket is, számos ilyen kináz foszforilálja a fehérjét szerin treonin aminosav oldalláncokon (Cargnello & Roux, 2011; Wrzaczek & Hirt, 2001), nyilvánvaló, hogy az

ellensúlyként működő szerin-treonin protein-foszfatazok is részt vesznek ezekben az útvonalakban.

A fémfügő foszfatazok (PP2C) közismerten részt vesznek a ROS-sal kapcsolatos jelátvitelben, pl. az ABA-mediált oxidatív válasz során a gátlásuk kulcsfontosságú (Neill *et al.*, 2002). Eközben a fémfüggetlen protein-foszfataz család, a PP2A a legnagyobb mennyiségben előforduló és talán a legfontosabb Ser/Thr protein-foszfataz az eukarióta sejtekben (Shi, 2009). Azonban, még mindig viszonylag kevés ismeret áll rendelkezésre a ROS-sal kapcsolatos jelátvitelben való részvételéről.



3. ábra ROS-ok keletkezése és lehetséges kapcsolódási pontjaik a jelátviteli folyamatokkal. 1. RBOH vagy ROS hullám indukálta jelátvitel. 2. Intracellulárisan keletkező ROS. 3. A ROS-ok környezet stressz általi indukálása, amely az 1. és 2. forgatókönyv szerinti további ROS-t és jelátviteli utakat aktivál.

2.4 A Mikrocisztin-LR hatásairól

A Mikrocisztin-LR (MCY-LR) egy természetes ciklikus heptapeptid toxin, amely nem riboszomálisan szintetizálódik számos cianobaktérium nemzetségben (Rastogi *et al.*, 2014). Régóta ismert az emberi és állati egészségre, valamint a vízi ökoszisztémákra gyakorolt káros hatásairól (Campos & Vasconcelos, 2010). A szerin-treonin protein-foszfatazok PP1 és PP2A, valamint a PP4, PP5 és PP6 kisebb foszfatazok erős inhibitora (Fontanillo & Köhn, 2018; MacKintosh *et al.*, 1990; Máthé *et al.*, 2016). Ismeretes, hogy az inhibitor kovalensen kötődik a PP1 és PP2A katalitikus alegységeinek aktív helyeihez, és visszafordíthatatlan gátlást okoz (lásd például (Bouaïcha *et al.*, 2019) valamint, reaktív oxigénformák (ROS) indukálója (Máthé *et al.*, 2016, 2019).

A cianobaktérium-toxinok fitotoxicitását szubcelluláris szinten igazolták, ami hatással van az egész növény fiziológiai paramétereire, így a növekedésre és a termés hozamra is. A cianotoxinok mindegyikére jellemző dózis- és növényi genotípus-függő hatás. A kloroplasztisz szerkezetében bekövetkező változások befolyásolják a fotoszintézis hatékonyságát és ezáltal a növények fejlődését. A sejtfal összetételének megváltozása, a vakuoláris membrán (tonoplaszt) és a citoskeleton zavara, valamint a kromatin szerkezetének megváltozása (beleértve a DNS-szál töréseit is) végső soron sejthalálhoz vezethetnek (Máthé *et al.*, 2019).

Az édesvizek eutrofizációja és a globális felmelegedés során a cianobaktériumok számos képviselője képes tömeges szaporodásra, például vízvirágzás előidézésére, nagy mértékű üledék vagy biofilm képzésre, amelyek számos, környezetre káros hatással járhatnak (Padisák *et al.*, 2016; Paerl & Huisman, 2008).

Kémiai szerkezetük és sejtes biokémiai célpontjuk szerint a legfontosabb cianotoxinok a mikrocisztinek. Ciklikus heptapeptidek, amelyek

gátolják a PP1 és PP2A eukarióta protein-foszfatazókat, valamint a kisebb foszfatazókat PP4, PP5 és PP6. Az is ismert, hogy oxidatív stresszt váltanak ki az eukariótákban. Az MCY legalább 279 változatát azonosították különböző cianobaktérium nemzetségekből (például *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Planktothrix* és *Gleotrichia*; Bouaïcha et al., 2019). A jól ismert MCY-LR és MCY-RR a leggyakoribb cianotoxinok, amelyek a cianobaktériumok által okozott számos toxikus hatásért felelősek (Pouria et al., 1998).

A (Kós et al., 1995) úttörő munkája óta számos tanulmány bizonyítja a cianotoxinok káros hatásait a vízi és a szárazföldi növényekre lásd a (Campos et al., 2021) áttekintését ebben a témakörben, valamint Machado et al. (2017) cikkét.

Az MCY-LR által eukariótákban történő ROS indukció mechanizmusára több modell is létezik.

1. mechanizmus. Az MCY-LR közvetlenül, protein-foszfatazó bevonása nélkül hoz létre ROS-t. A legvalószínűbb útvonal a glutation-S-transzferáz (GST) által katalizált MCY-LR-glutation konjugátumok képződése, ami a redukált glutation (GSH) szintjének csökkenéséhez vezet. Ez oxidatív stresszt és ROS keletkezést okoz a sejt redox-állapotának kiegyensúlyozatlanságával, ami lipidperoxidációhoz, citoskeletális zavarokhoz, mitokondriális károsodáshoz és nukleáris DNS-szálszakadásokhoz vezet. Az oxidatív stressz modulálja az antioxidáns enzimek expresszióját és aktivitását is (Chen & Xie, 2016; Valério et al., 2016). Az MCY-glutation-konjugátum szint, GST-aktivitás és az antioxidáns enzimek aktivitásának vizsgálata alapján ezt a modellt Pflugmacher javasolta növényekben (Pflugmacher, 2002, 2016). Ehhez kapcsolódóan a lipidperoxidáció szintje megnőtt az MCY-LR-rel kezelt paprika termésekben és az *Arabidopsis thaliana* csíranövényekben, amit a malondialdehid szintjének emelkedése bizonyít (Drobac et al., 2017; Jia et al., 2018). Érdemes

megemlíteni, hogy az MCY-LR képes a tisztított katalázhoz kötődni, ami megváltoztatja annak aktivitását (Hu & Da, 2014), ami az inhibitor másik közvetlen oxidatív stresszre gyakorolt hatására utal.

2. mechanizmus. Az MCY-LR ROS keletkezéshez vezető jelátviteli utakat indukál a PP2A protein-foszfataz részvétele nélkül HEK293 humán vese sejtvonalban. Ehhez kapcsolódóan az inhibitor a kalcium-kalmodulin-függő II. multifunkcionális proteinkináz (CaMKII) részvételével a Ca²⁺-függő jelátviteli utakat modulálja és ezáltal indukál ROS-t (Li *et al.*, 2012). Hasonló útvonalat növények esetében nem sikerült bizonyítani.

3. mechanizmus. Az MCY-LR jelátviteli útvonalakat indukál, amelyek ROS termeléshez vezetnek a PP2AB bizonyított vagy lehetséges részvételével. Az MCY-LR a citoskeleton dezorganizációját indukálja egy MAPK28 útvonalon keresztül, amelyet az idegrendszerben mind a protein foszforiláció, mind az oxidatív stressz modulálhat, azonban a két sejt folyamat közötti kapcsolat mechanizmusait nem sikerült egyértelműen tisztázni semmilyen eukariótában, így növényekben sem (Meng *et al.*, 2011).

Gehring (2004) felvetette annak lehetőségét, hogy a PP2A MCY-LR általi gátlása aktiválja a MAPK-kat, és más szubcelluláris változások mellett ez ROS keletkezéshez vezethet. Az MCY-LR megakadályozza a multifunkcionális Ca²⁺/kalmodulinfüggő protein-kináz (CaMKII) defoszforilációját a Thr286-os ponton, ami patkányhepatociták aktivációjához és végül sejthalálhoz vezet (Fladmark *et al.*, 2002). Ezek az adatok és hipotézisek felvetik annak lehetőségét, hogy az MCY-LR hasznos eszközként szolgálhat a növényekben is a foszfatazok által közvetített ROS termelés további vizsgálatához. Összességében, bár számos tanulmány számol be az MCY-LR által közvetített oxidatív stresszről növényekben, csak néhány publikáció tett kísérletet a háttérben meghúzódó biokémiai mechanizmusok magyarázatára. A tanulmányok azt mutatják, hogy a felvett MCY-LR

méregtelenítő mechanizmusként glutationnal konjugálódik, ám arra nincs közvetlen bizonyíték, hogy az MCY-LR által közvetített ROS indukció a protein-foszfataz-függő útvonalakon keresztül történik. Ellenben arra van bizonyíték, hogy az MCY-LR jelentős része nem konjugálódik intracellulárisan: jelentősen gátolja a PP1 és PP2A aktivitását *Sinapis alba*, *Phragmites australis* és *Vicia faba* növényekben (Máthé *et al.*, 2009, 2013; Garda *et al.*, 2016). Az inhibitornak a PP2A katalitikus és szabályozó alegységeire gyakorolt komplex hatása nagy valószínűséggel zavarja az oxidatív stressz által közvetített jelátviteli útvonalakat (Máthé *et al.*, 2019).

2.5 A diquat hatásairól

A diquat (DQ), mint a paraquat (PQ), egy dihidropiridin gyomirtó, amely erős oxidatív stresszt vált ki növényekben, beleértve az *Arabidopsis thaliana*-t is (Lv *et al.*, 2021). A DQ toxicitása gyakorlatilag megegyezik a PQ-val: elektronok átvitelét indukálja a PSI-ből az O₂-re, így ROS-t indukál. Bár a fenti okok miatt elsősorban a fotoszintetikus szerveket érinti, a gyökerek normál növekedését és fejlődését is megváltoztatja (Acar, 2021; Lv *et al.*, 2021). A jelenség hátterében az áll, hogy a DQ/PQ nemcsak állati, hanem nem fotoszintetikus növényi sejtekben is befolyásolja a mitokondriális elektrontranszport láncot (Zer *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2021). Így a DQ-ról nem ismert, hogy interferálna egyetlen protein-foszfatazzal sem, ezért választottuk összehasonlító eszközként a protein-foszfataz mutánsok vizsgálatához.

3 Célkitűzések

Az első célunk volt feltárni a MCY-LR káros hatásait a PIN- és auxin-eloszlásra az *Arabidopsis thaliana* gyökereiben, és megvizsgálni ennek a gyökérfejlődésre gyakorolt hatásait (növekedés, oldagyökér képzés és gravitropikus válasz). Mivel a MCY-LR protein-foszfátáz gátló és ismert ROS indukáló szer is, így céljaink között szerepeltek a PP2A aktivitás és a ROS mennyiség vizsgálatok is.

A PIN újrahasonulás során a a PP2AC3 és C4 enzimek fontos szerephez jutnak. Ugyanakkor a PP2AC3 és C4 katalitikus és B” szabályozó alegységek mindegyikéről ismert, hogy további fontos szubcelluláris eseményeket szabályoznak a növények fejlődése során, de a ROS szintjeinek szabályozásában és/vagy a semlegesítésben (SOD) betöltött szerepükkel kapcsolatban jóval kevesebb az ismeretanyag (Durian *et al.*, 2020; Máthé *et al.*, 2023).

Így azt a célt tűztük ki, hogy újszerű betekintést adjunk a PP2AB” és C alegységek növényi oxidatív stresszben betöltött szerepébe, a ROS mennyiség és az enzimikus védekező rendszer egy tagja a SOD aktivitás vizsgálatok révén. Továbbá, a következő kérdésre is választ kívántunk adni: szabályozza-e a kettősszálú DNS törés jelzőmolekuláját, a H2AX hiszton foszforilációs állapotát a PP2A?

4 Anyag és módszer

4.1 Növények és kezelésük

4.1.1 Vizsgált növények és mutánsaik

Arabidopsis thaliana-ban a PIN-ek vizsgálatához felhasznált növények minden esetben Columbia ökotípus Col-0 (vad típusúak) voltak, Col-0 háttérű *Agrobacterium* transzformált PIN1:PIN1-GFP, PIN2:PIN2-GFP és PIN3:PIN3-GFP (Benková *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006; Žádníková *et al.*, 2010), DR5rev:GFP fúziós konstrukció auxinok jelenlétének és az azokra adott válaszok szöveti kimutatásához (Friml, Vieten, *et al.*, 2003; Žádníková *et al.*, 2010), valamint a *crk5-1* funkcióvesztett T-DNS inszerciós mutáns (Rigó *et al.*, 2013) melyet a gravitropikus válasz vizsgálatban használtunk.

A protein-foszfataz és szuperoxid-dizmutáz vizsgálatokban a Camilleri *et al.* (2002), Kirik *et al.* (2012) és Spinner *et al.* (2013) által leírt protein-foszfataz (PP2A) mutánsokat használtuk, ezek voltak a T-DNS inszercióval létrehozott *c3c4*, a katalitikus alegységek kettős mutánsa és a két B” szabályozó alegység *fass (ton2)* trunkált mutánsai. A két *fass* vonal a *fass-15* és *fass-5* voltak, amely vonalak fenotípusukban térnek el egymástól. Ez utóbbi mutánsok csak akkor mutatják abnormális fenotípusukat, ha genotípusuk homozigóta recesszív. A *fass* mutánsok esetében homozigótákat és heterozigótákat használtunk, ez utóbbiak valójában a homozigóta domináns genotípusból (mock Col-0) és heterozigótákból (FASS/*fass*) álló pool-ok. Ezért a dolgozat ábráin egyedi jelölést vezetünk be, heterozigóta és a homozigóta genotípus elkülönítésére a „*fass-5* He. Z” és a „*fass-15* He. Z” FASS-5/*fass-5* heterozigótának és FASS-15/*fass-15* heterozigótának felel meg, míg a „*fass-5* Ho. Z.” és a „*fass-15* Ho. Z.” jelölik a homozigóta recesszív mutánsokat. A foszfataz mutánsokat Dr. Martine Pastuglia, Institut Jean Pierre Bourgin, INRA Versailles, Franciaország, bocsátotta rendelkezésünkre.

4.1.2 Nevelési körülmények

A vizsgálatainkat axénikus és kontrollált körülmények között végeztük. Az axénikus feltétel biztosításához a magok felületét 2x10 percig kereskedelmi forgalomban kapható nátrium-hipoklorit tartalmú fehérítőszer (Unilever „Domestos”) 10%-osra (V/V) hígított oldattal sterilizáltuk, majd 3x5 percig mostuk steril desztillált vízzel. A felület sterilizált magokat módosított MS (Murashige & Skoog, 1962) steril táptalajra helyeztük, kiegészítve Gamborg-vitaminokkal (1968), 2% (w/V) szacharózzal (Molar, Budapest, Magyarország) és 0,8% (w/V) Bacto-agarral (Difco, Lawrence, KS, USA). 48 órás hidegkezelés után a magokat tartalmazó lemezeket növényi szövettenyésztő szobában helyeztük át az alábbi körülmények közé: 14/10 órás fotoperiódus, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, $60\ \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ fotonfluxussűrűség a fényperiódusban. Előnevelt 5 napos csíranövényeket sterilizált szűrőpapírra helyeztük át, amelyet folyékony módosított MS táptalajjal itattunk át, és ebbe a táptalajba adagoltuk a MCY-LR-t és a diquatot (DQ) a kezelésekhöz.

4.1.3 A Mikrocsisztin-LR tisztítása

A MCY-LR-t *Microcystis aeruginosa* BGSD 243-ból Kós és munkatársai leírása alapján (1995) Vasas Gábor és csoportja tisztította a módszer módosítása után (Vasas et al., 2004). A sejteket centrifugálással gyűjtötték össze, majd a cikkekben leírtak szerint extrahálták. A cianotoxin tisztítását DEAE Cellulose-52 (Whatman DE 52) oszlopon végezték. A MCY-LR-t tartalmazó eluátumokat Toyopearl méretkizárásos kromatográfiával tovább tisztították. A készítmények tisztaságát HPLC-vel igazolták (C-18 HPLC oszlop, Supelcosil TM SPLC-18, 25 cm 10 mm, 5 mm). A HPLC elemzéseket Shimadzu SPD-M 10 AVP diódasorral felszerelt Shimadzu HPLC rendszerrel végezték. A kromatogram jellegzetes csúcsait LC-MS-sel ellenőrizték. Az MCY-LR-t $[\text{M}+\text{H}]^+$ -ként detektálták m/z 995,5-nél.

4.1.4 Kezelési koncentrációk megválasztása

Előzetes vizsgálatainkban az MCY-LR-t 0,05-10 μM koncentrációtartományban alkalmaztuk. Az 5 μM és a feletti koncentrációk hosszú és rövid távú expozíció esetén is sejt nekrozist idéztek elő, ezért a cikkekben szereplő vizsgálatainkhoz 0,05 és 1 μM koncentrációkat választottunk. Az 1 μM MCY-LR 24 órás expozíció után olyan mértékű protein-foszfataz gátlást idézett elő, amely még nem okozott gyors sejthalált. Ez tette lehetővé, hogy az 1 μM MCY-LR-rel végzett viszonylag rövid távú kezelések révén betekintést nyerjünk a PIN, az auxin válasz és a gyökérfejlődés kapcsolatába.

A vizsgálatban használt diquat (DQ) koncentrációkat is gondosan választottuk ki, céljaink érdekében olyan nem letális koncentrációkat választottunk (legalábbis a 24 órás kezelési időszak alatt), amelyek még mindig oxidatív stresszreakciókat indukáltak. A választott koncentrációk 0,5 μM és 1 μM DQ volt ezek a koncentrációk több mint 24 óra után okoztak nekrotikus tüneteket a teljes populációban. A diquat-dibromid-monohidrátot a Supelco, Bellefonte, PA-tól vásároltuk.

A szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokhoz (PIN-lokalizáció, DR5 auxin válasz, a teljes ROS tartalom meghatározása, a γH2AX immunhisztokémiai kimutatása) az összes érintett *Arabidopsis thaliana* genotípus primer gyökereit használtuk.

A biokémiai vizsgálatokhoz (γH2AX Western blot kimutatása és SOD aktivitás kimutatása, protein-foszfataz aktivitás mérések) a Col-0 és a *fass* heterozigóta primer gyökereit használtuk. A *fass* homozigóta és a *c3c4* mutánsok esetében- mivel alig fejlődtek jól definiált gyökerek vagy a gyökerek biomasszája nagyon alacsony volt – egész csíranövényeket használtunk a vizsgálatokhoz.

4.2 Mikroszkópos és Western-blot módszerek.

4.2.1 Élő sejtek vizsgálata a GFP szignál detektálása révén

A GFP-fúziós konstrukciókat (PIN:GFP és DR5rev:GFP) tartalmazó csíranövényeket Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (gerjesztési hullámhossz: 488 nm, emissziós hullámhossz-tartomány: 500-530 nm; 60x UPLSAPO vízimmerziós objektív, 1,2 numerikus apertúrával, adatgyűjtő szoftver: FV-1000). A jelintenzitás elemzéséhez 2D-s Z tengely irányú vetületi képeket készítettünk, majd a jobb szemléltetés érdekében ezekből a képeket 2D-s hőterképekké alakítottuk. Az átlagos szürkeértékeket (AIOD, terület integrált optikai denzitás) a 2D hőterképes képek háttérszűrése után a Fiji (ImageJ-Win64) szoftver segítségével számoltuk ki (Schindelin *et al.*, 2012). A háttérjelek szűrését egyedileg, képenként végeztük el. A DR5rev:GFP növények GFP-jeleit illetően a főgyökerek csúcsaira és differenciált szegmenseire vonatkozó konfokális mikroszkópos 3D képeiből szintén hőterképeket készítettünk. A 3D hőterképek a ZEN Blue 2.3 Lite szoftver segítségével készültek, és a különböző gyökér zónákban GFP-jelek helyi Z tengely szerinti pozícióját és kiterjedését mutatják.

4.2.2 PIN immunjelölés

A PIN1, PIN2 és PIN7 immunlokalizációját InsituPro Vsi pipettázó robot segítségével történt (Friml, Benková, *et al.*, 2003; Sauer *et al.*, 2006), ezeket a vizsgálatokat dr. Garda Tamás végezte dr. Tomasz Nodzyński laboratóriumában, Mendel Centre for Plant Genomics and Proteomics, Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno, Czech Republic.

A Col-0 primer gyökércsúcsokat 4% (w/V) paraformaldehiddel (PFA) NaCl tartalmú foszfát pufferben (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM

Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂ x2H₂O, 0,5 mM MgCl₂ x6H₂O pH 7,4 HCl-lel korrigálva) 40 percig vákuumban rögzítették. Ezután a mintákat PBS 0,1% (V/V) Triton-X100 (3x15 perc) és ionmentesített vízzel 0,1% (V/V) TritonX100 (3x15 perc) mosták. A sejtfalakat 2%-os Driselázzal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) emésztették PBS-ben 30 percig 37 °C-on, majd a mintákat PBS 0,1% (V/V)-os Triton-X100-zal mosták (3x15 perc). A következő lépésben a csíranövényeket 10% (V/V) dimetil-szulfoxid (DMSO) 3% (V/V) IGEPAL PBS-ben 30 percig permeabilizálták, majd PBS 0,1% (V/V) Triton-X100-zal mostuk (3x15 perc). A mintákat 2%-os (w/V) BSA PBS-ben előinkubálták 1 órán keresztül, ezt követően primer ellenanyaggal inkubálták 2%-os BSA PBS-ben 4 órán keresztül 37 °C-on, majd PBS 0,1% (V/V) os Triton-X100-zal mosták (5x15 perc). Primer ellenanyagként nyúlban termelt anti-PIN1, anti-PIN2 (Skokan *et al.*, 2019) és anti-PIN7 (Doyle *et al.*, 2019) ellenanyagokat használtak. A másodlagos ellenanyag Cy3 konjugált, juhban előállított antinyúl IgG (SigmaAldrich, C2306) volt. A másodlagos antitesttel való inkubáció 2%-os BSA PBS-ben történt 4 órán keresztül 37 °C-on, majd a mintákat PBS 0,1%-os Triton-X100-zal (3x15 perc) és ionmentesített vízzel (3x15 perc) mosták. A preparátumokat Zeiss LSM Z700 konfokális mikroszkóppal elemezték a Cy3 vizualizáció hagyományos beállításával. Az adatok kiértékelését a kezletlen növények jelintenzitásának és a kezelt növények jelintenzitásának összehasonlításával végezték.

4.2.3 γ H2AX immunjelölés

A foszforilált hiszton H2AX-ot (γ H2AX) immunlokalizációval és Western blot segítségével is vizsgáltuk. Az immunfluoreszcencia eljárás a Pasternak és munkatársai (2015) és Freytag és munkatársai (2021) által leírt „whole mount” (teljes növényben) protokoll elveit követte. Röviden, a Col-0

kezeletlen és MCY-LR/DQ kezelt primer gyökerek intakt csúcsait 2% (w/V) paraformaldehiddel (PFA) + 0,1% (V/V) Triton-X100-zal fixáltuk mikrotubulus stabilizáló pufferben (MTSB). Kétszer 5 percig vákuumos infiltrációt alkalmaztunk, majd további 50 percig történt inkubáció vákuum nélkül; ezután a mintákat háromszor mostuk 1x MTSB-vel. A gyökércsúcsokat ezután metanollal kezeltük, majd csökkenő metanolkoncentrációjú sorozatban rehidratáltuk. Ezt követően a sejtfalakat 2% (w/V) Driselázzal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) és 0,2% macerozimmal (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Németország) 2 mM MES-ben (Sigma-Aldrich) 30 percig 37 °C-on emésztettük, majd a mintákat 1x MTSB-vel mostuk. Ezután a csíranövényeket 10% (V/V) DMSO 3% (V/V) IGEPAL (Sigma-Aldrich) 1x MTSB-ben 20 percig 37 °C-on permeabilizáltuk, majd 1x MTSB-vel mostuk. A mintákat 1x MTSB +4% (w/V) BSA-ban (Sigma-Aldrich) előinkubáltuk 30 percig, majd primer antitesttel 1x MTSB + 4% BSA-ban 4 órán át 37 °C-on (vagy egy éjszakán át 4 °C-on) inkubáltuk, majd 1x MTSB-vel mostuk. Az primer antitest nyúl-tenyésztett anti- γ H2AX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA PA5-77995) volt 1:30-as hígításban. A másodlagos ellenanyag Alexa 488 konjugált antinyúl IgG volt, amelyet kecskében (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) állítottak elő. A másodlagos antitesttel való inkubálás 1x MTSB+4% BSA-ban történt 4 órán keresztül 37 °C-on, majd a mintákat 1x MTSB-vel mostuk. A preparátumokat Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss AG, Jena, Németország) konfokális mikroszkóppal elemeztük Zen Black 2.3 szoftverrel és az Alexa 488 vizualizáció hagyományos beállításával (Arg lézer a gerjesztéshez; az emissziót 490 nm-es dichroikus tükör és 490-530-as szűrőkészlet segítségével figyeltük). A mintákat ezután 3 μ g ml 1'4'-diamidino-2-fenilindollal (DAPI, Fluka, Buchs, Svájc) kontraszt festettük az összes sejtmag láthatóvá tételéhez Beyer és munkatársai (2012) szerint. A DAPI vizualizálását 405 nm-es diodelézerrel végeztük, a jeldetektálás pedig

az e festékre vonatkozó hagyományos LSM paraméterek szerint történt. A mikroszkópos felvételek elkészítésében dr. Újlaki-Nagy László (DE ÁOK Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet) nyújtott segítséget. A γ H2AX jelölés intenzitásának számszerűsítését a Fiji szoftver (Linkert *et al.*, 2010; Schindelin *et al.*, 2012) segítségével végeztük, és a terület integrált optikai denzitást/AIOD-t mutató pixelek számaként adtuk meg. Kísérletenként és kezelésenként legalább öt csíranövény gyökerét használtuk fel, és öt egymástól független kísérletet végeztünk.

4.2.4 γ H2AX Western blot

A γ H2AX mennyiségi meghatározására szolgáló Western blot vizsgálatokat a Waadt és munkatársai (2015) módosított módszere szerint végeztük, és az ebben a vizsgálatban részt vevő valamennyi genotípus kezeletlen és MCY-LR/DQ kezelt egész gyökereit vagy egész csíranövényeit (a növényi anyag típusa a fenotípustól függően, a gátolt növekedésű mutánsokat egészében, a normálisakat hajtásra és gyökérre szeparáltan) vizsgáltuk. Összefoglalva, a teljes gyökereket vagy csíranövényeket homogenizáltuk, majd 95°C-on 5 percig forraltuk pufferben, amely 50 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 1%SDS, 1 mM fenil-metil-szulfonilfluorid (PMSF, PanReac AppliChem, Darmstadt, Németország), 1x proteáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich), 4% poli-vinil-pirrolidon (PVP). Az extraktumokat ezután 20 percig 4°C-on 13 000 fordulat/perc fordulatszámom centrifugáltuk (BeckmanAvanti sorozatú centrifuga, Indianapolis, USA) 10-15°C-on. A felülúszók fehérjetartalmát BCA-reagenssel határoztuk meg, majd Laemmli puffert adtunk hozzá (1970), és a mintákat 95°C-on 3 percig forraltuk. Egyenlő mennyiségű fehérjét (30 μ g) töltöttünk gélekre, molekulatömeg-markerrel (Thermo Fisher Scientific) együtt. A futtatógél 15% (w/V) poliakrilamidot tartalmazott, a futtató közeg Tris-HCL glicin alapú volt. Az SDS-PAGE Laemmli (1970) szerint történt.

A fehérjéket nitrocellulóz membránokra (Millipore, Burlington, Ma., USA) „wet” elektroblot rendszerrel (Cleaver Scientific, Rugby, UK) blottoltuk. A transzferpuffer 25 mM Tris; 192 mM glicin; 20% (V/V) metanol; pH 8,3 volt. A membránokat ezután 1xTBST-vel (1xTBS + 0,05% Tween 20) + 3% (w/V) BSA-val blokkoltuk 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően primer antitesteket alkalmaztunk. Nyúl anti – γ H2AX ellenanyagot (Thermo Fisher Scientific) 1:3000-es hígításban (TBST-ben + 3% BSA), míg anti β -tubulin (Abcam) ellenanyagot 1:12 000-es hígításban kontrollként használtuk, a fehérjemennyiség ellenőrzése céljából. A jelölést egy éjszakán át 4°C-on végeztük. Több mosási lépést követően HRP konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyagot (Abcam) alkalmaztunk 1:4000 hígításban 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Mosás után a fehérje sávokat a Chemidoc kemolumineszcens rendszerrel (BioRad, Hercules, USA) detektáltuk. A western blotok kivitelezésében dr. Garda Tamás nyújtott segítséget, a detektálásokat dr. Kónya Zoltán végezte. A Western blot vizsgálatokhoz kísérletenként legalább harminc csíranövény gyökerét vagy hasonló számú egész csíranövényt használtunk fel kezelésként, és három független kísérletet végeztünk.

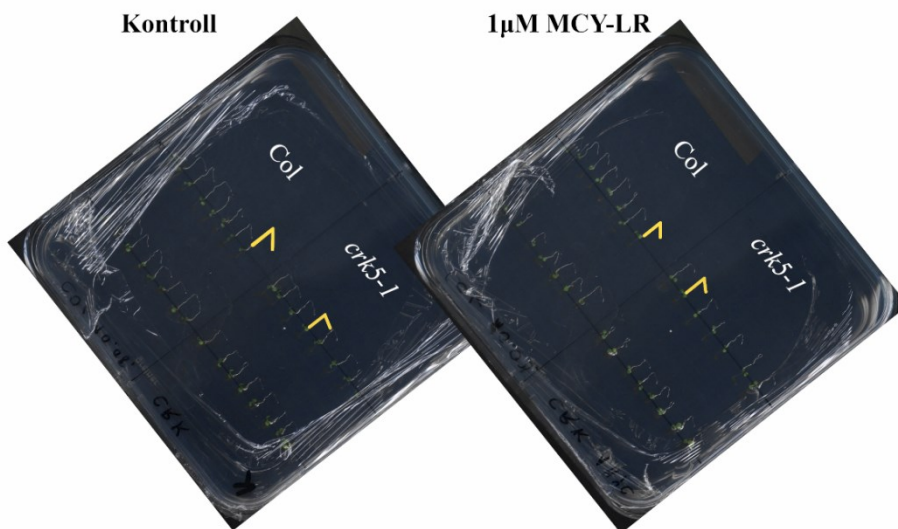
4.2.5 ROS kimutatása

A ROS szöveti lokalizációjához és mennyiségi meghatározásához élő csíranövények gyökereit használtuk az összes vizsgált genotípus esetén. A 2',7'-diklórfluoreszcein-diacetát (DCFH-DA) jelölés egy módszer az intracelluláris összes ROS vizsgálatára növényekben (Jambunathan, 2010). Ennek megfelelően a gyökereket PBS-ben mostuk, majd közvetlenül 10 μ M DCFH-DA-val (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) festettük meg, Garda és munkatársai (2016) leírása szerint. A DCFH-DA jelölés során a fotonok által kiváltott artefaktumok kialakulásának elkerülése érdekében a teljes eljárást sötétben végeztük. A mintákat 450-480 nm-en gerjesztettük, és hagyományos

Olympus BX43 fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán) vizsgáltuk. A fluoreszcencia intenzitásokat (a terület integrált optikai denzitás /AIOD-t mutató pixelek száma) a primer gyökércsúcsok és a differenciált gyökérszövetek esetében a Fiji szoftverrel (Schindelin *et al.*, 2012) számszerűsítettük. Kísérletenként és kezelésként legalább öt csíranövény gyökerét használtuk fel, és öt független kísérletet végeztünk.

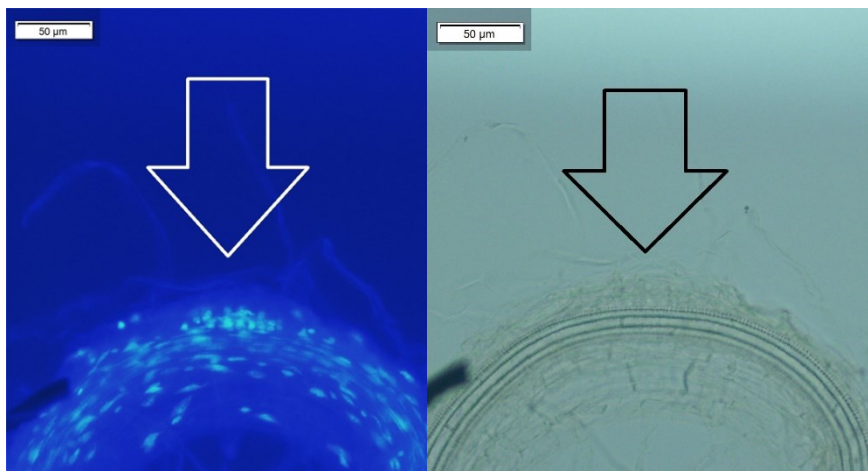
4.3 Növekedési és gravitációs vizsgálatok

A gravitropikus válasz vizsgálatot Rigó *et al.*(2013) alapján kisebb módosításokkal végeztük. Három napos *Arabidopsis thaliana* Col-0 és *crk5-1* mutáns csíranövényeket használtunk a kezelésekhöz. A gravitropikus válasz vizsgálatához a csíranövényeket függőlegesen, feles erősségű, 1% (w/V) szacharózt tartalmazó Gamborg-féle vitaminokkal (1968) módosított MS táptalajon neveltük, ellentétben Rigó *et al.* (2013) eljárásával, ahol csökkentett szacharózkoncentrációt (0,5% w/V) alkalmaztak. Ezt követően a csíranövényeket ugyanabba a táptalajba vittük át 1 μ M MCY-LR kezelés céljából. A függőlegesen nevelt csíranövényeket 135°-kal elforgattuk, és a gravitropikus válasz mértékét szkenneléssel rögzítettük 24 órával a forgatás után. A gravitropikus válasz mértékét a vízszintes alapvonal és a gyökércsúcs növekedési iránya közötti szög mérésével határoztuk meg a leírtak szerint, vagyis az elforgatott kiindulási helyzet és a 24 órás pozíció közötti szöget mértük (Rigó *et al.*, 2013) (4. ábra). A mért értékeket százalékosan hisztogramokon ábrázoltuk. Minden kezelés során legalább 100 vad típusú és *crk5-1* csíranövényt teszteltünk három különálló kísérletben.



4. ábra A gravitropikus válasz vizsgálatára használt kísérleti elrendezés Rigó et al., alapján (2013). A baloldali petricsésze a kontroll kezeletlen a jobb oldali 1 μ M MCY-LR kezelt. Mindkét petricsészébe az előre felrajzolt vonalak mentén helyeztünk el 15-20 Col-0 vagy *crk5-1* csíranövényt.

Az oldalgökér primordiumok és a fiatal oldalgökerek fejlődésének vizsgálatához nem gravistimulált három napos Col-0 csíranövényeket MCY-LR-rel kezeltük egy és két napig. A PFA-rögzített gyökerekben DAPI-val jelöltük a kromatint (lásd fent Immunhisztokémia és hisztokémia), amely nem csak a fiatal, a főgyökérből kilépő oldalgökereket, hanem a primordiumokat is egyértelműen kimutatta (5. ábra). Dubrovsky és társai (2009) munkája alapján primordiumnak tekintettük az oldalgökér fejlődésének minden szakaszát (ez jellemzően a V. VI. primordium fázist jelentete (Torres-Martínez *et al.*, 2019)), mielőtt a fő (primer) gyökérből kiléptek. Az egész gyökereket mikroszkóppal vizsgálva az oldalgökerek számát, hosszát és az első oldalgökér primordium megjelenési helyét is meghatároztuk. Minden kezelésnél legalább 200 csíranövényt teszteltünk, és a kísérleteket négyszer megismételtük.



5. ábra Az oldalgyökér primordiumok fluorescens mikroszkópos azonosítása. A két képen ugyanazon primordium látható baloldalon UV megvilágításban DAPI festés után (fehér nyíl), míg jobb oldalon fehér fényel átvilágítva (fekete nyíl). Skála 50µm (Pózer Erik Tamás felvétele).

4.4 SOD aktivitás gél „Native PAGE”-n

A SOD aktivitásának gélben történő vizsgálata a Giannopolitis és Ries (1977), valamint Bertrand és Eze (2014) által leírt módszerek adaptációja volt. A növényi anyagot folyékony nitrogénben porítottuk, majd extraháltuk egy olyan pufferben, amely foszfát-puffert, pH 7,5, 4% (w/V) vízdoldékony PVP 6000-t, 1x proteáz inhibitor koktélt, (Sigma-Aldrich, S8820), 1 mM PMSF-et (PanReac, Applichem, USA) tartalmazott. Az extraktumokat a Western-blot elemzéshez hasonlóan centrifugáltuk (lásd a 2.3.2 szakaszt), majd a minták fehérjetartalmát Bradford (1976) szerint mértük. Egyenlő mennyiségű fehérjét (40 µg) SDS nélküli Laemmli-pufferrel (1970) töltöttünk a gélekre. A szeparálógél 20% poliakrilamidot tartalmazott SDS nélkül. A fehérjék elválasztását követően a géleket steril ioncserélt vízzel mostuk, majd 2,5 mM nitroblue tetrazoliumban (NBT, Duchefa, Haarlem, Hollandia) inkubáltuk 20 percig, majd 28 µM riboflavin +28 µM N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diaminban (TEMED, Sigma-Aldrich) inkubáltuk. A géleket megvilágítottuk

(1050 lumenes LED fényforrással), így a SOD aktivitási sávok világos foltként jelentek meg a sötét háttéren. A sávok intenzitása korrelált az enzimaktivitással, és a GelAnalyzer 19.1® szoftverrel (www.gelanalyzer.com) számszerűsítettük (Ifj. Lázár István, PhD id. Lázár István, PhD, CSc). A gélben végzett SOD aktivitásvizsgálatokhoz kísérletenként és kezelésenként legalább harminc csíranövény gyökerét (vagy a megfelelő számú egész csíranövényt) használtuk, és három független kísérletet végeztünk.

4.5 Protein-foszfataz aktivitás vizsgálata

A teljes protein-foszfataz aktivitást, amely magában foglalja a PP1 és PP2A aktivitást *in vivo*, a korábban leírtak szerint mértük (Máthé *et al.*, 2013; Garda *et al.*, 2018). A protein-foszfataz aktivitás mérést dr. Kónya Zoltán végezte és prof. Erdődi Ferenc tette lehetővé (Debreceni Egyetem ÁOK Orvosi Vegytani Intézet). Az *Arabidopsis thaliana* Col-0 teljes gyökereit 50 mM Tris-HCl-t (pH 7,5), 0,1 mM EDTA-t, 0,2 mM EGTA-t, 0,1 % (w/V) b-merkaptotetanolt, 1 mM PMSF-et (Sigma-Aldrich) tartalmazó pufferrel extraháltuk. 0,5% (V/V) proteáz inhibitor koktél (Roche Applied Science, Indianapolis, USA). A kivonatok fehérjetartalmát Bradford (1976) szerint határoztuk meg, így a vizsgálatokat azonos mennyiségű fehérjével végeztük. Szubsztrátként ³²P-MLC20-at (foszforilált pulyka zúza, 20 kDa miozin könnyű lánc, ³²P-vel jelölt) használtak. A specifikus foszfataz aktivitásokat pmol [32Pi]-ben, mg fehérje 1-ként adtuk meg (Erdődi *et al.*, 1995), a kezeletlen növény (Col0) aktivitásának százalékában (100%). A protein-foszfataz aktivitás vizsgálatokat kezelésenként három párhuzamos mérésben és három különálló kísérleti ismétlésben végeztük.

4.6 Statisztikai módszerek

Minden számszerűsített adatot a Systat Sigma Plot 10.0/12.0 ® szoftver (Systat Software, San Jose, CA) segítségével ábrázoltunk – az ábrák az átlag ± SE értékeket mutatják. Kivétel ezalól a gravitropikus válaszokra vonatkozó adatok, amelyeket az R Studio 1.2-es verziójával és ggplot2 grafikus csomaggal ábrázoltunk (Wickham, 2016). A kezeletlen és kezelt növények közötti különbségek statisztikai szignifikanciáját Mann-Whitney Rank Sum Test és t-próbák segítségével vizsgáltuk.

A protein-foszfataz mutánsok esetében a kezeletlen és a kezelt növények közötti, valamint a különbségek statisztikai szignifikanciáit kétutas ANOVA (posthoc: Holm-Sidak módszer) és t-próbák segítségével vizsgáltuk. A különbségeket az alkalmazott statisztikai beállításoknak megfelelően $P < 0,1$ esetén tekintettük marginálisan szignifikánsnak és $P < 0,05$ esetén statisztikailag szignifikánsnak. Az adatelemzés során figyelembe vettük a vizsgált paraméterek MCY-LR és DQ általi változásának hipotézisét, és azt, hogy külön két tényezőt elemeztünk (genotípustól és MCY-LR/DQ kezeléstől való függés). A P-értékeket az ábrákon 3 szinten jelöljük: genotípuson belüli kezeléseket (kezeletlenhez képest), P-érték $< 0,001$ ***; $< 0,05$ **; $< 0,1$ *; mutánsok változásai a Col-0-hoz képest, P-érték: $< 0,001$ ×××; $< 0,05$ ××; $< 0,1$ ×. A szórásokat minden esetben standard hibaként számoltuk ki (SE). Amint a fentebb említettük, minden kísérlethez csoportonként legalább 3 független megfigyelést használtunk.

5 Eredmények

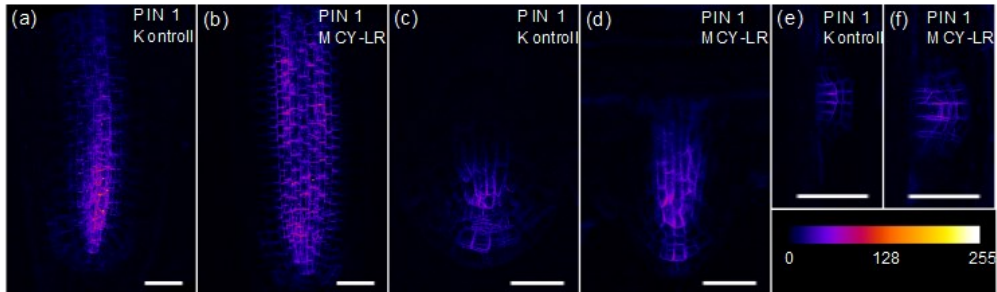
5.1 MCY-LR hatása az auxin eloszlásra

Az MCY-LR auxin efflux carrier-ek (PIN1, PIN2, PIN3, PIN7), a PIN-ek szintjére gyakorolt hatását PIN:GFP T-DNS inszerciós mutáns növényekben és immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. Mindkét megközelítéssel ki tudtuk mutatni a PIN fehérjék normális poláris lokalizációját és eloszlását, szubcelluláris és szöveti szinten a kezeletlen *Arabidopsis thaliana* csíranövények gyökereiben (6. ábra/a, c, e; 7. ábra/a, c; 8. ábra/a, c, e).

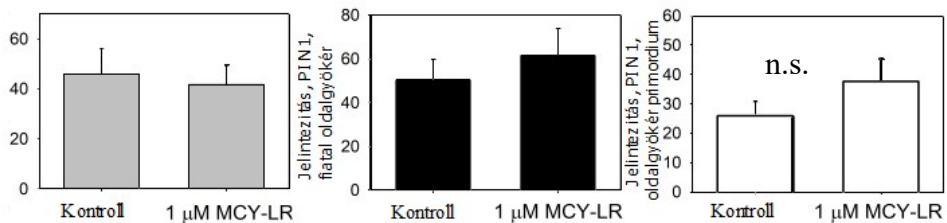
5.1.1 PIN1 és PIN2 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatai

A kezeletlen primer gyökerek esetében a PIN1 fehérje a sztélében, a PIN2 fehérje pedig a kéregben és az epidermiszben lokalizálódott (6. ábra/a és 7. ábra/a, 8. ábra/a). Az immunhisztokémiai jelintenzitások alapján a PIN-szintek egyértelmű csökkenését mértük a minden vizsgált idő intervallumban (24 és 48 óra) MCY-LR kezelések hatására. Az 1 μM MCY-LR egy (8. ábra/b), két (8. ábra/d) és öt (8. ábra/f) nap után csökkentette a PIN1 és PIN2 fehérjék szintjét a kezeletlen növényekhez képest. A PIN:GFP növények esetében az MCY-LR szintén csökkentette a PIN1 és PIN2 szintjét egynapos kezelés után (6. ábra/b és 7. ábra/b). Ezek a csökkenések azonban nem bizonyultak szignifikánsnak (6. ábra/g és 7. ábra/e gyökérkezdemények). A primer gyökerekkel ellentétben mind a PIN1, mind a PIN2:GFP jelei növekedtek a fiatal oldalgökökben MCY-LR jelenlétében (6. ábra/d. és 7. ábra/d.), ez a növekedés szignifikáns volt a PIN2:GFP esetében (7. ábra/e. fiatal oldalgökök). Az oldalgökér primordiumok esetében 1 μM MCY-LR a PIN1:GFP jel enyhe, de nem szignifikáns növekedését idézte elő (6. ábra/e, f, g/ oldalgökér primordiumok). A PIN2:GFP esetében a vizsgált

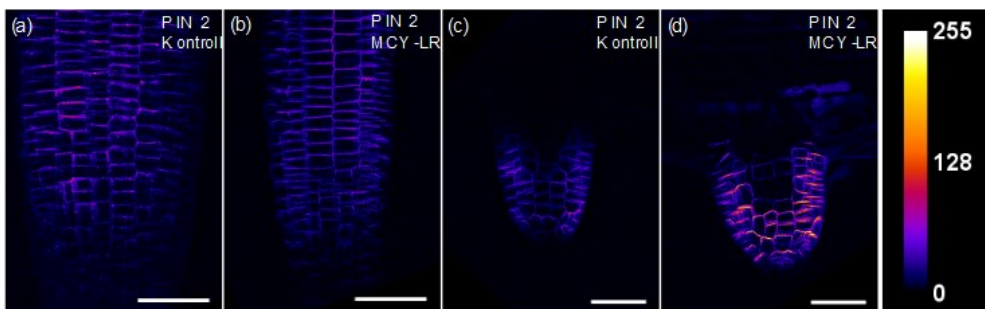
csíranövényekben minimális volt az oldalgöcker primordiumok száma, így ezt a paramétert nem tudtuk számszerűsíteni.



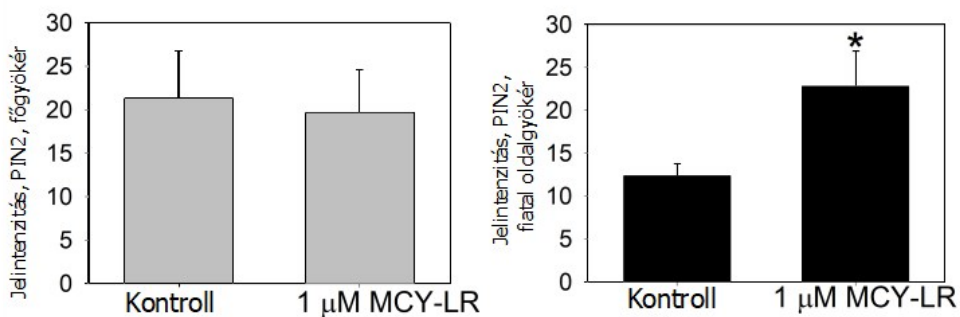
(g)



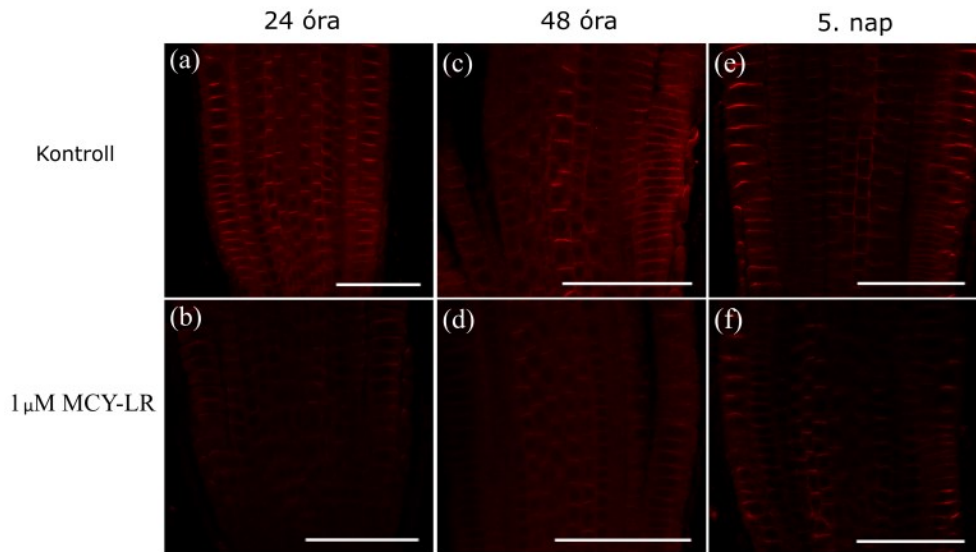
6. ábra A PIN1 jelintenzitás változása MCY-LR hatására a primer és az oldalgöckerekben (a-f). A képeken a gyökerecsúcsok CLSM-felvételeinek PIN1:GFP szinkódolt (hőképes) 2D vetületeinek jelintenzitásai láthatóak. A 24 órás 1 μM MCY-LR kezelés módosítja a PIN-szintet *Arabidopsis thaliana*-ban, primer gyökerek (a, b), fiatal oldalgöckerek (c, d) és oldalgöcker primordiumok (e, f) jelintenzitásait. Méretskálák: 50 μm. Az *Arabidopsis thaliana* gyökerecsúcsokból származó PIN1:GFP jelek kvantitatív ábrázolása a primer és oldalgöckerekben 24 órás kezeléseknél (g). A jelintenzitást AIOD (terület integrált optikai denzitás/AIOD) értékeként számoltuk ki. Balra: primer gyökerek, középen: fiatal oldalgöckerek, jobbra: oldalgöcker primordiumok. * $P < 0,05$ (t-teszt), szórás SE $n=5$, nem szignifikáns (n.s.).



(e)



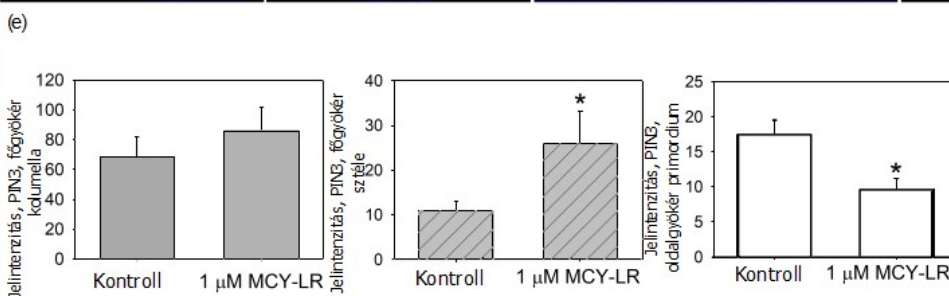
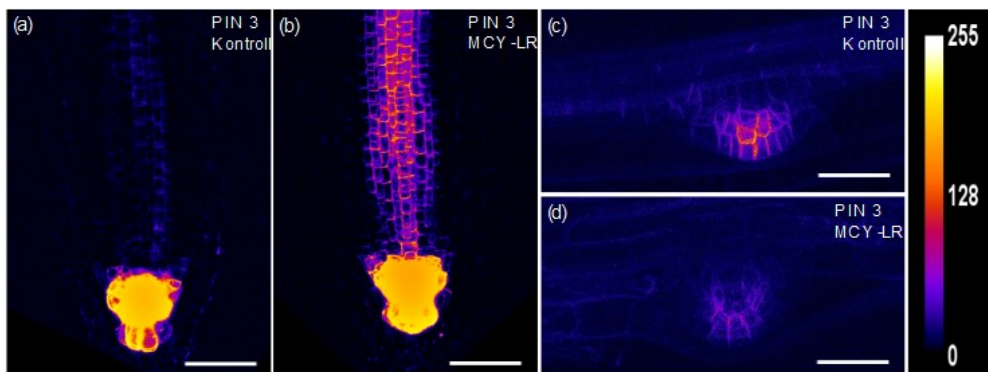
7. ábra A MCY-LR hatása a primer és az oldalgyökerek PIN2 jelintenzitására. (a-d) A képeken a gyökércsúcsok CLSM-felvételeinek PIN2:GFP szinkódolt (hőterképes) 2D vetületeinek jelintenzitásai láthatóak. 24 órás 1 μM MCY-LR-nel történő kezelés módosítja a PIN-szintet az *Arabidopsis thaliana*-ban, primer gyökerek (a, b); fiatal oldalgyökerek (c, d) jelintenzitásait. Méretskálák: 50 μm. Az *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcsokból származó PIN2:GFP jelek kvantitatív ábrázolása a primer és oldalgyökerekben 24 órás kezelésknél (e). A jelintenzitást AIOD (terület integrált optikai denzitás/AIOD) értékeként számoltuk ki. Balra: primer gyökerek, jobbra: fiatal oldalgyökerek. * $P < 0,05$ (t-teszt), szórás SE $n=5$.



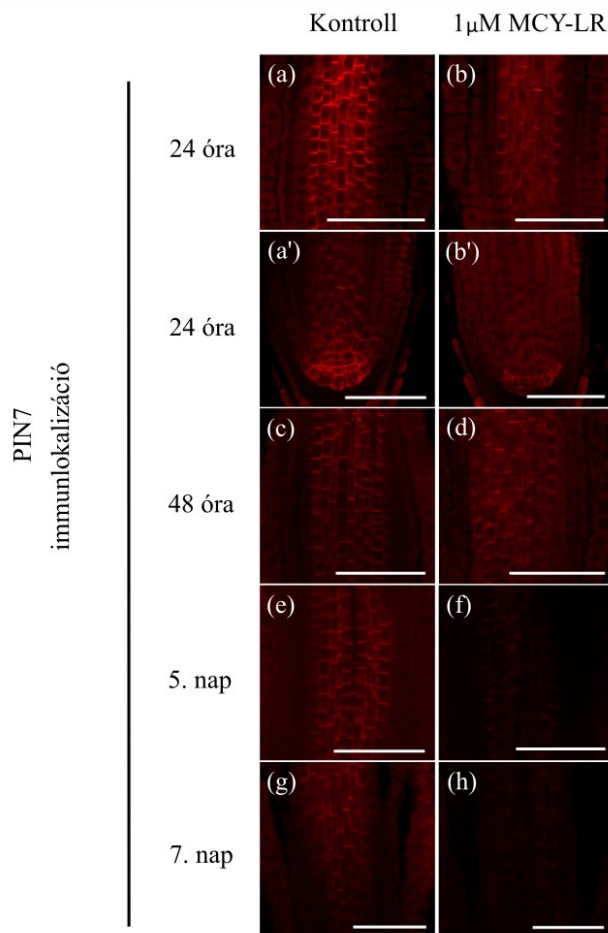
8. ábra A PIN1 és PIN2 immunhisztokémiai vizsgálata. A Col-0 növények konfokális mikroszkópiája azt mutatja, hogy az MCY-LR kezelés csökkenti a PIN-ek szintjét az *Arabidopsis thaliana* csíranövények primer gyökércsúcsaiban. Főgyökerek, 24 órás kezeletlen (a), 1 μ M MCY-LR (b). Főgyökerek, 48 órás kezeletlen (c), 1 μ M MCY-LR (d). Főgyökerek, 5 napos kezeletlen (e), 1 μ M MCY-LR (f). Skálák: 50 μ m. (dr. Garda Tamás felvételei)

5.1.2 PIN3 és PIN7 szubcelluláris lokalizációjának vizsgálatai

A PIN3:GFP növények esetében a kezeletlen primer gyökerek erős GFP-expressziót mutattak a gyökérsüveg kolumellájában és gyengébb expressziót a sztélében (9. ábra/a). 24 órás MCY-LR-expozíció esetén a GFP-jelek a primer gyökércsúcsok kolumellájában és a sztélében is megnövekedtek, és a sztélé esetében ez a változás szignifikáns volt (9. ábra/b, e/ primer gyökér kolumella és sztéle). A kvantitatív elemzés elvégzéséhez nem volt elegendő számú PIN3:GFP fiatal oldalgyökér. Az oldalgyökér primordiumok esetében az MCY-LR szignifikánsan csökkentette a PIN3:GFP jelét (9. ábra/c, d, e oldalgyökér primordiumok). Hét napos expozíció után 1 μ M MCY-LR a PIN3:GFP jel csökkenését okozta a primer gyökerekben. A PIN7 immunhisztokémiai jelölése a primer gyökerekben normális eloszlást mutatott, magas szintekkel a kezeletlen növényekben a gyökércsúcs sztéléjében és a disztális szegmenseiben (10. ábra/a' a', c, e, g). Az 1 μ M MCY-LR kezeléseknél a PIN7 szintje minden vizsgálati időpontban csökkent a sztélében (10. ábra/b, d, f, h) és a gyökércsúcs disztális szegmenseiben 24 órás expozíció után (10. ábra/b').



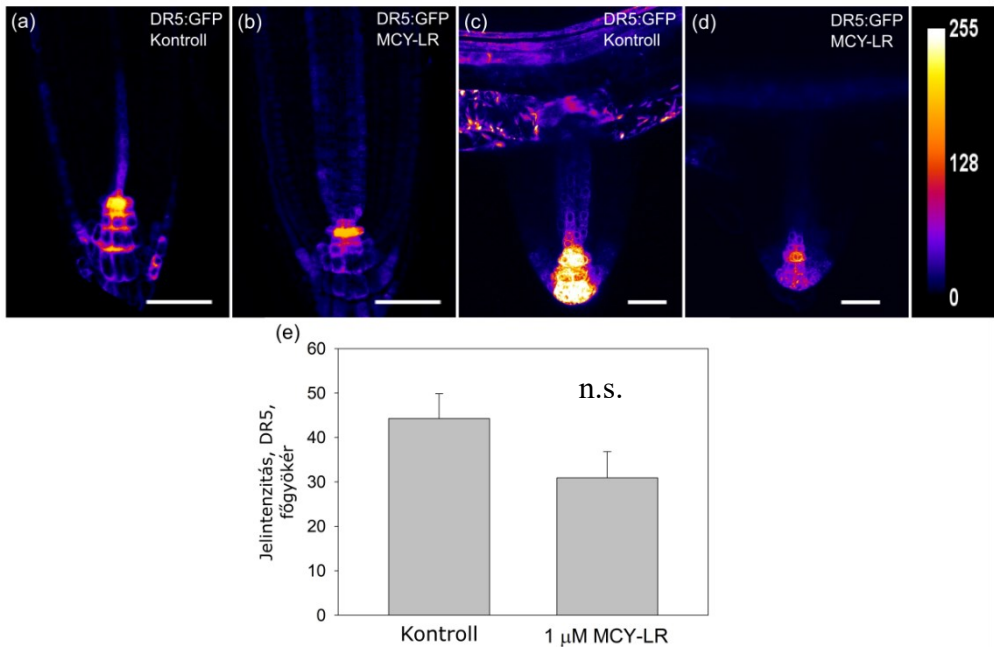
9. ábra A MCY-LR hatása a primer és az oldalgöckerek PIN3 jelintenzitására (a-d). A képeken a gyökércsúcsok CLSM-felvételeinek PIN3:GFP szinkódolt (hőértékpes) 2D vetületeinek jelintenzitásai láthatóak. 24 órás 1 μM MCY-LR-rel történő kezelés módosítja a PIN3 szintjét az *Arabidopsis thaliana*-ban, primer gyökerek (a, b) és oldalgöckér primordiumok (c, d) jelintenzitásait. Méretskálák: 50 μm. Az *Arabidopsis thaliana* gyökércsúcsokból származó PIN3:GFP jelek kvantitatív ábrázolását tüntettük fel a primer és oldalgöckerekben 24 órás kezeléseket (e). A jelintenzitást AIOD (terület integrált optikai denzitás/AIOD) értékeként számoltuk ki. Balra: primer gyökerek, kolumella; középen: primer gyökerek, sztélé; jobbra: oldalgöckér primordiumok. A csillagok az MCY-LR kezeléseket és a kezeltetlen közötti szignifikáns különbségeket jelzik. * $P < 0,05$ (t-teszt), szórás SE $n=5$.



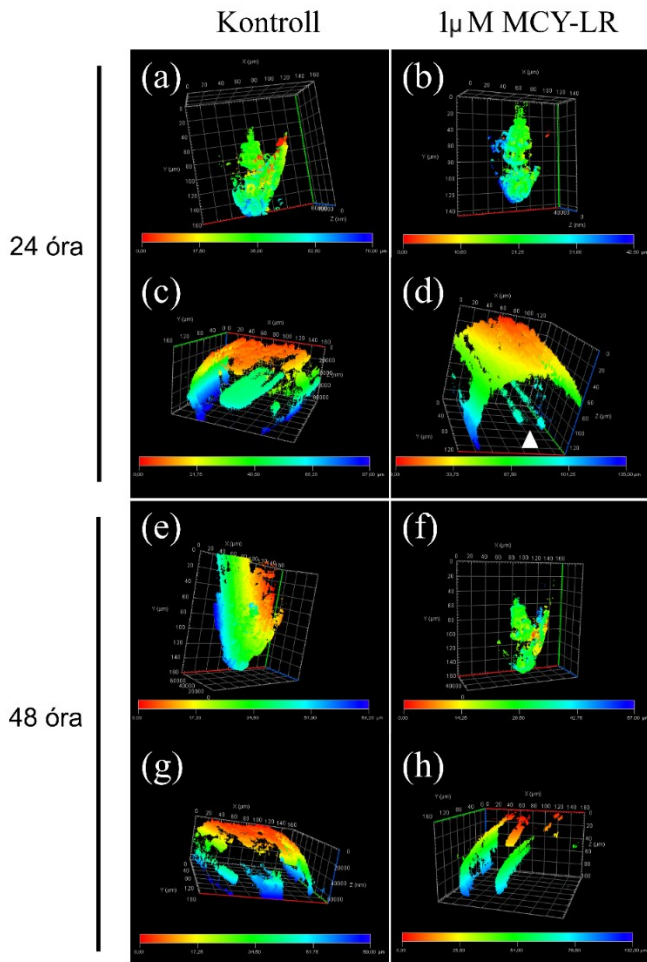
10. ábra A PIN7 jelek CLSM immunhisztokémiai vizsgálata. A MCY-LR csökkenti a PIN7 szintjét a Col-0 csíranövények primer gyökerében. A PIN7-et 24 óra (a-b'), 48 óra (c, d), 5 nap (e, f) és 7 nap (g, h) után jelöltük. A 24 órás kezelések esetében a PIN7 eloszlása a sztélében (a, b) és a gyökércsúcsok'an 'a', b') látható. A többi kezelés esetében csak a sztéle jelölése látható. Kezeletlen:'(a, a', c, e, g) minták; 1 μ M MCY-LR kezelések:'(b, b', d, f, h) . Skálák: 50 μ m. (dr. Garda Tamás felvételei)

5.1.3 DR5rev:GFP riporter mikroszkópos vizsgálata

A gyökerekben az auxin hatására bekövetkező géneexpressziós válaszok vizsgálatához DR5rev:GFP auxin riporter konstrukciót hordozó *Arabidopsis thaliana* növényt használtunk. A GFP-jelintenzitások alapján készített 2D hőtésképes Z irányú vetületek kvantitatív meghatározása nem szignifikáns, de konzisztens csökkenést mutatott az auxin válaszokban a primer gyökércsúcsokban (11. ábra. /a, b, e). Az 1 μ M MCY-LR-rel végzett 24 órás kezelés jól láthatóan csökkentette a GFP jelet a DR5rev:GFP növények fiatal oldalgyökereiben (11. ábra/c. és d.). A fiatal DR5rev:GFP csíranövényekben azonban nagyon kevés fiatal oldalgyökér vagy oldalgyökér-primordium volt, ezért itt nem tudtuk elvégezni az eredmények statisztikai kiértékelését. A gyökérszövetek auxin tartalmának/válaszának eloszlásáról szóló pontosabb adatok megértése érdekében a GFP-jelek 3D hőtésképes képeit is elkészítettük. Ezek megmutatták az auxinválasz eloszlását a primer gyökerek csúcsában és a differenciálódási zónában. A kezeltetlen növények esetében a GFP jeleket főként a gyökérsapka kolumellájában és a gyökércsúcsok sztéléjében (12. ábra/a, e), valamint a differenciálódási zónák szubepidermális sejtrétegeiben és sztéléjében detektáltuk (12. ábra/c, g). Az 1 μ M MCY-LR-rel végzett 24 órás kezelés a GFP-jelek kiterjedésének csökkenését idézte elő a gyökércsúcsokban (12. ábra/b.) és a differenciált gyökérszónákban (12. ábra/d). Ez utóbbiak esetében az auxin szintek/válaszok jól láthatóan csökkentek a sztélében (12. ábra/d, nyílhegy). A 48 órán át, 1 μ M MCY-LR-rel történt kezelések során végzett vizsgálatok szintén az auxin szintek/válaszok csökkenésére utal (12. ábra/f, h).



11. ábra DR5rev:GFP jelintenzitás változások a primer és oldalgyökerekben. A képeken a gyökerecsúcsok CLSM-felvételeinek DR5rev:GFP szinkódolt (hőtésképes) 2D vetületeinek jelintenzitásai láthatóak. 1 μM MCY-LR csökkenti az *Arabidopsis thaliana* auxinszintjét 24 órás kezelés után primer gyökerek (a, b) és kialakuló oldalgyökerek (c, d) esetén. Méretskálák: 50 μm. DR5rev:GFP jelintenzitás diagrammja enyhe csökkenést mutat az *Arabidopsis thaliana* gyökerecsúcsokban MCY-LR kezelés mellett (e). A jelintenzitást AIOD (átlagos szürkeérték, terület integrált optikai denzitás/AIOD) értékeként számoltuk ki. * $P < 0,05$ (t-test), szórás SE $n=5$, nem szignifikáns (n.s.).



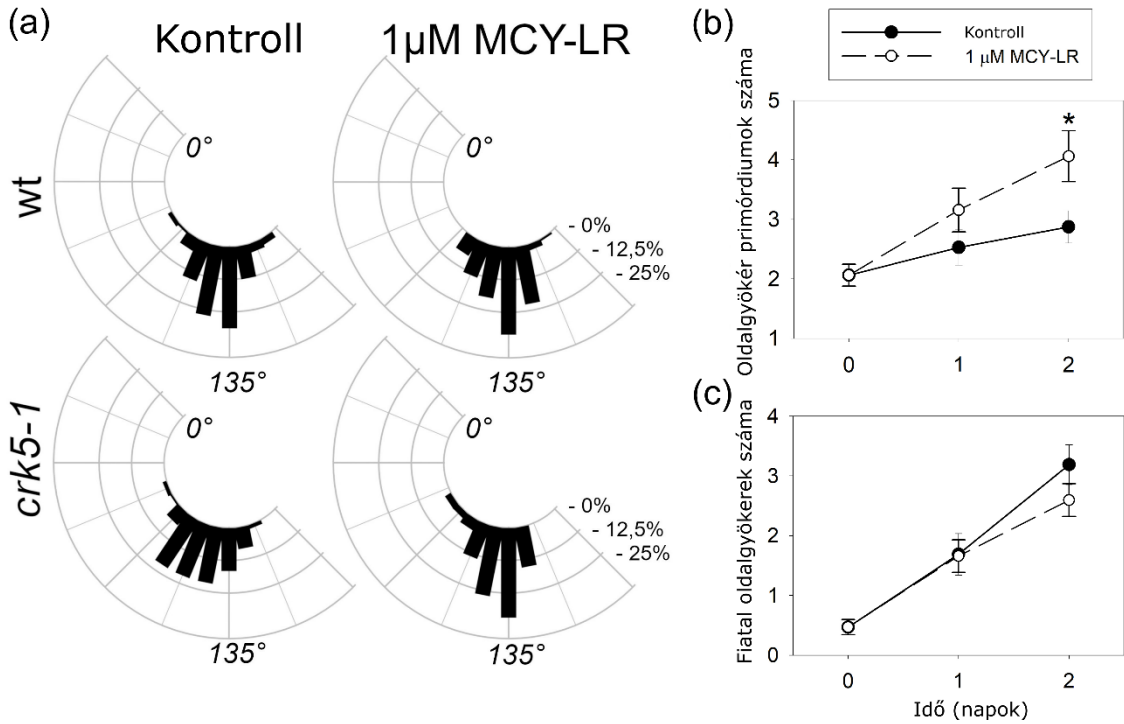
12. ábra A MCY-LR a DR5rev::GFP jel csökkenését idézi elő a csíranövények főgyökerében. Mélységi szinkódolt jelintenzitások (3D hő térképek) a gyökércsúcsok (a, b és e, f) és a differenciált gyökérszóna (c, d és g, h) esetében DR5::GFP növényekben, amelyeket 1 μ M MCY-LR-rel kezeltünk 24 órán keresztül (a-d) és 48 órán keresztül (e, h). Kezeletlen: (a, c, e, g); 1 μ M MCY-LR: (b, d, f, h). A nyílhegy a (d) ábrán a sztélé csökkent auxin szintjére utal (dr. Garda Tamás felvétele).

5.1.4 Gravistimuláció és növekedési vizsgálatok

A DR5rev:GFP növényekkel végzett kísérletek kimutatták, hogy a MCY-LR beavatkozik az auxin szintekbe/válaszokba, ezért megvizsgáltuk, hogy ez az inhibitor hogyan befolyásolhatja az auxin által vezérelt válaszokat, például a gyökér gravitropizmust vagy a gyökérfejlődést. Méréseink kimutatták, hogy a MCY-LR nem befolyásolta a Col-0 növények gravitropikus válaszát (13. ábra/a). A kezeletlen *crk5-1* funkcióvesztéses mutánsban (a CRK5 funkcióját (részletesebben lásd az

Irodalmi áttekintés fejezetben) a gravitropikus válasz késik (13. ábra/a bal alsó grafikon), azonban 1 μ M MCY-LR kezelés hatására a késés megszűnik és helyre áll a normál gravitropikus válasz, azaz jelen esetben 135°-os hajlás. Ezek a megfigyelések megerősítették Rigó et al. (2013) megfigyeléseit, még eltérő fizikai laboratóriumi körülmények és a táptalaj megnövelt szacharóztartalma mellett is. Érdekes módon a *crk5-1* mutáns abnormális gravitropikus válaszát az MCY-LR a kezeletlenhez közeli szintre állította vissza (13. ábra/a).

A növekedési vizsgálatokban a Col-0 növények esetében az 1 μ M MCY-LR kezelés az oldalgyökér primordiumok és a fiatal oldalgyökerek számában időfüggést mutatott (13. ábra/b és c). A MCY-LR kezelés elősegítette az oldalgyökerek iniciációját, mivel két napos expozíció után jelentősen növelte a primordiumok számát. Ebben a szakaszban a primordiumok száma majdnem megduplázódott a kísérlet kezdetéhez képest, míg a kezeletlen esetében a primordiumok fejlődése viszonylag lassú volt (13. ábra/b). A kialakuló oldalgyökerek száma csökkent, de nem szignifikáns módon, még két nap expozíció után is (13. ábra/c). Ez azt jelentette, hogy a cianotoxin serkentette az oldalgyökér primordiumok fejlődését, de ezt nem követte további fejlődésük.

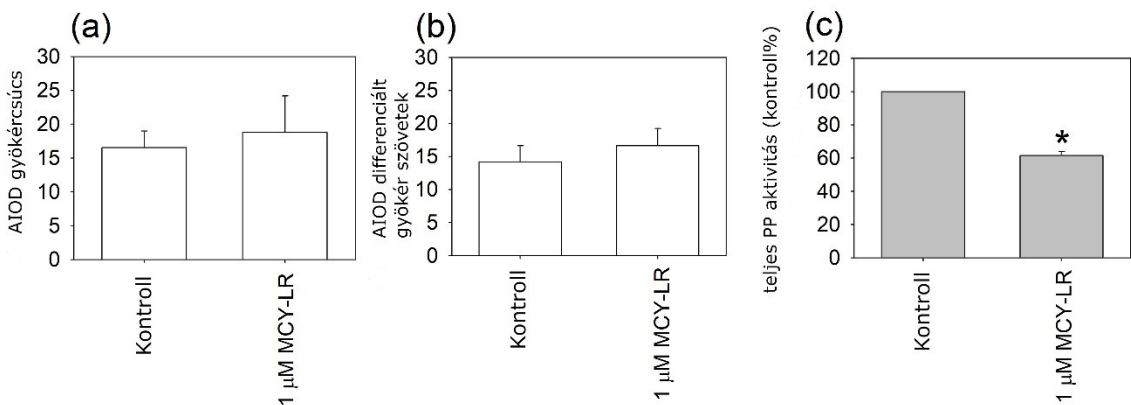


13. ábra (a) Az MCY-LR helyreállítja a *crk5-1* mutánsok abnormális gravitropikus válaszát. A növényeket a Rigó et al. (2013) által leírt módon gravistimuláltuk. Az (a) ábrarész a 135°-kal elforgatott csíranövények primer gyökereinek gravitációs válaszánaak hisztogramja. Az MCY-LR idő- és dóziszfüggő hatása az oldalgökerek fejlődésére Col-0 csíranövények nem gravistimulált gyökereiben (b, c): az oldalgökér primórdiumok száma (b); a fiatal oldalgökerek száma (c). A csillag a (b) pontban a kezeletlen és a kezelés közötti szignifikáns különbséget jelzi. * $P < 0,05$ (t-test), szórás SE $n=4$.

5.1.5 A MCY-LR hatása a ROS termelésre és a protein-foszfataz aktivitásra a Col-0 gyökerekben

A DCFH-DA mérések alapján a Col-0 csíranövényekben az MCY-LR nem változtatta meg a ROS szintet a primer gyökércsúcsokban 24 órás kezelés esetén (14. ábra/a). A gyökér differenciálódási zónájában a ROS szintek nem változtak jelentősen a MCY-LR kezelés hatására (14. ábra/b). A foszfataz mutánsokkal végzett méréseink során is hasonló eredményeket kaptunk a kezeletlen Col-0 esetén (16. ábra).

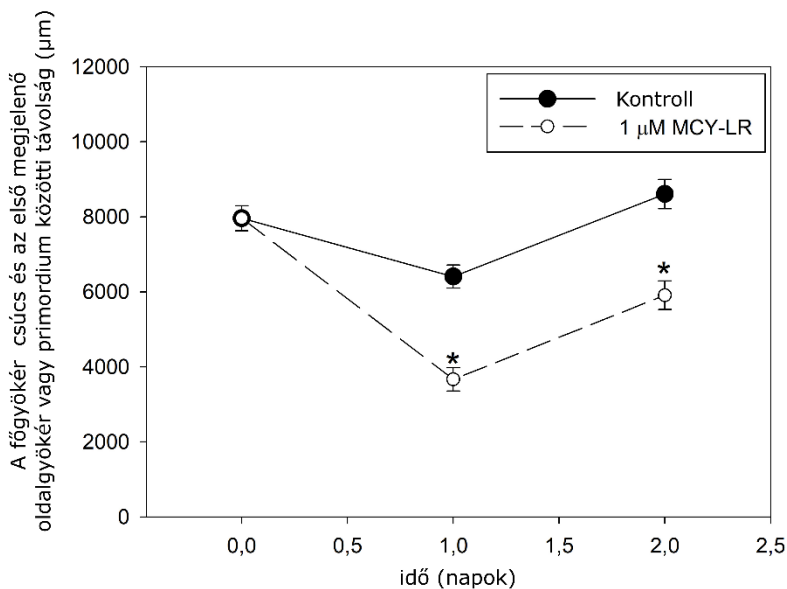
Vizsgáltuk a MCY-LR hatását a protein-foszfatazok aktivitására is. Az izotópos protein-foszfataz mérések alapján az össz szerin-treonin protein-foszfataz (főként PP1 és PP2A együttes) aktivitását jelentősen gátolta (közel 50%-os gátlás) az 1 μ M MCY-LR a 24 órán keresztül kezelt növények gyökérkivonataiban (14. ábra/c).



14. ábra A 24 órás MCY-LR kezelés hatása a ROS szintre, DCFH-DA festés intenzitása alapján a gyökércsúcsokban (a) és a differenciált gyökérszövetekben (b). A DCFH-DA jelintenzitást AIOD (terület integrált optikai denzitás érték) akapján számoltuk. Az 1 μ M MCY-LR hatását a teljes fehérje-foszfataz aktivitásra 24 órás expozíció után mértük (c). A csillag a kezeletlen és a kezeléseik közötti szignifikáns különbséget jelzi. A protein-foszfataz aktivitás mérést dr. Kónya Zoltán és prof. Erdődi Ferenc végezte. * $P < 0,05$ (t-test), szórás SE $n=3$.

5.1.6 A MCY-LR hatása az oldalgökök megjelenésére

A 5 napos csíranövények gyökerinek mikroszkópos vizsgálata során feltártuk, hogy a MCY-LR képes gátolni a primer gyökök megnyúlását a Col-0 növényekben. Továbbá a 1 μM MCY-LR jelentősen csökkentette az első oldalgöke primordium távolságát a primer gyökércsúcstól 24 órás kezelések után. Ez a hatás két napos (48 óra) kezelés után is fennállt (15. ábra).



15. ábra A primer gyökércsúcs és a legközelebbi oldalgöke primordium közötti távolság. A MCY-LR csökkenti a gyökér fejlődési zónák hosszát, mivel lerövidíti a primer gyökércsúcs és az első primordium kialakulása közötti távolságot. A csillagok a kezeletlen és a kezeléseket közötti szignifikáns különbségeket jelzik az adott időpontokban. * $P < 0,05$ (t-test), szórás SE $n=5$.

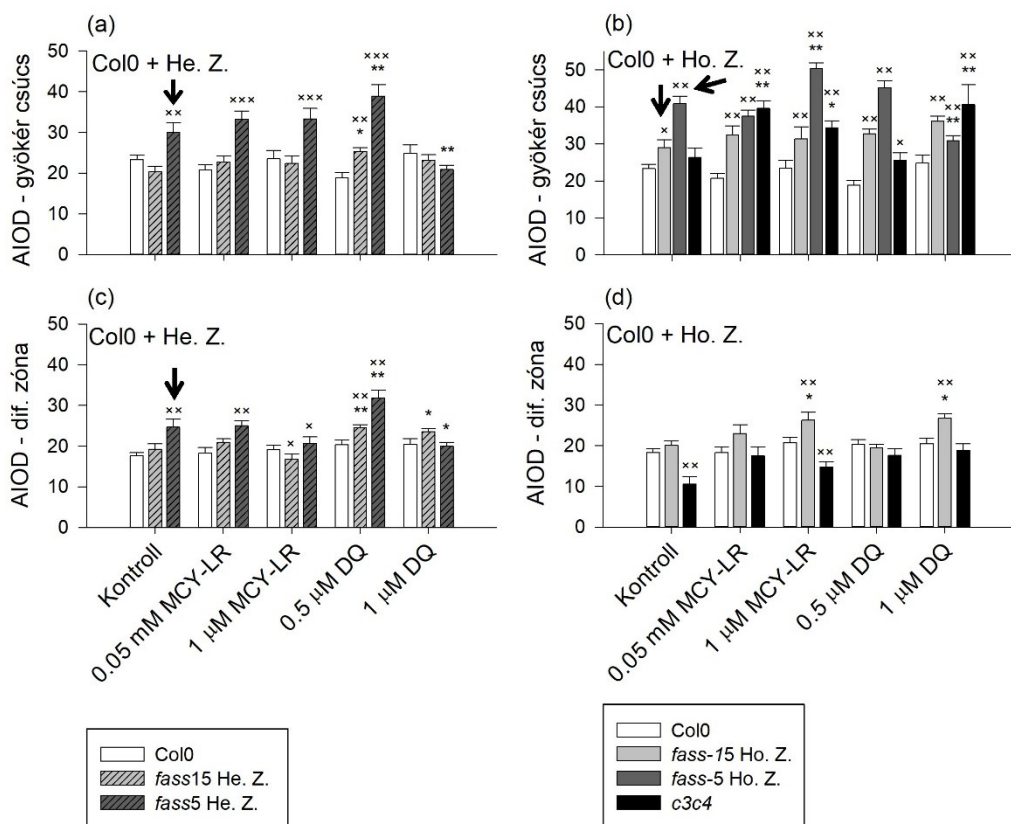
5.2 PP2AB" és C alegység szerepe az oxidatív stressz során

Az *Arabidopsis thaliana* protein-foszfataz mutánsainak az átlagosnál magasabb ROS szintjük van, és a MCY-LR/DQ kezelések tovább növelik az oxidatív stresszel szembeni érzékenységüket.

Amikor összehasonlítottuk az *Arabidopsis thaliana* Col-0 és protein-foszfataz mutánsok genotípusainak kezeletlen (azaz MCY-LR/ DQ kezelések nélkül) primer gyökereit, jelentős különbségeket észleltünk a ROS szintek tekintetében. A *c3c4* (katalitikus alegység) mutánsok hasonló ROS szintet mutattak a primer gyökerek csúcsaiban, de jelentősen alacsonyabbat a gyökér differenciálódási zónájában (16. ábra/b, d). Ezzel szemben a *fass-5* és *fass-15* (B" alegység) mutánsok homozigóta recesszív genotípusai a gyökércsúcsokban jelentősen eltértek a Col-0-tól (16. ábra/b nyilak). A *fass-5* esetében ahol a homozigóta recesszív genotípus erősebb fenotípusos változást mutat, mint a *fass-15* (Spinner *et al.*, 2013) magasabb ROS szintet tapasztaltunk, mint a Col-0 és még a *fass-15* csíranövényeknél is, mind a homozigóta recesszív, mind a heterozigóta genotípusban (16. ábra/a-c nyilak). A *fass-5* esetében a differenciált gyökereket csak a heterozigótáknál tudtuk vizsgálni (16. ábra/c), mivel a homozigóta recesszív mutánsokon nem fejlődnek jól differenciált gyökérszövetek.

A különböző genotípusú primer gyökerek a kezelésekre adott reakcióiban is különböztek. A Col-0 gyökerek nem mutattak szignifikáns változásokat a ROS tartalomban MCY-LR/DQ kezelések hatására (16. ábra/a-d). Ezzel szemben a *c3c4* mutánsokat mind a PP2A inhibitor MCY-LR-nel, mind a ROS induktor DQ-tal végzett kezelések során jelentősen megemelkedett összes ROS szint jellemezte a primer gyökércsúcsokban (16. ábra/b, d). A differenciálódási zónában mind a MCY-LR, mind a DQ ROS emelkedést indukált, de ezek az emelkedett *c3c4* ROS értékek még mindig a Col-0 kezeletlen ROS szintjei alatt voltak (16. ábra/d). A *fass-15* heterozigóta

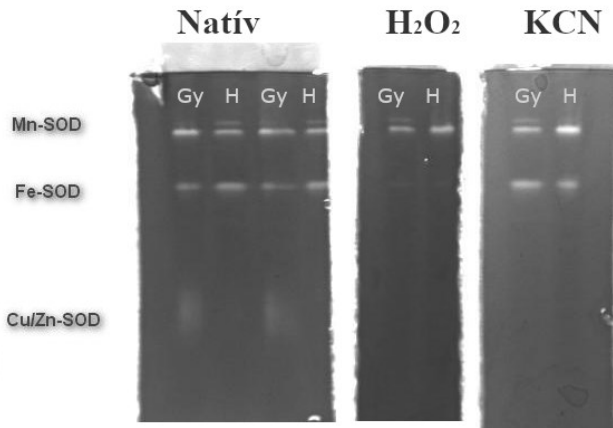
mutánsok esetében a MCY-LR és a DQ kezelések csak enyhe növekedést indukáltak a gyökércsúcsokban, míg a differenciált gyökérszövetekben a DQ a ROS szintek jelentős emelkedését idézte elő (16. ábra/a, c). A homozigóta recesszív protein-foszfatáz mutánsok esetében 1 μ M MCY-LR és 1 μ M DQ szignifikáns módon növelte a ROS szinteket a differenciált gyökérszövetekben (16. ábra/b, d). A *fass-5* mutáns esetében 1 μ M MCY-LR hatására szignifikáns emelkedés volt mérhető a homozigóta recesszív gyökércsúcsokban (16. ábra/b). A 0,5 μ M DQ növelte, míg az 1 μ M DQ marginálisan szignifikánsan csökkentette a ROS szintet mind a homozigóta recesszív, mind a heterozigóta differenciált gyökérszövetekben, ahol vizsgálható volt (16. ábra/a-c).



16. ábra Genotípus és toxinkezelés függő módon különbözik a ROS jelintenzitás a vad típusú és a foszfatáz mutánsok primer gyökerek gyökércsúcsaiban (a, b) és a differenciált gyökérszövetekben (c, d), DCFH-DA jelintenzitás alapján. A jelintenzitást AIOD (átlagos szürkeérték, terület integrált optikai denzitás/AIOD) értékeként számoltuk ki. Col-0 vs” *fass* (B” alegység) mutáns heterozigóták: (a, c); Col-0 vs. *fass* (B” alegység mutánsok), homozigóta recesszívek és *c3c4* (katalitikus alegység mutáns) homozigóta recesszívek: (b, d). Az (a, b, c) nyilak azt jelzik, hogy a *fass* kezeletlen mutánsokban a ROS szintek magasabbak, mint a Col-0 kezeletlenben. A szignifikáns különbségeket ($P < 0,1$) * és ** (a kezeletlen és a kezelések közötti különbségek szignifikanciája egy adott genotípuson belül) és „X, XX és XXX” (a Col-0 kezeletlenhez viszonyított szignifikáns különbségek) jelzi az Anyagok és módszerek 3.6. szakasza szerint. Kétutas ANOVA (posthoc: Holm-Sidak), szórás SE n=6.

5.2.1 A szuperoxid-dizmutáz (SOD) izoenzimek aktivitása

A SOD natív aktivitás géljein a SOD aktivitások három különböző izoformáját mutattuk ki. A KCN-nel és H₂O₂-vel végzett gátlási vizsgálatok segítségével különítettük el a Mn-SOD, Fe-SOD és Cu/Zn-SOD aktivitási sávok helyét (17. ábra.).



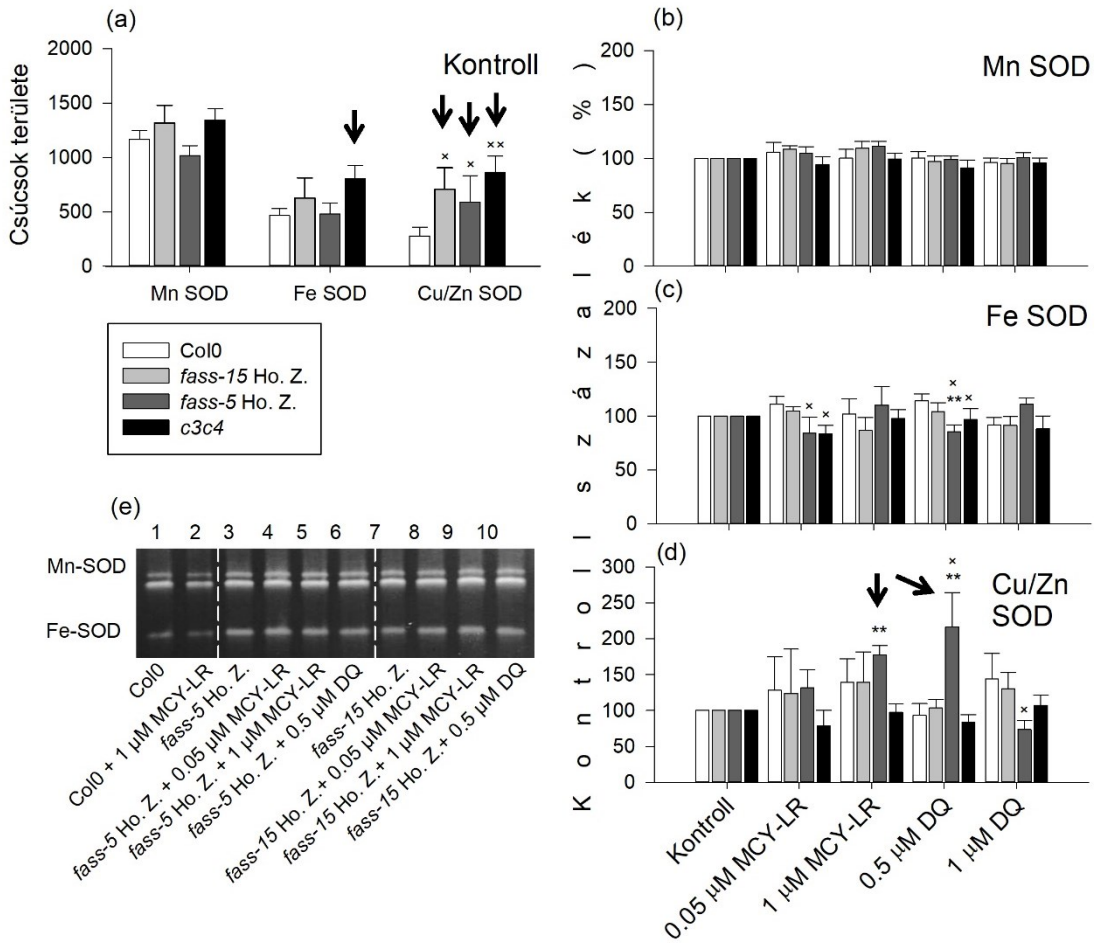
17. ábra Szuperoxid-dizmutáz aktivitás-gél gátlási vizsgálata. A hidrogén-peroxid és kálium-cianid kezelésekkel azonosítottuk a SOD izoformákat *Arabidopsis thaliana* gyökérben (Gy) és a hajtásban (H). Kezelés nélkül mindhárom izoforma látható, a H₂O₂ gátolja a Fe-SOD és Cu/Zn-SOD aktivitását míg a KCN kezelés csak a Cu/Zn-SOD aktivitását.

A legmarkánsabb aktivitási sávokat a Mn-SOD és a Fe-SOD esetében észleltük (18. ábra/e). A teljes csíranövényekben a Mn-SOD aktivitás hasonló volt a Col-0 és a homozigóta recesszív *fass-15* és *fass-5*, valamint *c3c4* esetében ez MCY-LR/DQ kezelések hatására sem változott (18. ábra/a és b). A *fass-15* és *c3c4* kezeletlenben a Fe-SOD aktivitás magasabb volt a Col-0 kezeletlenhez képest (18. ábra/a nyíl). Sem a MCY-LR, sem a DQ nem volt jelentős hatással a Fe-SOD aktivitásra egyik genotípus esetében sem, kivéve a *fass-5* enyhe csökkenését 0,5 μM DQ jelenlétében (18. ábra/c). A legszembetűnőbb változások a Cu/Zn-SOD aktivitásoknál voltak megfigyelhetőek. A kezeletlen *fass* és *c3c4* csíranövények aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint a Col-0-é (18. ábra/a nyilak).

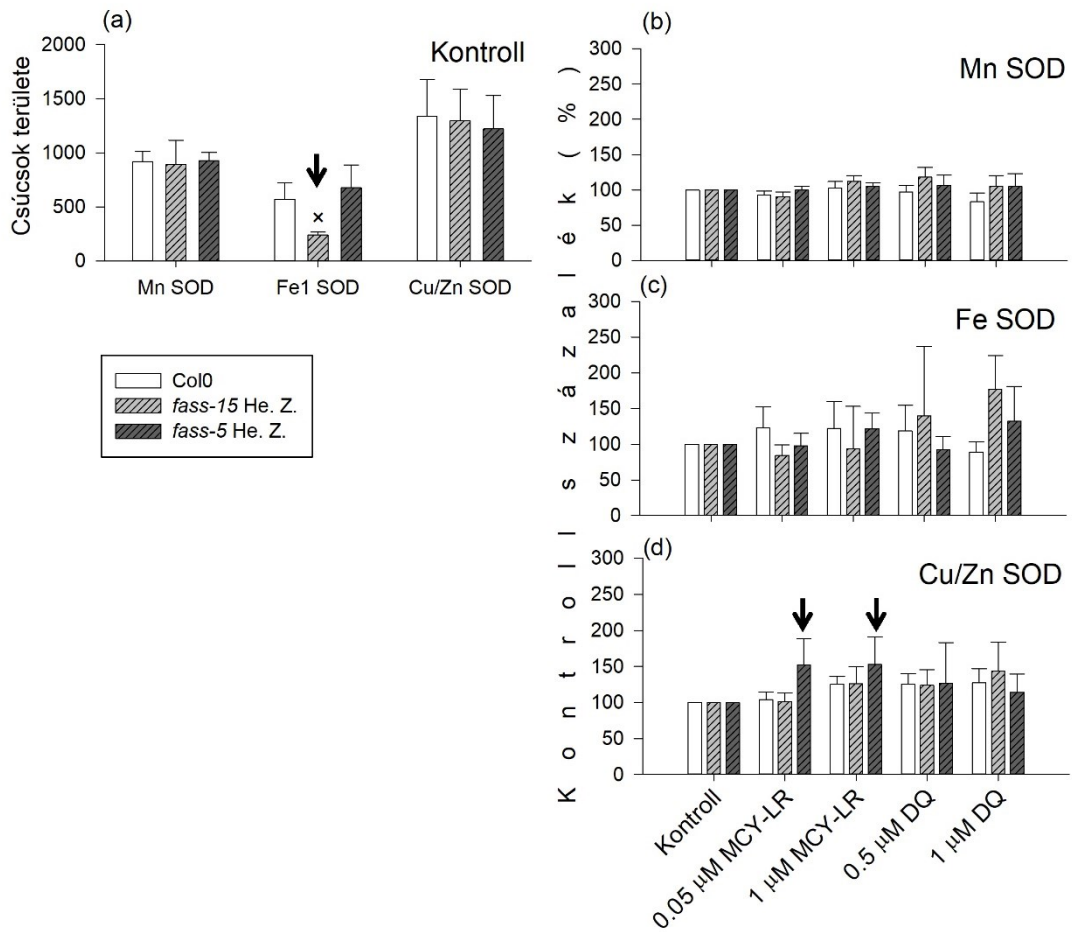
Mind a MCY-LR, mind a 0,5 μM DQ növelte a Cu/Zn-SOD aktivitást a Col-0 és a *fass* de nem a *c3c4* csíranövényekben, amelyek közül a legjelentősebb változásokat a *fass-5* csírabövényekben mértük (18. ábra/d nyilak). Ez utóbbi esetben a DQ magas koncentrációja (1 μM) csökkentette az aktivitást (18. ábra/d). A Col-0 növények gyökérkivonatait, valamint a *fass-15* és *fass-5* heterozigótákat is vizsgáltuk SOD aktivitás szempontjából. Az egész csíranövényekkel végzett kísérletekhez hasonlóan, a Mn-SOD aktivitások esetében sem genotípus, sem MCY-LR/DQ függő változásokat nem tapasztaltunk (19. ábra/a és b). Ezzel szemben a Fe-SOD aktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt a *fass-15* kezeletlenben, mint a másik két genotípusban (19. ábra/a nyíl). Az MCY-LR és a DQ kezelések enyhe, de nem szignifikáns növekedést idéztek elő a Col-0, *fass5* és *c3c4* esetében (19. ábra/c).

A *fass-15* esetében csak a DQ okozott ilyen változásokat (19. ábra/c). A Cu/Zn-SOD aktivitás mindhárom genotípusban hasonló volt (kezeletlen, 19. ábra/a), és az MCY-LR/DQ kezelések látható, de nem szignifikáns növekedést idéztek elő a Col-0 és a *fass* mutánsokban, míg a legszembetűnőbb változások az MCY-LR kezelt *fass-5*-ben voltak (19. ábra/d nyilak). Ezek a hatások részben hasonlóak voltak a Col-0 egész növényein és a *fass* heterozigóta recesszívjeinél megfigyelt hatásokhoz (18. ábra/d).

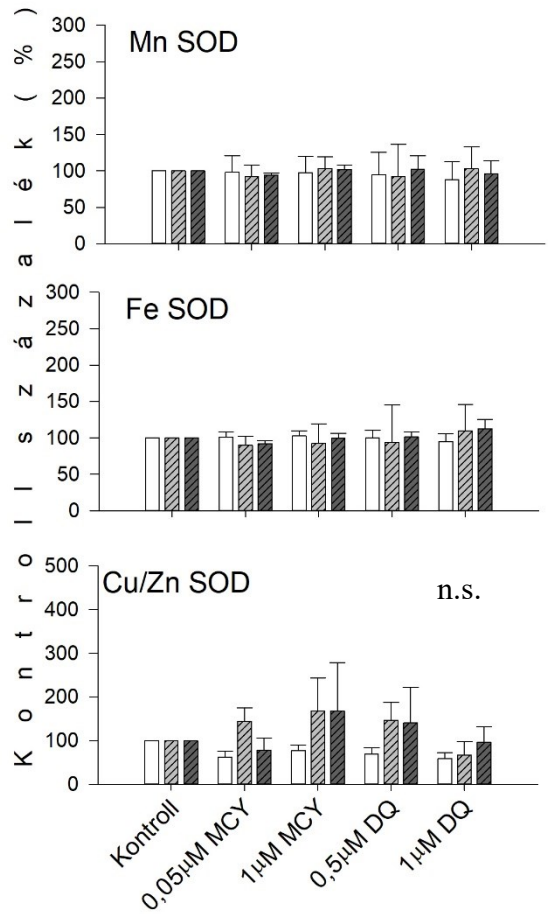
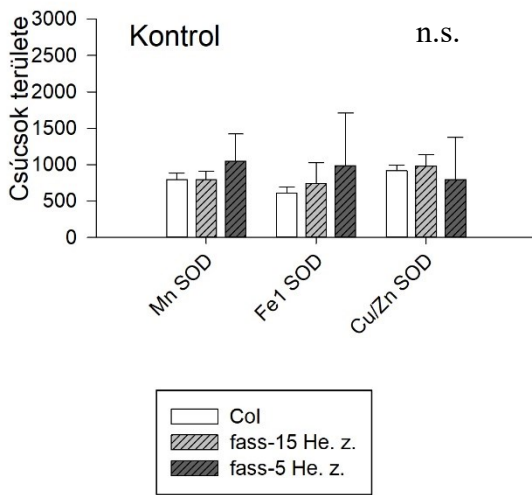
Érdekes módon a *fass* homozigóta növények (kezeletlen) hajtásaiban nem volt kimutatható különbség egyik izoforma esetén sem, egyedül a *fass-5* esetében tapasztaltunk egy szélesebb Cu/Zn-SOD aktivitás jel intervallumot (18. ábra/d). A kezeléseknak szintén nem volt hatása a foszfatáz mutánsok Mn-SOD és Fe-SOD izoformáira. A Cu/Zn-SOD esetében ugyan nagy változatosággal tapasztaltunk, de ez nem volt kísérletesen ismételhető és így nem lehetett egyértelműen a kezelése hatásaként értelmezni (20. ábra).



18. ábra A SOD aktivációs gélek egész csíranövényekből. A PP2AB¹ és C alegységei egyaránt képesek modulálni a SOD aktivitását, és a kezelések jelentősen növelik aktivitásukat a Cu/Zn-SOD esetében. A SOD aktivitását Col-0, *fass-5*, *fass-15* és *c3c4* kezeletlen csíranövényeknél hasonlítottuk össze (a). A MCY-LR és a DQ különböző koncentrációinak hatása a Mn-SOD (b), Fe-SOD (c) és Cu/Zn-SOD (d) aktivitására. Az aktivitásokat a sávok intenzitásaiban (a) és a kezeletlen százalékában (b-d) fejeztük ki. A Mn-SOD és Fe-SOD reprezentatív aktivitás gélképe az (e) fotón látható. A szignifikáns különbségeket ($P < 0,1$) ** (a kezeletlen és a kezelések közötti különbségek szignifikanciája egy adott genotípuson belül) és "X" és "XX" (szignifikáns különbségek a genotípusok között) jelzi az Anyagok és módszerek 3.6. szakasza szerint. Kétutas ANOVA (posthoc: Holm-Sidak), szórási SE n=5.



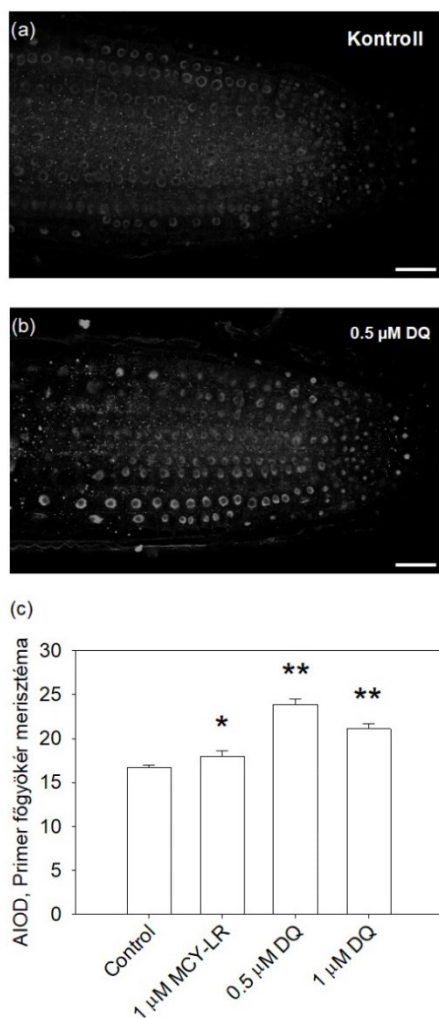
19. ábra A SOD aktivitási gélek gyökerekben. Még a *fass* mutánsok heterozigóta genotípusai is eltérnek a Col-0-hoz képest a Fe-SOD aktivitásában, viszont a Mn-SOD és a Cu/Zn-SOD aktivitásában nem (a). Ami az MCY-LR és a DQ hatását illeti, a Mn-SOD aktivitás nem változott jelentősen (b). A Fe-SOD aktivitásokat a MCY-LR DQ növelte a *fass-15*-ben, bár nem szignifikáns módon (c). A Cu/Zn-SOD aktivitást a DQ növelte a *fass-15*-ben és az MCY-LR a *fass-5*-ben (lásd a nyilakat az MCY-LR esetében) (d). A szignifikáns különbségeket "X" (szignifikáns különbségek a genotípusok között) jelzi az Anyagok és módszerek 3.6. szakasza szerint. Kétutas ANOVA (posthoc: Holm-Sidak), szórás SE n=5.



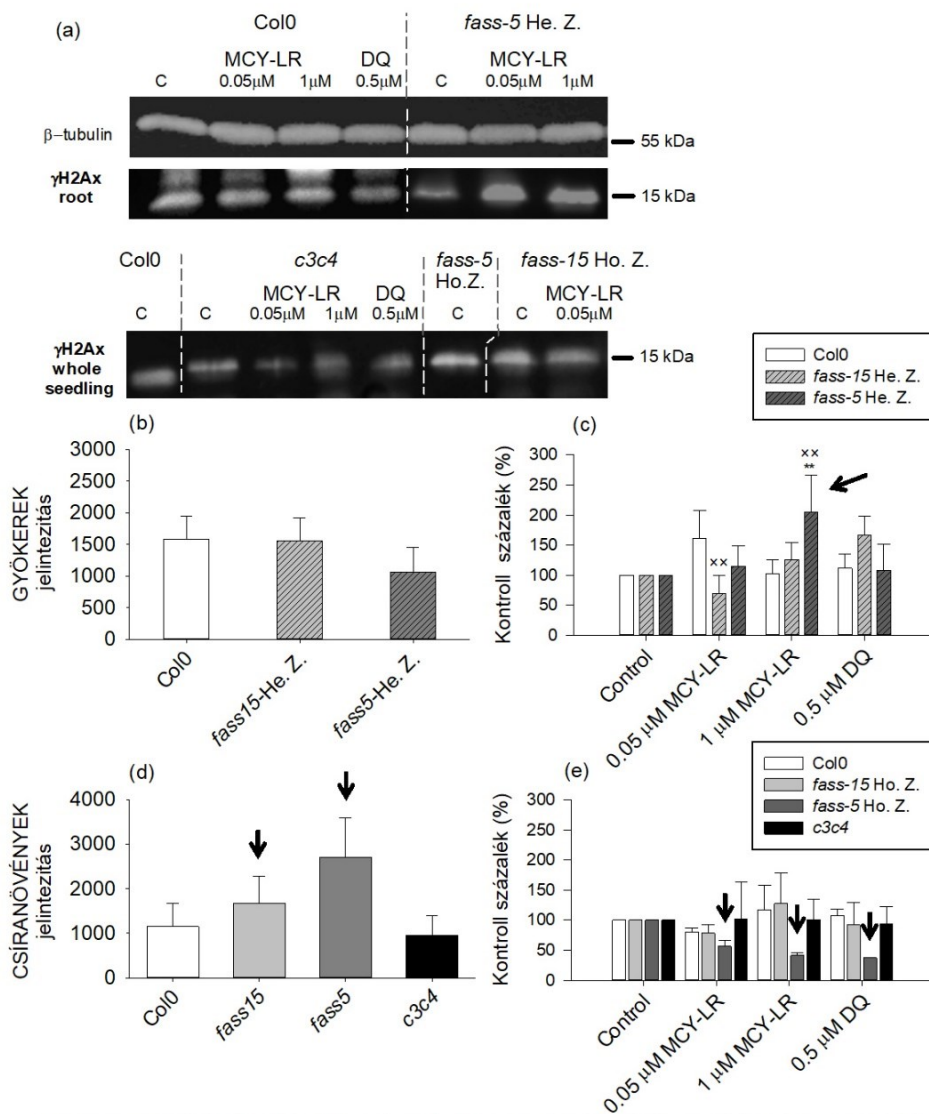
20. ábra SOD aktivitások a homozigóta hajtásokban. A hajtásokban sem a mutációk sem a kezelések hatására nem tudtunk *szignifikáns* különbséget kimutatni. Kéttutas ANOVA (posthoc: Holm-Sidak), szórás SE n=5, nem szignifikáns (n.s.).

5.2.2 Foszforilált γ H2AX szintjének változása IHC és Western blot alapján

A MCY-LR és a DQ genotípusfüggő módon változtatja meg a γ H2AX szintjeit. A Col-0 primer gyökérsúcsok immunhisztokémiai jelölése γ H2AX mutatta rá, hogy szinte minden sejtmag tartalmazta ezt a poszttranszlációs modifikációt (21. ábra/a), és a MCY-LR enyhén megváltoztatta a szintjét (21. ábra/c). Ezzel szemben a DQ a H2AX foszforilációs szintjének jelentős és erős növekedését idézte elő (21. ábra/b és c). A különböző genotípusú kezeletlen összehasonlításakor a teljes csíranövények fehérje kivonatainak részletes Western blot-elemzése jelentős különbségeket tárt fel a *fass-15* és *fass-5* homozigóták esetében, amelyek magasabb γ H2AX-szintet mutattak, mint a Col-0 és *c3c4* (22. ábra/a alsó panel, 22. ábra/d). A *fass* heterozigóták gyökerei esetében nem tudunk ilyen mértékű növekedést kimutatni a Col-0-hoz képest (22. ábra/a felső panel; 22. ábra/b). Ami a kezeléseket illeti, a MCY-LR növelte a foszforilált H2AX mennyiségét a Col-0 és az *fass-5* heterozigóta gyökerekben (22. ábra/a felső panel, 22. ábra/c, nyíl). Érdekes módon a *fass-5* homozigóták egész csíranövényeinek kivonatai esetében mind a MCY-LR, mind a DQ kezelések csökkentették, nem pedig növelték a γ H2AX szintjét (22. ábra/e nyilak). Sem a MCY-LR, sem a DQ nem indukált markáns változásokat a *c3c4* és a *fass-15* esetében (22. ábra/a alsó panel; 22. ábra/c, e).



21. ábra γ H2Ax immunhisztokémiai jelölése. A Col-0 gyökércsúcsokban DQ jelentősen növeli míg a MCY-LR kevésbé a γ H2AX szintjét. A Reprerentatív konfokális mikroszkópiás képek a kezeletlen (a) és a 0,5 μ M DQ-val kezelt (b) anti- γ H2AX-szal jelölt CLSM képei. Skála: 25 μ m. Az eredmények (intenzitások) számszerűsítése MCY-LR és DQ kezeléseknél (c). A szignifikáns különbségeket ($P < 0,1$) * és ** jelzi (a kezeletlen és a kezeléseik közötti különbségek szignifikanciája) az Anyagok és módszerek 3.6. szakasza szerint. t-teszt, szórás SE n=5.



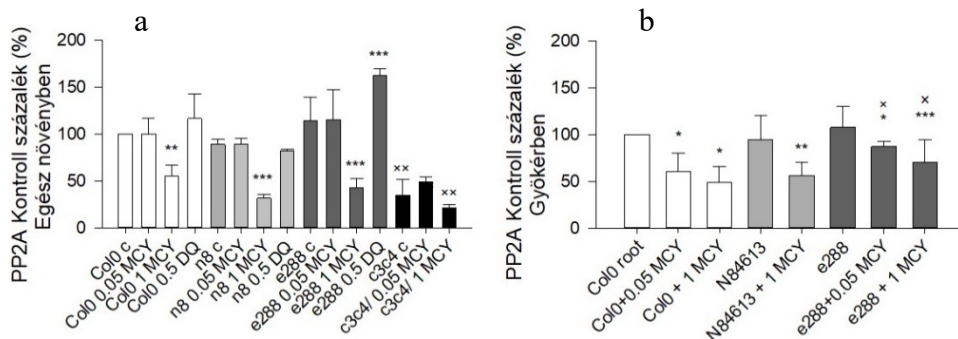
22. ábra A γ H2AX Western blot (WB) elemzése gyökerekben és teljes csíranövényekben. A B" és C alegységek mutációi, valamint a MCY-LR és a DQ kezelések befolyásolják a γ H2AX szintjét. Reprezentatív WB-képek minden genotípusra (a). A WB-sávok intenzitásai a gyökerekben a Col-0 és *fass* heterozigóták esetében (b, c). A WB-sávok intenzitásának a Col-0 a *fass* homozigóta recesszív és a *c3c4* egész csíranövényeiben (d, e). A (c) nyilak a γ H2AX megnövekedett szintjét mutatják a *fass-5* heterozigóták gyökereiben 1 μ M MCY-LR jelenlétében. A (d) nyilak a γ H2AX megnövekedett szintjét mutatják a *fass* kezeletlen mutánsokban a Col-0 kezeletlenhez képest. Az (e) nyilak azt mutatják, hogy mind az MCY-LR, mind a DQ csökkenti a γ H2AX szintjét a *fass-5* homozigótákban. A szignifikáns különbségeket ($P < 0,05$) ** (a kezeletlen és a kezelések közötti különbségek szignifikanciája egy adott genotípuson belül) és "XX" (szignifikáns különbségek a genotípusok között) jelzi az Anyagok és módszerek 3.6. szakasza szerint. Kétutas ANOVA (posthoc: Holm-Sidak), szórási SE n=3.

5.2.3 PP2A aktivitása foszfatáz mutánsokban

A foszfatáz mutánsok vizsgálatához további izotópos foszfatáz aktivitás mérést végeztünk. Ezen vizsgálatok előzetes eredményeit mutatom itt be a disszertációmban, a vizsgálat részletes eredményeit máshol később fogjuk publikálni. Ezek a vizsgálatok megerősítették és kiegészítették a PIN eloszlással és auxin válasszal kapcsolatos eredményeinket.

A *fass-5* és *fass-15* homozigóta recesszív, valamint a *c3c4* egész csíranövényeiben végeztük a vizsgálatokat. Minden esetben a Col-0 értékét tekintettük 100%-nak a Col-0 átlagos értéke 3048,33 (n = 12, SE = 500,4). A Col-0 estében az 1 μ M MCY-LR a vártaknak megfelelően szignifikánsan gátolta a PP2A aktivitását, ami hozzávetőleg egy 40-50%-os gátlás. A *fass-5* és *fass-15* homozigóta recesszív mutánsai hasonlóan reagáltak MCY-LR kezelésekre, azaz intenzív szignifikáns gátlást mértünk. Ez azt bizonyítja, hogy a *fass* mutánsokban van működőképes PP2A. A *c3c4* esetében a kezeléseket nem tudtuk kimutatni, viszont a Col-0-hoz viszonyított alacsony aktivitást igen, ami C3 és C4 alegységek hiányából fakad (23. ábra/a).

A *fass* mutánsok heterozigóta pool-jainak vizsgálata során csak azok gyökeréből mértünk PP2A aktivitást. A Col-0 gyökereiben kisebb mértékű, marginálisan szignifikáns gátlást tapasztaltunk mindkét MCY-LR koncentrációval (n=12, 0,5 μ M MCY-LR P= 0,084 és 1 μ M MCY-LR P= 0,054). A *fass-5* és *fass-15* estében az 1 μ M MCY-LR szignifikáns, míg a *fass-5* 0,5 μ M MCY-LR marginálisan szignifikáns (n=6 P=0,055) csökkenést eredményezett a heterozigóták gyökereiben. A *fass-15* 0,5 μ M MCY-LR kezelésből nem készült kellő számú sikeres ismétlés a statisztikai elemzés elvégzéséhez a dolgozat elkészültéig (23. ábra/b).



23. ábra Izotópos foszfatáz aktivitás (PP2A) mérés eredményei egész csíranövényekben (a) és gyökerekben (b) a kezeletlen Col-0 százalékában, melynek átlagos értéke 3048,33 (n = 12, SE = 500,4). A szignifikáns különbségeket ($P < 0,1$) *, ($P < 0,05$) ** és ($P < 0,001$) *** (a kezeletlen és a kezelések közötti különbségek szignifikanciája egy adott genotípuson belül) és "X és XX" (a Col-0 mutánsokhoz viszonyított szignifikáns különbségek) jelzi az Anyagok és módszerek 3.6. szakasza szerint. Két-utas ANOVA (posthoc: Holm-Sidak), szórási SE Col-0 n=12, *fass* mutánsok n=6. A protein-foszfatáz aktivitás mérést dr. Kónya Zoltán és prof. Erdődi Ferenc végezte.

6 Diszkusszió

6.1 A Mikrocisztin-LR befolyásolja a PIN fehérjék lokalizációját és az auxin szinteket *Arabidopsis thaliana* gyökerében

Az MCY-LR számos káros hatása ismert a növényi sejtekre/szövetekre. Ezek közé tartoznak a citoszkeleton és a kromatin szerveződésének változásai, a sejtciklus szabályozás megzavarása, vagy a sejthalál/szöveti nekrozis (Jámbrik *et al.*, 2011; Máthé *et al.*, 2013, 2016; Pappas *et al.*, 2020). A gyökér helyes működése kulcsfontosságú a legtöbb edényes növény fejlődésében és a környezettel való kapcsolat kialakításában, mint a víz és a tápanyag felvétel helye. A növényi szervek fejlődésének egyik szabályozó fitohormonja az auxin. Ha az auxin eloszlása a növényi testen belül megváltozik az a fejlődésre/ növekedésre is kihatással van. Az auxin normál eloszlásának fenntartása PIN efflux transzmembrán fehérjék megfelelő lokalizációjától és működésétől függ (Adamowski & Friml, 2015). A PIN-ek működését reverzibilis foszforiláció szabályozza (Friml *et al.*, 2004; Zwiewka *et al.*, 2019). Először azt vizsgáltuk, hogy a PIN-ek és ennek következtében az auxin helyi mennyisége hogyan változik MCY-LR jelenlétében *Arabidopsis thaliana* gyökereiben.

Az *rcn1*, *pp2aa1* és *a2*, a PP2A "A" alegység funkcionálisan hiányos mutánsai a primer és oldalgyökérfejlődésük rendellenes, valamint a gyökerek agravitropikusak (Rashotte *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2004; Michniewicz, Zago, *et al.*, 2007), a MCY-LR számos, ezekhez a mutáns fenotípusokhoz hasonló hatást idéz elő. Az eredményeinkben bemutattuk, hogy a PIN1, PIN2 és PIN7 szintje csökken a MCY-LR-rel kezelt *Arabidopsis thaliana* csíranövények primer gyökér csúcaiban. A PIN:GFP növények nem szignifikáns csökkenést mutatnak, míg az immunhisztokémiai megközelítéssel drámaibb változás volt tapasztalható (6. ábra, 7. ábra, 8. ábra és 10. ábra). Érdekes módon a kantaridin,

a PP2A egy másik természetes inhibitora (MacKintosh & Diplexcito, 2009) nem változtatja meg a PIN2 szintjét a gyökércsúcsokban de az auxin eloszlására és a gravitropikus válaszra hatással van (Shin *et al.*, 2005).

A PIN3 esetében, a MCY-LR hatására annak szintje megnő a primer gyökércsúcsokban (9. ábra). Az oldalgyökerek esetében a cianotoxin ellentétes hatást fejt ki, itt a PIN1 és PIN2 szintje nő, a PIN3 szintje az oldalgyökér primordiumokban pedig csökken (6. ábra/e és 9. ábra). Mindez arra utal, hogy a MCY-LR a PIN-ek újra eloszlását indukálja a gyökerekben. A jelenség egyik lehetséges biokémiai magyarázata a protein-foszfataz aktivitás gátlása, mivel a ROS szintek nem változnak a cianotoxinnal való rövid távú expozíció következtében (14. ábra). Így a cianotoxin ROS indukáló hatásának feltételezhetően nincs közvetlen jelentősége a 24 órás kezelése során, és a PIN/auxin szintek változásai közvetlenül az MCY-LR protein-foszfatazokra gyakorolt specifikus hatásaihoz köthetők. Ennek pontosabb bizonyítására ROS indukált transzkripciós faktorok szintjeit kellene megvizsgálni transzkriptom analízissel. A PIN-ek lokalizációjában bekövetkezett változások után várhatóak az auxin szintek/válaszok változásai, és valóban, a DR5rev:GFP konstrukciókat hordozó növények nem szignifikáns, de következetes csökkenést mutattak az auxin szintekben a primer gyökerek csúcsaiban (11. ábra és 12. ábra). Az auxin eloszlás vizsgálata összetett feladat, mivel nehéz elkülöníteni a szállítódó és a valóban hatást kifejtő auxint. Megoldás lehet erre a PIN fehérjék nagyobb felbontású mikroszkópos vizsgálata, mely során a PIN fehérjék változásait membránklaszterek szintjén kellene kutatni. Továbbá az auxin indukálta génexpresszió vizsgálata is fontos lehet.

6.1.1 Mi a következménye ezeknek a változásoknak a gyökérfejlődésre nézve?

Az *Arabidopsis thaliana* PP2A vázszerkezeti, szabályozó vagy katalitikus alegységei mutánsaiban azt látjuk, hogy a PP2A aktivitásának vagy

szubcelluláris és szöveti lokalizációjának zavara gátolja az primer gyökerek hosszanti növekedését, serkenti az oldalgökér primordiumok kialakulását, de gátolja azok megnyúlását. Ez részben a helytelen auxin lokalizáció következménye (Zhou *et al.*, 2004; Michniewicz, Zago, *et al.*, 2007; Spinner *et al.*, 2013). Nagyon hasonló gyökérfejlődési változásokat figyeltünk meg MCY-LR kezelések után. A gyökércsúcs és az első oldalgökér primordium közötti távolság csökkent, ami azt jelenti, hogy az primer gyökér megnyúlása gátolt volt (15. ábra). Eközben az oldalgökér-primordiumok fejlődése fokozódott, és ezt követően az oldalgökerek fejlődése lelassult a kezeletlenhez képest (13. ábra/b, c). Redukált primer gyökér fejlődés, megnövekedett oldalgökér szám valamint csökkent ellenáló képesség patogénekkal szemben az *Arabidopsis thaliana* RBOHD mutánsaiban is megfigyelhetőek (Chapman *et al.*, 2019). Az RBOHD szerepe a sejtfal megnyúlásban a gyökér fejlődése és növekedése során mára bizonyítottan látszik, az általuk termelt apoplastikus térben található ROS-nak ugyanis szabályozó szerepe van ezen folyamatokban (Zhou *et al.*, 2020). A Cu/Zn-SOD-k nak létezik egy extracelluláris formája melyről elképzelhető hogy szintén szerepet játszik ezekben a folyamatokban, de erről a SOD izoformáról keveset tudunk növényekben (Tyagi *et al.*, 2019)

A gyökér gravitropizmusa egy összetett szabályozású és különösen érzékeny folyamat, a folyamatot 4 szakaszra lehet tagolni: 1. jel érzékelése 2. jel továbbítása 3. a gravitropikus válasz (megnyúlás/növekedés) és 4. a jel csillapítása (Swarup & Bennett, 2018). A PIN2, PIN3 és PIN7 fontos szerepet játszik a gyökerek gravitropikus válaszában, és szintjük csökkenése gátolja a gravitropikus választ (Adamowski & Friml, 2015; Michniewicz *et al.*, 2007a). A MCY-LR kezelés nem változtatta meg ezt a választ, valószínűleg azért, mert a PIN3 szintjének növekedése a primer gyökércsúcsokban kompenzálta a PIN2 és PIN7 csökkenését. Érdekes módon a cianotoxin helyreállította a *crk5*

mutánsok gravitropikus válaszát (13. ábra/a). Ebből a mutánsból hiányzik egy CDPK típusú protein-kináz, amely hozzájárul a PIN2 foszforilációjához (Rigó *et al.*, 2013). Ennek következtében a függőlegesen nevelt gyökerek megnyúlási zónájában csökken a PIN2 szintje, és a gravistimuláció során aszimmetrikussá válik a PIN2 eloszlása, aminek következtében késik a gravitropikus válasz (Rigó *et al.*, 2013). A MCY-LR hatását a PIN2 foszforilált állapotának egy alternatív, még ismeretlen kináz általi fenntartása és a PIN2 PP2A komplex általi defoszforilációjának gátlása okozhatja. A MCY-LR-rel ellentétben a kantaridin a PP2A A szabályozó alegységében hibás *Arabidopsis thaliana rcn1* mutánsához hasonlóan csökkenti a gyökerek gravitációs válaszát (Rashotte *et al.*, 2001). A *pp2aa* más funkcióvesztéses mutánsai az A alegységet érintve szintén megváltozott gravitropizmust és a gyökér apikális merisztémájának összeomlását indukálják (Xi *et al.*, 2016).

Nem lehet azt sem kizárni, hogy nem foszforilációs szabályozásról van szó. A közelmúltban számoltak be *Arabidopsis thaliana* WAVY GROWTH 3 (WAV3) és a közeli rokon WAV3 HOMOLOG (WAVH) RING-finger E3 ubiquitin ligázokról, amelyek funkcióvesztéses mutánsai feltűnő apikális-bazális polaritásváltást mutatnak a PIN2 lokalizációjában a gyökér merisztéma sejtekben. A szerzők a WAV3 és E3 ligázokat a PIN polaritás alapvető meghatározójaként azonosították, melyek a PINOID/WAG-függő PIN foszforilációtól függetlenül működnek. Már közvetlenül a sejtosztódás befejeződése után antagonizálják a de novo szintetizált PIN-fehérjék bazális lokalizációját, feltehetően azért, hogy megakadályozzák a PIN-ek alap, ARF-GEF által közvetített újrahatszorosulását (Konstantinova *et al.*, 2022)

Összefoglalva, a MCY-LR a gyökérfejlődés változásait idézi elő az *Arabidopsis thaliana* modellnövényben, és ez összefügg a PIN auxin efflux membránfehérjék szintjének és a gyökerek helyi auxin szintjeinek változásaival. Ezek a változások közvetlenül a cianotoxin protein-foszfátáz

gátló hatásával állnak összefüggésben 24 órás kezelések esetén. Ez a tanulmány az első, amely bizonyíthatóan összefüggésbe hozta a MCY-LR fitotoxikus hatását a protein-foszfataz gátló tulajdonságával. Hozzájárul egy jól ismert cianotoxin fitotoxicitásának jobb megértéséhez mind laboratóriumi körülmények között, mind a valós környezetben.

6.2 A PP2AC3 és C4 valamint a B'' alegységek lehetséges szerepei a növényi stresszválaszban

A PP1 (egy nem-fémfüggő foszfataz), amelynek katalitikus alegysége a PP2AC-vel rokon, túlexpressziója rizsben NaCl-stressz hatására megnöveli a nem enzimatis ROS semlegesítő kapacitást és az APX-aktivitást, továbbá csökkent malondialdehid-tartalmat indukál. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PP1 részt vesz az oxidatív stresszre adott válaszok szabályozásában rizsben (Liao *et al.*, 2016). Növényekben a PP2A a leggyakoribb a szerintreonin foszfatazok között, de az oxidatív stressz szabályozásával való kapcsolata kevésbé ismert. Vannak azonban *Arabidopsis thaliana*-ban adatok különösen a B' szabályozó alegységekre vonatkozóan, így például ismert, hogy a PP2AB' γ alegysége biotikus stressz hiányában aktiválja a PP2A holoenzimet (Li *et al.*, 2014). A patogenezisre adott válasz (PR) során ez az alegység inaktiválódik, ami növeli a ROS szignalizációban szerepet játszó CONSTITUTIVE EXPRESSION OF PR GENES5 (CPR5) foszforilációs állapotát: aktiválja a RBOH-t és növeli az L-aszkorbát-peroxidáz izoforma (APX2) expresszióját (Trotta, Konert, *et al.*, 2011; Trotta, Wrzaczek, *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Konert *et al.*, 2015). Az *Arabidopsis thaliana pp2a-b' γ mutánsokat a Cu/Zn-SOD megnövekedett szintje jellemzi levelekben (Trotta, Konert, *et al.*, 2011; Trotta, Wrzaczek, *et al.*, 2011). A PP2AB' θ alegység a PP2A holoenzimet a peroxiszómákba irányítja, ahol aktiváló hatást fejt ki β -oxidációra. (Kataya *et al.*, 2015). Emellett a ROS-okról ismert, hogy*

nem csak a növényi immunválaszok fontos jelzőfaktoraként működnek, hanem közvetett vagy közvetlen módon szabályozzák a növények növekedését és fejlődését. A legújabb vizsgálatok határozottan arra utalnak, hogy a ROS-ok összekapcsolják ezt a két eseményt. Számos olyan folyamatot és jelenséget írtak le, ahol a stressz során keletkező ROS transzkripciós faktorok révén szabályozza a növekedési folyamatokat ilyen pl.: az oldalgökerek kialakulása vagy a sejtfal vastagodás a gyökér megnyúlási zónájában (Mase & Tsukagoshi, 2021). Továbbá nagyon valószínű, hogy a ROS szabályozási folyamatokban meghatározó szerep jut az extracelluláris Cu/Zn-SOD-nak (Chen *et al.*, 2022).

A fass mutációi a PP2A egyik feltételezett B” alegységét érintik (Camilleri *et al.*, 2002; Spinner *et al.*, 2013). Ahogy az „Irodalmi áttekintés” fejezetben említettem, ez az alegység olyan kulcsfontosságú fejlődési folyamatokban vesz részt, mint a mitotikus mikrotubuláris szerveződés szabályozása. Azonban a B” alegységről, e tanulmány fő célpontjáról még nem mutatták ki egyértelműen, hogy szabályozza-e a ROS szignalizációt.

A PP2AC3 és C4 katalitikus alegységei szabályozzák a kortikális mikrotubulus szerveződést NaCl-stressz során (Yoon *et al.*, 2018). Mivel a C4 alegység részt vesz az SnRK által közvetített ABA szignalizációban (Waadt *et al.*, 2015; Máthé *et al.*, 2019), amely a ROS keletkezéssel kapcsolatos génexpressziót szabályozza, valószínű, hogy oxidatív stresszt válthat ki. Mindaddig azonban nem volt bizonyíték a C3 és C4 közvetlen részvételére a növényi oxidatív stresszben. Így a jelen tanulmány az elsők között bizonyítja ezt a kapcsolatot. A fenti megállapítások fényében a jelen munka a PP2AC3, C4 katalitikus és B” szabályozó alegységei tekintetében kíván hozzájárulást nyújtani a kérdéshez.

6.2.1 A PP2A^B és C3-C4 alegységei befolyásolják a ROS szinteket és azok SOD általi semlegesítését

A *fass* mutánsok homozigóta kezeletlenjeinek gyökércsúcsaiban magasabb ROS szinteket mértünk, míg a *c3c4*-ben a Col-0-hoz közel azonosakat (16. ábra/b). A csíranövények SOD aktivitását vizsgálva a *fass* mutánsokban magasabb Cu/Zn-SOD aktivitást tapasztaltunk (18. ábra/a). A várttól eltérően a *c3c4* mutánsban szintén megemelkedett Cu/Zn aktivitást mértünk, a közel normális ROS szint ellenére.

Az oxidatív stressz tekintetében a *fass* mutánsok intenzívebben reagálnak a PP2A inhibitor MCY-LR-re és a ROS induktor DQ-ra (16. ábra/b, d). Magasabb Fe-SOD és a Cu/Zn-SOD aktivitás társul a *c3c4* kezeletlen esetében, de a MCY-LR kezelések nem módosítják tovább ezeket a SOD aktivitásokat. Valószínűsíthetjük, hogy nincs közvetlen kapcsolat a ROS szintek és a semlegesítés között a MCY-LR kezelt *c3c4*-ben (16. ábra/b, d; 18. ábra). A *fass-5* és *fass-15* mutánsok B" szabályozó alegységének homozigóta recesszív genotípusú kezeletlenjei ezzel szemben magasabb ROS szintet mutatnak, és az 1 μ M MCY-LR kezelések további jelentős növekedést idéztek elő (16. ábra/b, d).

A különböző SOD izoformák génjeinek transzkripciós szintjei ugyanazon stresszfaktor, például UV-B sugárzás jelenlétében eltérők (Kliebenstein *et al.*, 1998). Ezen izoenzimek aktivitását illetően a jelen vizsgálat azt mutatja, hogy a különböző genotípusú kezeletlen és MCY-LR/DQ kezelt növények eltérő mintázatot mutattak a Fe-SOD és a Cu/Zn-SOD aktivitásának vonatkozásában, összehasonlítva a Mn-SOD-dal (amelynek aktivitása viszonylag változatlan maradt, függetlenül attól, hogy milyen genotípust és milyen típusú kezelést alkalmaztunk). Például a kezeletlen esetében mind a Fe-SOD, mind a Cu/Zn-SOD aktivitása megnőtt a mutánsok egész csíranövényeiben a Col-0-hoz képest (18. ábra/a).

A MCY-LR és a DQ képes volt megváltoztatni a Cu/Zn-SOD aktivitást a Col-0-ban, valamint a *fass* homo- és/vagy heterozigótákban (18. ábra. és 19. ábra). Hasonló különbségeket mutattak ki kadmium kezelt *Arabidopsis thaliana*-ban is SOD izoformák aktivitásában (Drażkiewicz *et al.*, 2007).

A Fe-SOD aktivitásról ismert, hogy részt vesz az oxidatív stressz elleni védekezésben. Például a Fe-SOD-t túl expresszáló transzgenikus kukoricánövények fokozottan tolerálják a PQ-t (Van Breusegem *et al.*, 1999). A disszertációs munkám során azt mutattuk ki, hogy a Cu/Zn-SOD aktivitás a legérzékenyebb az MCY-LR/DQ kezelésekre a *fass* mutánsokban (18. ábra/d, 19. ábra/d). A Cu/Zn-SOD aktivitást a különböző stressztípusok is modulálják. Aktivitása például a nehézfémstressz során megemelkedik egy etilén függő mechanizmus révén (Abozeid *et al.*, 2017). Trotta *et al.* (2011) már rámutatott a PP2AB' γ alegységének szerepére Cu/Zn-SOD izoforma aktivitásának/expressziójának modulálásában. A Mn-SOD-t túlreprezentáló transzgenikus *Arabidopsis thaliana* növényeket fokozott tolerancia jellemzi, és más SOD-ok, a kataláz (CAT) és a peroxidáz (POD) aktivitása is magasabb ezekben a növényekben (Wang *et al.*, 2004). Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a különböző SOD izoformák különböző mértékben járulnak hozzá a stressztűréshez, attól függően, hogy milyen típusú stresszel szembesülnek a növények. A PP2AB" (*fass-5; -15*) és *c3c4* mutánsokban a SOD aktivitás megváltozását bemutató adataink az első olyan vizsgálatok közé tartoznak, amelyek összefüggést tárnak fel ezen alegységek és a növények ROS semlegesítésének szabályozása között.

A DCFHDA mérésekből az is kiderült számunkra, hogy a ROS térbeli eloszlása sem mutációk, sem a kezelések hatására nem változik, mivel a differenciált zónák lekövetik a gyökércsúcsok jelintenzitásának trendjeit (16. ábra/a és c valamint b és d).

A foszfatáz mutánsok azt mutatják, hogy részleges különbség van a PP2AB" és C alegységeinek a ROS szintek szabályozásában való részvétele között. Egy máshol publikálásra váró tanulmányban (Kelemen et al., *The Plant Journal*, beküldve) kimutattuk, hogy a *fass* és *c3c4* mutánsokban nem egyszerűen gátolt a protein-foszfatáz aktivitás, hanem a B" és C3-C4 alegységek közötti kölcsönhatás, valamint a PP2A és PP1 aktivitás közötti egyensúly másképp változik a kétféle mutánsban.

Ez azt jelzi, hogy a funkcionális B" vs. C alegységek hiánya a ROS szintek függvényében másképp befolyásolja a SOD aktivitásokat, így a mutációk és a MCY-LR hatásai inkább befolyásolják ezen alegységek funkcionalitását és kölcsönhatását, minthogy csak a PP2A aktivitását csökkentenék (23. ábra). Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a PP2AB" és C alegységei egyaránt részt vesznek a ROS szintek és a ROS semlegesítés szabályozásában (lásd még a 6. ábrát), bár az ezen alegységek közötti lehetséges komplex kölcsönhatások és különböző szubcelluláris lokalizációjuk magyarázhatják, hogy szerepük/hatásuk e tekintetben csak részben fedik egymást. A PP2AB" és C3-C4 alegységei szabályozzák a H2AX foszforilációját a ROS szintek és a semlegesítés függvényében

A hiszton H2AX foszforilációját a karboxi-terminális szerinnél a foszfatidil-inozitol-3-kináz család (ATM/ATR) tagjai közvetítik élesztőkben, emlősökben és növényekben (Fillingham *et al.*, 2006; Roitinger *et al.*, 2015). Emlősökben a PP2A szerepet játszik a γ H2AX defoszforilációjában, amely esemény szükséges a kettős szálú DNS javításához (Fillingham *et al.*, 2006). Mi a helyzet a növényekben? A H2AX foszforilációja és a γ H2AX kromatinon belüli lokalizációja több kináztól függ (Moreno-Romero *et al.*, 2012). Ami azonban a szerin-treonin foszfatázokat illeti, a PP2A az ATM aktivitását szabályozza (Templeton & Moorhead, 2005), de a γ H2AX ezen foszfatázcsalád tagjai általi közvetlen defoszforilációjáról kevés az ismeret.

A protein-foszfataz mutánsokkal végzett tanulmány egyfelől rámutatott, hogy a homozigóta recesszív *fass* mutánsok kezeletlenjei esetében a γ H2AX szintek növekedése (a Col-0-hoz képest) korrelációt mutat a ROS szintekkel, és a *c3c4* kezeletlenjei esetében közvetlen arányosság van ezen két paraméter között (16. ábra és 22. ábra/d, csökkenés mindkét esetben). Ezek arra utalnak, hogy a B" alegység funkciójának elvesztése oxidatív stresszt és DNS-javító mechanizmusokat egyaránt indukál. Ellenben ez nem igaz a C3 és C4 katalitikus alegységekre: a PP2AB" és a C3-C4 alegységek funkciói ebből a szempontból is különböznek. Mivel a PP2AC3-C4 alegység aktivitásának elvesztése a H2AX foszforilációs állapotának csökkenéséhez és nem növekedéséhez vezet, ez arra utal, hogy a PP2AC3 és C4 alegységei nem vesznek részt közvetlenül a γ H2AX defoszforilációjában (22. ábra és 23. ábra).

Másfelől eredményeink azt is feltárták, hogy a *fass-5* homozigóták esetében fordított arányosság figyelhető meg a ROS szintek növekedése és a γ H2AX szintek csökkenése között MCY-LR/DQ jelenlétében. Eközben a Western blot vizsgálatok azt mutatják, hogy a *c3c4*-ben az MCY-LR nem befolyásolja szignifikáns módon a H2AX foszforilációt. Meg kell jegyezni, hogy az MCY-LR kezelések a PP2A mind az öt (tehát nem csak a FASS-val kölcsönhatásba lépő C3 és C4) alegységére hatással vannak, mivel ez egy általános PP2A-inhibitor (MacKintosh & Diplexcito, 2003).

Összességében úgy tűnik, hogy a C katalitikus alegységek egyike sem vesz részt a γ H2AX közvetlen defoszforilációjában (16. ábra/b, d és 22. ábra/). Sőt, a γ H2AX szintjének növekedése a *fass* mutánsok kezeletlenjeiben és csökkenése a *c3c4*-ben. továbbá, a mutánsok és a Col-0 közötti MCY-LR hatások különbségei (22. ábra) szintén arra utalnak, hogy a H2AX foszforilációját a megfelelő B"-C alegység kölcsönhatás szabályozza, nem pedig egyszerűen a γ H2AX PP2A általi defoszforilációja.

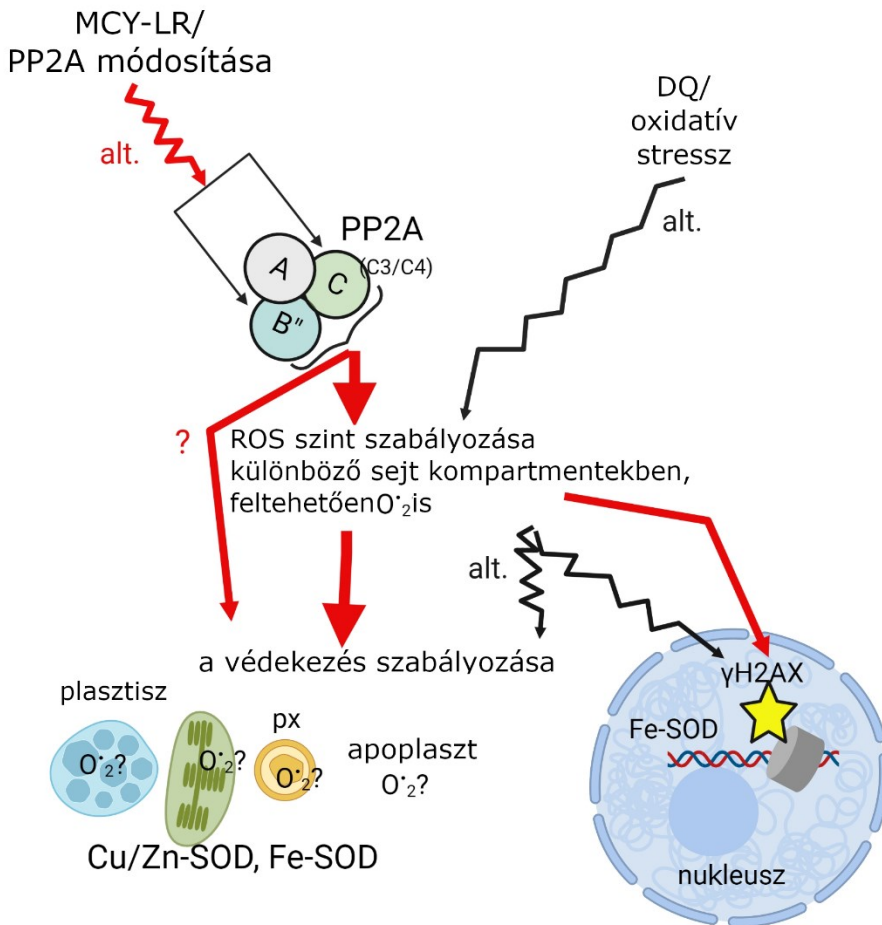
Milyen kapcsolatban áll a hiszton H2AX foszforiláció a ROS szintekkel és a semlegesítéssel?

A kezeletlen esetében a Fe-SOD és a Cu/Zn SOD aktivitás a homozigóta recesszív *fass* és a *c3c4* esetében megnövekedett. Ez a γ H2AX-szintek és a ROS szintek növekedéséhez hasonlóan történik a *fass*-ban (22. ábra/a, 18. ábra/a). Úgy tűnik tehát, hogy a B" alegység mutánsokban az oxidatív stresszválaszok együtt járnak a H2AX foszforilációs eseményekkel. A MCY-LR/DQ kezelések azonban a γ H2AX szintek csökkenését mutatják a *fass*-ban, és nem változik a *c3c4*-ben, ellentétben a Cu/Zn-SOD aktivitás növekedésével a *fass*-ban és a ROS szintek növekedésével minden mutánsban. Ez arra utal, hogy a H2AX foszforilációja összetettebb módon kapcsolódik az oxidatív stresszhez *Arabidopsis thaliana*-ban, és ez a kérdés további vizsgálatokat igényel. A *fass* mutánsok csak a homozigóta recesszív fenotípusok esetében mutatnak súlyosan károsodott fejlődési mintázatot, míg a heterozigóták látszólag normálisak (Kirik *et al.*, 2012; Spinner *et al.*, 2013). Ezért azt vártuk, hogy a heterozigóták a vad típusú növényekhez hasonló ROS szintet, SOD aktivitást és γ H2AX szintet fognak mutatni, de meglepetésünkre a heterozigóta és homozigóta recesszívek vad típusú csiranövényekkel való összehasonlításakor ez nem így volt sem a kezeletlen, sem az MCY-LR/DQ kezelések esetében. Kiemelkedő eltérések voltak például (i) a kezeletlen γ H2AX-szintjeiben (3b, d ábra); (ii) a Fe-SOD szintek a kezeletlenben (18. ábra/a és 19. ábra/a ábra); (iii) a MCY-LR és DQ kezelések hatása a *fass-5* és *fass-15* γ H2AX-szintjeire (8. ábra/c és e); és (iv) a Fe-SOD és Cu/Zn-SOD aktivitás mind a *fass-5*, mind a *fass-15* esetében (18. ábra. és 19. ábra).

6.2.2 Záró megállapítások és következtetések

A MCY-LR és a DQ hatásainak összehasonlításakor csak részleges hasonlóságot találtunk a ROS szintek és a SOD aktivitások tekintetében (lásd az Eredmények és a Diskusszió fejezeteket), a MCY-LR specifikus protein-foszfataz gátló hatása révén változásokat okozhat a csíranövények oxidatív stressz állapotában. Ami a γ H2AX szinteket illeti, a két toxin hatása csak részben fedi egymást a Col-0 növényekben: a primer gyökerek csúcaiban a DQ, szignifikánsan növeli a γ H2AX szinteket, de az 1 μ M MCY-LR nem (21. ábra/c. ábra). Tanulmányunk új betekintést nyújt a növényi sejtek ROS státuszának szabályozásába, továbbá kiindulópontja lehet a jövőbeni kutatásoknak, hogy átfogóbb képet kapjunk a PP2A és az oxidatív stressz kapcsolatáról a növényekben. A "közvetett foszfataz-függőség" magában foglalhatja, hogy a SOD aktivitások itt bemutatott változásai mellett a különböző SOD izoformák expressziós szintje is megváltozik a foszfataz mutánsokban, különböző mechanizmusok révén.

Főbb eredményeinket a 24. ábraán látható modellben foglaltuk össze (Freytag et al., 2023, Máthé Csaba modellje). Ez a modell azt mutatja, hogy a PP2A^B és C3-C4 alegységei hogyan vesznek részt az oxidatív stresszre adott válaszokban és a védekezésben *Arabidopsis thaliana*-ban. A modell azt is bemutatja, hogy az MCY-LR és a DQ különböző útvonalakon keresztül hat: Az MCY-LR mint PP2A-gátló közvetlenül hat a B" és a C3-C4 alegységek működésére, ezáltal megváltoztatja a ROS homeosztázist az *Arabidopsis thaliana*-ban.



24. ábra Javasolt modell, amely bemutatja a PP2A^{B''} és C3-C4 alegységeinek részvételét a ROS és γ H2AX szintek és a SOD aktivitás szabályozásában, valamint az MCY-LR (fehérje-foszfataz inhibitor) és a DQ (ROS induktor) részvételét ezekben a folyamatokban. Vastag piros nyilak jelzik a PP2A^{B''} és C alegységeinek szabályozó szerepét. Szabálytalan piros nyilak jelzik a MCY-LR beavatkozását ezekben a folyamatokba a PP2A^{B''} és C alegységeinek befolyásolásán keresztül, míg fekete szabálytalan nyilak a DQ célpontjait mutatják. A SOD izoformák tekintetében ez a modell azt mutatja, hogy a Cu/Zn-SOD és kisebb mértékben a Fe-SOD aktivitását a PP2A ezen alegységei szabályozzák, és a DQ a PP2A-tól független módon hat rájuk. alt = alteráció; px = peroxiszómák. Ezt az ábrát a BioR ender.com segítségével Máthé Csaba készítette.

7 További tervek

Kutatásaink alapján, véleményem szerint a jövő vizsgálatainak egyik fontos kérdése, hogy a növények miként döntenek el milyen életmenetet/stratégiát választanak a védekezésre? Melyek azok az aktivációs pontok a növények számára biotikus vagy abiotikus stressz során, ami elválasztja tolerálható stresszt és a kivédhetetlen károsodást?

Mindezek kapcsán érdemes lenne megvizsgálni a FASS és C3-C4 mutánsaiban az oldalgökök fejlődését és ehhez kapcsolódó folyamatokat, ami nem feltétlenül egyszerű mivel ezekben a mutánsokban csak 15-20 napos korukban jelennek meg oldalgökök ellenben a Col-0 ban jellemzően a 4-5 nap. Ráadásul a mutánsokban a gyökök korai primordium stádiumainak felfedezése komoly mikroszkópai kihívás. Szintén foszfatáz mutánsokban érdemes lehet vizsgálni a gravitációs válasz zavarának pontos okát is, mivel ezek a mutánsok (*fass* és *c3c4*) agravitropikusak és tudomásunk szerint ezt még nem vizsgálta senki.

A kutatás folytatása lehet, hogy a károsító hatású oxidatív stressz során megtalálható-e a sejtmagon belül a vizsgált FASS B” alegység és van-e interakció a PP2A valamelyik alaeegységevek esetleg a H2A-vel. Ennek vizsgálatára egyik lehetséges vizsgálati módszer a FRET mikroszkópos technika lehet.

8 Összefoglaló

Disszertációm középpontjában a protein foszforiláció és az oxidatív stressz áll, amelyek nélkülözhetetlen szabályozó szerepet töltenek be a legtöbb növényi életfolyamatban. A Mikrocisztin-LR (MCY-LR) egy kiváló eszköz e két jelenség vizsgálatához. A MCY-LR egy cianobakteriális heptapeptid toxin. Képes erősen gátolni a PP2A és PP1 protein-foszfatazokat (MacKintosh *et al.*, 1990). Emellett a MCY-LR indukálni képes oxidatív stressz-folyamatokat is (Máthé *et al.*, 2019).

Először az *Arabidopsis thaliana* (Columbia ökotípus; Col-0) 3-5 napos csíranövényeiben vizsgáltuk a gyökér növekedését és az oldalgökörek fejlődését. A gyökerek növekedésének és fejlődésének egyik szabályozója az auxin. Az auxin poláris transzportjáért és eloszlásáért felelős egyik transzmembrán fehérjecsalád pedig a foszforiláció függő PIN fehérjék. Kísérleteink során a következő eredményekre jutottunk.

(i) A konfokális pásztázó lézeres mikroszkópos (CLSM) vizsgálatok alapján viszonylag rövid távú (24 órás) MCY-LR kezelések csökkentették a PIN1, PIN2 és PIN7 szintet, de nem a PIN3 szintjét a primer gyökércsúcsokban. A fiatal oldalgökörekben ezzel szemben a PIN1 és PIN2 szintje nőtt és a PIN3 szintje csökkent, a primordiumokban szintén ezt a tendenciát követték a PIN fehérjék jelintenzitásai. A PIN-ek vizsgálata után adódott a kérdés, hogy van-e hatása a PIN mennyiségi változásainak az auxin-transzportjára? (ii) A DR5:GFP riporteraktivitás azt mutatta, hogy a cianotoxin által kiváltott auxinszintek/válaszok csökkenése a primer gyökércsúcsokban a PIN-szintekkel párhuzamosan változik. (iii) A fenotipikus vizsgálatok (növekedés, gravistimuláció) során azt láttuk, hogy ezek a változások nem befolyásolták a gyökerek gravitropikus válaszát, valamint kihatnak a gyökér növekedésére és fejlődésére. A MCY-LR kezelés ugyanakkor képes volt helyreállítani a *crk5-1* mutánsok (protein-kináz hibás

növények) megváltozott gravitropikus választ, és alapvető szerepet játszott a PIN2 helyes membrán lokalizációjában. A MCY-LR-rel kezelt Col-0 növényeknél a primer gyökér növekedése lelassult és a primordiumok száma megnőtt, míg a fiatal oldalgyökerek számát szintén visszafogta a kezelés.

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

A Col-0 és foszfataz mutáns csíranövény gyökerein végzett összes ROS méréseit, egy fluoreszcens mikroszkópos technika, a dikloro-dihidrofluoreszcein diacetát (DCFH-DA) jelöléssel végeztük. **(iv)** A primer gyökerek ROS szintje nagymértékben genotípusfüggő volt, és mind a C, mind a B” alegység mutánsai fokozott érzékenységet mutattak a kezelésekkal szemben, ami azt jelzi, hogy ezek az alegységek részt vesznek az oxidatív stressz szabályozásában. A ROS semlegesítést közvetve a szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitás vizsgálata révén mértük. **(v)** A SOD izoformák közül elsősorban a Cu/Zn SOD és kisebb mértékben a Fe-SOD aktivitása megváltozott, többnyire fokozott aktivitást mutatnak, főként a *fass* mutánsokban, és fokozott érzékenységet mutatnak a kezelésekre is. **(vi)** A kezeletlen és kezelt B” mutánsokkal végzett Western blot vizsgálatok bebizonyították, hogy többek között ez az alegység is szabályozza a H2AX,

egy hiszton variáns foszforilációjának szintjét. A γ H2AX foszforilált formája, kétszálú DNS-károsodást jelez oxidatív stressz során eukariótákban. **(vii)** A H2AX foszforilációs állapota, amely korrelál az oxidatív stresszválaszokkal, nem függ közvetlenül a PP2A katalitikus alegységeinek aktivitásában bekövetkező változásaitól, viszont a B" szabályozó alegységek igenis képesek befolyásolni a γ H2AX szintjét. *Arabidopsis thaliana*-ban tehát úgy tűnik, hogy a C3 és C4 (és más katalitikus alegységek) által adott PP2A aktivitás kisebb közvetlen szerepet játszik a γ H2AX defoszforilációban, mint a B" alegységekhez kapcsolódó egyéb események.

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

Összefoglalva, a protein-foszfataz aktivitás gátlása megváltoztatta a gyökérben a helyi PIN- és auxin szinteket, így megváltozott a gyökérfejlődés. Továbbá, rámutatunk a PP2A valószínűleg kulcsfontosságú szerepére a növények oxidatív stresszreakcióinak szabályozásában.

9 Summary

My dissertation intends to give a contribution to the understanding of the regulatory role of protein phosphorylation in auxin transport and oxidative stress responses in *Arabidopsis thaliana*. Microcystin- LR (MCY-LR) is a suitable tool to study these two phenomena. MCY-LR is one of the most common cyanobacterial heptapeptide toxins. It strongly inhibits the protein phosphatases PP2A and PP1 (MacKintosh et al., 1990). In addition, the ability to trigger oxidative stress processes is considered an important property of MCY-LR (Máthé et al., 2019).

In the first study, we investigated root growth and lateral root development in 3-5 days-old seedlings of *Arabidopsis thaliana* (Columbia ecotype; Col-0). One of the regulators of root growth and development is auxin. The phosphorylation-dependent PIN proteins are a family of transmembrane proteins responsible for the polar transport and distribution of auxin.

(i) Confocal laser scanning microscopy (CLSM) studies showed that relatively short-term (24 h) MCY-LR treatments reduced PIN1, PIN2 and PIN7 levels but not PIN3 levels in primary root tips. In contrast, PIN1 and PIN2 contents increased in emerging lateral roots, and their levels differed according to the type of PIN protein in lateral root primordia. After studying PINs, the question arose whether the changes in PIN levels affected auxin transport? **(ii)** DR5:GFP reporter activity showed that the cyanotoxin-induced decrease in auxin levels/responses in primary root tips varied in parallel with PIN levels. **(iii)** Phenotypic studies (growth, gravistimulation) showed that these changes did not affect the gravitropic response of the roots, but affected root growth and development. Treatment with MCY-LR restored the altered gravitropic response of *crk5-1* mutants, a plant with protein kinase defect. CRK5 plays a fundamental role in the correct membrane localisation of PIN2.

Furthermore, in MCY-LR -treated Col-0 plants, primary root growth was slowed and the number of lateral root primordia increased, while the number of lateral roots that emerged was also limited by the treatment.

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

The total amount of ROS in the roots of Col-0 and phosphatase mutants was measured using a fluorescence microscopy technique, dichloro-dihydro fluorescein diacetate labelling (DCFH-DA). **(iv)** Contents of ROS in primary roots were highly genotype dependent and subunit C and B" mutants showed increased sensitivity to treatments, suggesting that these subunits are involved in the induction of oxidative stress. Elimination of ROS was measured indirectly by an in-gel activity assay of superoxide dismutase (SOD). **(v)** The SOD isoforms, mainly Cu/Zn SOD showed altered, mostly increased activity, especially in *fass* mutants, and increased sensitivity to treatments. **(vi)** Western blot studies in control and treated B" mutants showed that this subunit regulates the phosphorylation of H2AX, a histone variant. The phosphorylated form of H2AX indicates double-stranded DNA damage during oxidative stress in eukaryotes. **(vii)** The phosphorylation state of H2AX, which correlates with oxidative stress responses, does not directly depend on changes in the activity of the catalytic subunits of PP2AC, but regulatory subunit B" can influence

γ H2AX levels. Thus, in *Arabidopsis thaliana*, PP2A activity mediated by C3 and C4 (and other catalytic subunits) appears to play less direct role in γ H2AX dephosphorylation than other events associated with the B" subunits.

(viii) The involvement of the B" subunit in the above processes depends not only on its presence or absence, but also on its amount/activity relative to the holoenzyme, as shown by comparing homozygous recessive and heterozygous genotypes of *fass-5* and *fass-15* mutants. Our results also have toxicological implications. Although several studies have shown that MCY-LR induces oxidative stress by mechanisms independent of the phosphatase inhibitory activity of the protein, we have shown that it also induces oxidative stress by modulating PP2A in both wild-type plants and B/C subunit mutants. In this context, many of the effects of MCY-LR studied here differ from those of DQ, whose ROS induction mechanisms are at least partially independent of PP2A. Given the partially divergent effects of MCY-LR and DQ, the induction and oxidative stress responses in *Arabidopsis thaliana* are not entirely dependent on PP2A.

In conclusion, inhibition of protein phosphatase activity altered the local levels of PIN and auxin, resulting in altered root development. Previous data on naturally occurring aquatic plants treated with the cyanotoxin showed similar changes in root development.

We point to a likely key role of PP2A in regulating oxidative stress responses in plants and pave the way for future research that can elucidate the signalling pathways involved.

Material and methods

Our studies were conducted in *Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype and its mutants. We have also used plants bearing PIN1:PIN1-GFP, PIN2:PIN2-GFP, and PIN3:PIN3-GFP fusion constructs in the Col-0 background (Benková et al., 2003; Xu et al, 2006; Žádníková et al, 2010),

DR5rev:GFP fusion construct (Friml et al, 2003b; Žádníková et al, 2010). Mutants were as follows: the *crk5-1* loss-of-function mutant (Rigó et al, 2013) and protein phosphatase (PP2A) mutants described by Camilleri et al. (2002), Kirik et al. (2012a) and Spinner et al. (2013). They are *c3c4*, a double mutant of the catalytic subunit and the regulatory subunit B" *fass-15* and *fass-5* mutants. Plants were grown under axenic conditions on modified MS (Murashige & Skoog, 1962) medium supplemented with Gamborg vitamins (1968), 2% (w/v) sucrose (Molar, Budapest, Hungary) and 0.8% (w/v) Bacto agar (Difco, Lawrence, KS, USA). Growth conditions: 14/10 h photoperiod, 22±2°C, 60 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ photon flux density in the photoperiod.

GFP fusion protein-containing plants and PIN and γH2AX -immunolabelled plants were examined by confocal laser scanning microscopy (CLSM). DCFH-DA Total ROS signals were studied by DCFH-DA labeling and detected by conventional epifluorescence microscopy. Quantitative detection of the γH2AX protein was performed using the western blot technique. Measurement of SOD enzyme activities was performed by non-denaturing gel electrophoresis using methods adopted from Giannopolitis & Ries (1977) and Bertrand & Eze (2014). Phosphatase activity was measured using the ^{32}P isotope technique as previously described (Erdódi et al., 1995; Garda et al., 2018; Máthé et al., 2013)

GelAnalyzer 19.1® software ((www.gelanalyzer.com) Ifj. István Lázár, PhD id. István Lázár, PhD, CSc) was performed. Microscopic sections were created and analysed with the programmes Zen Black 2.3, ZEN Blue 2.3 Lite and Fiji (ImageJ-Win64) (Schindelin et al., 2012)

10 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Máthé Csaba egyetemi professzornak, hogy lehetővé tette, nyomon követte és szakmai tapasztalatával segítette, koordinálta munkámat az alapképzéstől kezdve. Köszönöm dr. Garda Tamásnak a kísérletek kivitelzésében nyújtott segítségét. Külön köszönet illeti Magi Dorottyát segítőkész munkájáért.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Vasas Gábor tanszékvezető Úrnak, hogy biztosította számunkra a kísérletek során felhasznált toxinokat.

Köszönöm Prof. Dr. Vereb Györgynek és Dr. Ujlaky-Nagy Lászlónak a konfokális mikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségüket és hasznos tanácsaikat.

Köszönettel tartozom Prof. Erdődi Frencknek és dr. Kónya Zoltánnak (DE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet) az izotópos mérésekben nyújtott segítségükért.

Köszönöm prof. Szabados Lászlónak, dr. Rigó Gábornak, és dr. Cséplő Ágnesnek (Szegedi Biológiai Kutatóközpont) a gravistimulációs vizsgálatokban nyújtott segítségüket és hogy rendelkezésemre bocsájtották a *crk5-1* magokat.

Köszönöm dr. Tomasz Nodzyńskinak (CEITEC, Masaryk University, Brno, Czech Republic) a PIN immunjelölések kivitelzésében nyújtott segítségét és támogatását.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Martine Pastugliának (Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, Centre de Versailles), aki rendelkezésünkre bocsátotta a *fass* és *c3c4* magokat.

Köszönöm dr. Taras Pasternak tanácsait a whole mount immunhisztokémiai jelöléssel kapcsolatban.

Köszönöm Jiří Frimlnek a kísérleti elrendezéssel kapcsolatos hasznos tanácsait és a PIN:GFP növények beszerzésében nyújtott segítséget.

Köszönöm Peace Adedokun Oluwatosin-nak a Western blotok kivitelzésében nyújtott hathatós segítségét.

Köszönöm Juhász Gabriella Petrának a DCFH-DA mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm Pózer Erik Tamásnak a gyökér növekedési vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönöm Riba Milánnak, hogy mindig rendelkezésemre állt szakmai kérdések megvitatásában.

Szeretnék köszönetet mondani a DE TTK Növényteni Tanszék minden jelenlegi és volt dolgozójának, PhD hallgatójának, illetve szakdolgozójának, akik segítették a munkámat.

Valamint köszönöm Dr. Sebestyén Flórának a disszertációs munkám során a nyújtott támogatását.

A DOLGOZAT A KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS
MINISZTERIUM ÚNKP-22-4-I-DE-11 KÓDSZÁMÚ ÚJ NEMZETI
KIVÁLÓSÁG PROGRAMJÁNAK A NEMZETI KUTATÁSI,
FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS ALAPBÓL FINANSZÍROZOTT
SZAKMAI TÁMOGATÁSÁVAL KÉSZÜLT



KULTURÁLIS ÉS INNOVÁCIÓS
MINISZTERIUM

11 Irodalomjegyzék

Abozeid, A. *et al.* (2017) ‘Ethylene Improves Root System Development under Cadmium Stress by Modulating Superoxide Anion Concentration in *Arabidopsis thaliana*’, *Frontiers in Plant Science*, 8, p. 253. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00253>.

Acar, A. (2021) ‘In vivo toxicological assessment of diquat dibromide: cytotoxic, genotoxic, and biochemical approach’, *Environmental Science and Pollution Research*, 28(34), pp. 47550–47561. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13936-0>.

Adamowski, M. and Friml, J. (2015) ‘PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution’, *The Plant Cell Online*, 27(1), pp. 20–32. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.114.134874>.

Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S. (2002) ‘Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants’, *Journal of experimental botany*, 53(372), pp. 1331–1341.

Apel, K. and Hirt, H. (2004) ‘Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction’, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, pp. 373–399.

Baba, A.I. *et al.* (2019) ‘AtCRK5 Protein Kinase Exhibits a Regulatory Role in Hypocotyl Hook Development during Skotomorphogenesis’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), p. 3432. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20143432>.

Ballesteros, I. *et al.* (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(5), pp. 862–872. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.12078>.

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

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

Bertrand, R.L. and Eze, M.O. (2014) ‘Modifying Polyacrylamide Background Color for the Nitroblue Tetrazolium-Based Superoxide Dismutase Staining

Assay', *Advances in Enzyme Research*, 02(02), pp. 77–81. Available at: <https://doi.org/10.4236/aer.2014.22008>.

Beyer, D. *et al.* (2012) 'Microcystin-LR, a protein phosphatase inhibitor, induces alterations in mitotic chromatin and microtubule organization leading to the formation of micronuclei in *Vicia faba*', *Annals of Botany*, 110(4), pp. 797–808. Available at: <https://doi.org/10.1093/aob/mcs154>.

Blakeslee, J.J. *et al.* (2007) 'Specificity of RCN1-Mediated Protein Phosphatase 2A Regulation in Meristem Organization and Stress Response in Roots', *PLANT PHYSIOLOGY*, 146(2), pp. 539–553. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.107.112995>.

Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. (2003) 'Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review', *Annals of Botany*, 91(2), pp. 179–194. Available at: <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>.

Bouaïcha, N. *et al.* (2019) 'Structural diversity, characterization and toxicology of microcystins', *Toxins*, 11(12), p. 714. Available at: <https://doi.org/10.3390/toxins11120714>.

Bradford, M.M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254.

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

Campos, A. *et al.* (2021) 'Impacts of microcystins on orphological and physiological parameters of agricultural plants: A review', *Plants*, 10(4), p. 639. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants10040639>.

Campos, A. and Vasconcelos, V. (2010) 'Molecular Mechanisms of Microcystin Toxicity in Animal Cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), pp. 268–287. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms11010268>.

Cargnello, M. and Roux, P.P. (2011) 'Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75(1), pp. 50–83. Available at: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-10>.

Ceulemans, H. and Bollen, M. (2004) 'Functional Diversity of Protein Phosphatase-1, a Cellular Economizer and Reset Button', *Physiological Reviews*, 84(1), pp. 1–39. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2003>.

Chapman, J.M. *et al.* (2019) 'RBOH-Dependent ROS Synthesis and ROS Scavenging by Plant Specialized Metabolites To Modulate Plant Development and Stress Responses', *Chemical Research in Toxicology*, 32(3), pp. 370–396. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00028>.

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

Chen, J. *et al.* (2013) 'Microcystin-LR-induced phytotoxicity in rice crown root is associated with the cross-talk between auxin and nitric oxide', *Chemosphere*, 93(2), pp. 283–293. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.079>.

Chen, J. *et al.* (2021) 'Effects of Acute Diquat Poisoning on Liver Mitochondrial Apoptosis and Autophagy in Ducks', *Frontiers in Veterinary Science*, 8, p. 727766. Available at: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.727766>.

Chen, L. and Xie, P. (2016) 'Mechanisms of Microcystin-induced Cytotoxicity and Apoptosis', *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(13), pp. 1018–1031. Available at: <https://doi.org/10.2174/1389557516666160219130407>.

Choudhury, F.K. *et al.* (2017) 'Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination', *The Plant Journal*, 90(5), pp. 856–867. Available at: <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>.

Creighton, M.T. *et al.* (2017) 'Light regulation of nitrate reductase by catalytic subunits of protein phosphatase 2A', *Planta*, 246(4), pp. 701–710. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2726-4>.

DeLong, A., Mockaitis, K. and Christensen, S. (2002) 'Protein phosphorylation in the delivery of and response to auxin signals', in C. Perrot-Rechenmann and G. Hagen (eds) *Auxin Molecular Biology*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 285–303. Available at: https://doi.org/10.1007/978-94-010-0377-3_3.

Deruère, J. *et al.* (1999) 'The RCN1-encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo', *The Plant Journal*, 20(4), pp. 389–399. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00607.x>.

Doyle, S.M. *et al.* (2019) 'A role for the auxin precursor anthranilic acid in root gravitropism via regulation of PIN-FORMED protein polarity and relocalisation in Arabidopsis', *New Phytologist*, 223(3), pp. 1420–1432. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.15877>.

Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E. and Krupa, Z. (2007) 'The redox state and activity of superoxide dismutase classes in Arabidopsis thaliana under cadmium or copper stress', *Chemosphere*, 67(1), pp. 188–193. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.032>.

Drobac, D. *et al.* (2017) 'Microcystin accumulation and potential effects on antioxidant capacity of leaves and fruits of Capsicum annuum', *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(3), pp. 145–154. Available at: <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1259527>.

Dubrovsky, J.G. *et al.* (2009) 'The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation', *Annals of Botany*, 103(5), pp. 807–817. Available at: <https://doi.org/10.1093/aob/mcn267>.

Durian, G. *et al.* (2020) 'PROTEIN PHOSPHATASE 2A-B γ Controls Botrytis cinerea Resistance and Developmental Leaf Senescence1 [OPEN]', *Plant Physiology*, 182(2), pp. 1161–1181. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.19.00893>.

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

Elshobaky, A. *et al.* (2023) 'Protein–Protein Interactions and Quantitative Phosphoproteomic Analysis Reveal Potential Mitochondrial Substrates of Protein Phosphatase 2A-B ζ Holoenzyme', *Plants*, 12(13), p. 2586. Available at: <https://doi.org/10.3390/plants12132586>.

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

Farkas, I. *et al.* (2007) ‘Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases’, *Trends in Plant Science*, 12(4), pp. 169–176. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.03.003>.

Feierabend, J. (2005) ‘Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defence.’, in N. Smirnoff (ed.) *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford, UK: Blackwell Pub, pp. 101-140.

Feraru, E. and Friml, J. (2008) ‘PIN Polar Targeting’, *Plant Physiology*, 147(4), pp. 1553–1559. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.108.121756>.

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

Fladmark, K.E. *et al.* (2002) ‘Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Is Required for Microcystin-induced Apoptosis’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(4), pp. 2804–2811. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109049200>.

Fontanillo, M. and Köhn, M. (2018) ‘Microcystins: Synthesis and structure–activity relationship studies toward PP1 and PP2A’, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(6), pp. 1118–1126. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.08.040>.

Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005) ‘Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context’, *Plant, Cell & Environment*, 28(8), pp. 1056–1071. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>.

Freytag, C. *et al.* (2021) ‘Microcystin-LR, a cyanobacterial toxin affects root development by changing levels of PIN proteins and auxin response in Arabidopsis roots’, *Chemosphere*, 276, p. 130183. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130183>.

Freytag, C. *et al.* (2023) ‘B’ and C subunits of PP2A regulate the levels of reactive oxygen species and superoxide dismutase activities in Arabidopsis’, *Plant Physiology and Biochemistry*, 195, pp. 182–192. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.12.031>.

Friml, J., Benková, E., *et al.* (2003) 'Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings', *The Plant Journal*, 34(1), pp. 115–124. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01705.x>.

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

Friml, J. *et al.* (2004) 'A PINOID-Dependent Binary Switch in Apical-Basal PIN Polar Targeting Directs Auxin Efflux', *Science*, 306(5697), pp. 862–865. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1100618>.

Fuchs, J. *et al.* (2006) 'Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity', *Trends in Plant Science*, 11(4), pp. 199–208. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.008>.

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

Ganguly, A., Lee, S.-H. and Cho, H.-T. (2012) 'Functional identification of the phosphorylation sites of Arabidopsis PIN-FORMED3 for its subcellular localization and biological role', *The Plant Journal*, 71(5), pp. 810–823. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05030.x>.

Gao, X. *et al.* (2008) 'Cell Polarity Signaling: Focus on Polar Auxin Transport', *Molecular Plant*, 1(6), pp. 899–909. Available at: <https://doi.org/10.1093/mp/ssn069>.

Garbers, C. *et al.* (1996) 'A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in Arabidopsis.', *The EMBO Journal*, 15(9), pp. 2115–2124. Available at: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00565.x>.

Garda, T. *et al.* (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, pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.04.009>.

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

Gehring, M.M. (2004) 'Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response', *FEBS Letters*, 557(1–3), pp. 1–8. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01447-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01447-9).

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

Grones, P. *et al.* (2018) 'PID/WAG-mediated phosphorylation of the Arabidopsis PIN3 auxin transporter mediates polarity switches during gravitropism', *Scientific Reports*, 8(1), p. 10279. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28188-1>.

Habets, M.E.J. and Offringa, R. (2014) 'PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals', *New Phytologist*, 203(2), pp. 362–377. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.12831>.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (2015) 'Responses to plant pathogens.', in B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Oxford, UK: John Wiley & Sons, pp. 984–1050.

Hancock, J. *et al.* (2006) 'Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception', *Journal of Experimental Botany*, 57(8), pp. 1711–1718. Available at: <https://doi.org/10.1093/jxb/erj180>.

Hu, Y. and Da, L. (2014) 'Insights into the selective binding and toxic mechanism of microcystin to catalase', *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121, pp. 230–237. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.078>.

Jámbrik, K. *et al.* (2011) 'Microcystin-LR induces chromatin alterations and modulates neutral single-strand-preferring nuclease activity in *Phragmites australis*', *Journal of Plant Physiology*, 168(7), pp. 678–686. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.10.007>.

Jambunathan, N. (2010) 'Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 639, pp. 292–298. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_18.

Jia, Y. *et al.* (2018) 'Phytotoxicity, bioaccumulation and potential risks of plant irrigations using cyanobloom-loading freshwater', *Science of The Total Environment*, 624, pp. 704–712. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.164>.

Jiang, L. *et al.* (2018) 'Central Roles and Regulatory Mechanisms of Dual-Specificity MAPK Phosphatases in Developmental and Stress Signaling', *Frontiers in Plant Science*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01697>.

Kapoor, D. *et al.* (2019) 'Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS)', *Plant Gene*, 19, p. 100182. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2019.100182>.

Kataya, A.R.A. *et al.* (2015) 'Protein Phosphatase 2A Holoenzyme Is Targeted to Peroxisomes by Piggybacking and Positively Affects Peroxisomal β -Oxidation', *Plant Physiology*, 167(2), pp. 493–506. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.114.254409>.

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

Kleine-Vehn, J. *et al.* (2009) 'PIN Auxin Efflux Carrier Polarity Is Regulated by PINOID Kinase-Mediated Recruitment into GNOM-Independent Trafficking in Arabidopsis', *The Plant Cell*, 21(12), pp. 3839–3849. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071639>.

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

Kobayashi, M. *et al.* (2007) 'Calcium-Dependent Protein Kinases Regulate the Production of Reactive Oxygen Species by Potato NADPH Oxidase', *The Plant Cell*, 19(3), pp. 1065–1080. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048884>.

Konert, G. *et al.* (2015) 'Subunits B γ and B ζ of protein phosphatase 2A regulate photo-oxidative stress responses and growth in Arabidopsis thaliana',

Plant, Cell & Environment, 38(12), pp. 2641–2651. Available at: <https://doi.org/10.1111/pce.12575>.

Konstantinova, N. *et al.* (2022) ‘WAVY GROWTH Arabidopsis E3 ubiquitin ligases affect apical PIN sorting decisions’, *Nature Communications*, 13(1), p. 5147. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32888-8>.

Kós, P. *et al.* (1995) ‘Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.)’, *Analytical Biochemistry*, 225(1), pp. 49–53. Available at: <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1106>.

Laemmli, U.K. (1970) ‘Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4’, *Nature*, 227, pp. 680–685. Available at: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

Li, S. *et al.* (2014) ‘The protein phosphatase subunit PP2A-B γ is required to suppress day length-dependent pathogenesis responses triggered by intracellular oxidative stress’, *New Phytologist*, 202(1), pp. 145–160. Available at: <https://doi.org/10.1111/nph.12622>.

Li, T. *et al.* (2012) ‘Microcystin-LR Induces Ceramide to Regulate PP2A and Destabilize Cytoskeleton in HEK293 Cells’, *Toxicological Sciences*, 128(1), pp. 147–157. Available at: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs141>.

Li, Y.M. and Casida, J.E. (1992) ‘Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(24), pp. 11867–11870. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.11867>.

Liao, Y.-D. *et al.* (2016) ‘*Oryza sativa* protein phosphatase 1a (OsPP1a) involved in salt stress tolerance in transgenic rice’, *Molecular Breeding*, 3(36), pp. 1–19. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0446-2>.

Linkert, M. *et al.* (2010) ‘Metadata matters: access to image data in the real world’, *Journal of Cell Biology*, 189(5), pp. 777–782. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.201004104>.

Löfke, C., Luschnig, C. and Kleine-Vehn, J. (2013) ‘Posttranslational modification and trafficking of PIN auxin efflux carriers’, *Mechanisms of Development*, 130(1), pp. 82–94. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.02.003>.

Luan, S. (2003) 'Protein Phosphatases in Plants', *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), pp. 63–92. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134743>.

Ludwików, A. *et al.* (2014) 'Arabidopsis Protein Phosphatase 2C ABI1 Interacts with Type I ACC Synthases and Is Involved in the Regulation of Ozone-Induced Ethylene Biosynthesis', *Molecular Plant*, 7(6), pp. 960–976. Available at: <https://doi.org/10.1093/mp/ssu025>.

Luschnig, C. and Vert, G. (2014) 'The dynamics of plant plasma membrane proteins: PINs and beyond', *Development*, 141(15), pp. 2924–2938. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.103424>.

Lv, Z. *et al.* (2021) 'Changing Gly311 to an acidic amino acid in the MATE family protein DTX6 enhances Arabidopsis resistance to the dihydropyridine herbicides', *Molecular Plant*, 14(12), pp. 2115–2125. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.09.002>.

Machado, J. *et al.* (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, pp. 191–204. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.015>.

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

MacKintosh, C. and Diplexcito, J. (2003) 'CHAPTER 102 - Naturally Occurring Inhibitors of Protein Serine/Threonine Phosphatases', in R.A. Bradshaw and E.A. Dennis (eds) *Handbook of Cell Signaling*. Burlington: Academic Press, pp. 607–611. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-012124546-7/50463-0>.

MacKintosh, C. and Diplexcito, J. (2009) 'Naturally occurring inhibitors of serine/threonine phosphatases.', in R.A. Bradshaw and E.A. Dennis (eds) *Handbook of Cell Signaling*. Academic Press.

Mase, K. and Tsukagoshi, H. (2021) 'Reactive Oxygen Species Link Gene Regulatory Networks During Arabidopsis Root Development', *Frontiers in Plant Science*, 12. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2021.660274> (Accessed: 13 May 2023).

Máthé, C. *et al.* (2009) ‘Microcystin-LR induces abnormal root development by altering microtubule organization in tissue-cultured common reed (*Phragmites australis*) plantlets’, *Aquatic Toxicology*, 92(3), pp. 122–130. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.02.005>.

Máthé, C. *et al.* (2016) ‘The effects of microcystins (cyanobacterial heptapeptides) on the eukaryotic cytoskeletal system’, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, (16), pp. 1063–1077.

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

Máthé, C. *et al.* (2021) ‘The Protein Phosphatase PP2A Plays Multiple Roles in Plant Development by Regulation of Vesicle Traffic—Facts and Questions’, *Int. J. Mol. Sci.*, p. 19.

Máthé, C. *et al.* (2023) ‘New insights into the roles of PP2A subunits FASS and C3/C4 in the regulation of mitosis and oxidative stress responses in *Arabidopsis*’, in: *Botanical Microscopy Meeting 2023*, pp. 77–78. Available at: <https://m2.mtmt.hu/api/publication/33749195>.

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

Meinhard, M. and Grill, E. (2001) ‘Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from *Arabidopsis*’, *FEBS Letters*, 508(3), pp. 443–446. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03106-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03106-4).

Meng, G. *et al.* (2011) ‘Microcystin-LR induces cytoskeleton system reorganization through hyperphosphorylation of tau and HSP27 via PP2A inhibition and subsequent activation of the p38 MAPK signaling pathway in neuroendocrine (PC12) cells’, *Toxicology*, 290(2), pp. 218–229. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.09.085>.

Michniewicz, M., Zago, M.K., *et al.* (2007) ‘Antagonistic Regulation of PIN Phosphorylation by PP2A and PINOID Directs Auxin Flux’, *Cell*, 130(6), pp. 1044–1056. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.033>.

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

Mittler, R. (2017) 'ROS Are Good', *Trends in Plant Science*, 22(1), pp. 11–19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.

Moreno-Romero, J. *et al.* (2012) 'CK2-defective Arabidopsis plants exhibit enhanced double-strand break repair rates and reduced survival after exposure to ionizing radiation', *The Plant Journal*, 71(4), pp. 627–638. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05019.x>.

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

Nakagami, H. *et al.* (2010) 'Large-Scale Comparative Phosphoproteomics Identifies Conserved Phosphorylation Sites in Plants', *Plant Physiology*, 153(3), pp. 1161–1174. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.110.157347>.

Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J. (2002) 'Hydrogen peroxide signalling', *Current Opinion in Plant Biology*, 5(5), pp. 388–395. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00282-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00282-0).

Noctor, G., Reichheld, J.-P. and Foyer, C.H. (2018) 'ROS-related redox regulation and signaling in plants', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, pp. 3–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.013>.

O'Brien, J.A. *et al.* (2012) 'Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism', *Planta*, 236(3), pp. 765–779. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1696-9>.

Okumura, K. *et al.* (2013) 'GNOM/FEWER ROOTS is Required for the Establishment of an Auxin Response Maximum for Arabidopsis Lateral Root Initiation', *Plant and Cell Physiology*, 54(3), pp. 406–417. Available at: <https://doi.org/10.1093/pcp/pct018>.

O'Neil, J.M. *et al.* (2012) 'The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change', *Harmful Algae*, 14, pp. 313–334. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>.

Padisák, J., Vasas, G. and Borics, G. (2016) 'Phycogeography of freshwater phytoplankton: Traditional knowledge and new molecular tools', *Hydrobiologia*, 764(1), pp. 3–27. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2259-4>.

Paerl, H.W. and Huisman, J. (2008) 'CLIMATE: Blooms Like It Hot', *Science*, 320(5872), pp. 57–58. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1155398>.

Pappas, D., Gkelis, S. and Panteris, E. (2020) 'The effects of microcystin-LR in *Oryza sativa* root cells: F-actin as a new target of cyanobacterial toxicity', *Plant Biology*. Edited by B. Liu, 22(5), pp. 839–849. Available at: <https://doi.org/10.1111/plb.13120>.

Pasternak, T. *et al.* (2015) 'Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants', *Plant Methods*, 11. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0094-2>.

Pflugmacher, S. (2002) 'Possible allelopathic effects of cyanotoxins, with reference to microcystin-LR, in aquatic ecosystems', *Environmental Toxicology*, 17(4), pp. 407–413. Available at: <https://doi.org/10.1002/tox.10071>.

Pflugmacher, S. (2016) 'Biotransformation of Microcystins in Eukaryotic Cells - Possible Future Research Directions', *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(13), pp. 1078–1083.

PhosPhAt 4.0 - Entry Statistics (no date). Available at: <https://phosphat.uni-hohenheim.de/statistics.html> (Accessed: 26 July 2023).

Pouria, S. *et al.* (1998) 'Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil', *The Lancet*, 352(9121), pp. 21–26. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)12285-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)12285-1).

Rahman, A. *et al.* (2010) 'Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* Roots Requires the Polarization of PIN2 toward the Root Tip in Meristematic Cortical Cells', *The Plant Cell*, 22(6), pp. 1762–1776. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075317>.

Rashotte, A.M., DeLong, A. and Muday, G.K. (2001) 'Genetic and Chemical Reductions in Protein Phosphatase Activity Alter Auxin Transport, Gravity Response, and Lateral Root Growth', *The Plant Cell*, 13(7), pp. 1683–1697. Available at: <https://doi.org/10.1105/TPC.010158>.

Rastogi, R.P., Sinha, R.P. and Incharoensakdi, A. (2014) 'The cyanotoxin-microcystins: current overview', *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(2), pp. 215–249. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9334-6>.

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

Roitinger, E. *et al.* (2015) 'Quantitative Phosphoproteomics of the Ataxia Telangiectasia-Mutated (ATM) and Ataxia Telangiectasia-Mutated and Rad3-related (ATR) Dependent DNA Damage Response in *Arabidopsis thaliana*', *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 14(3), pp. 556–571. Available at: <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.040352>.

Sagi, M. and Fluhr, R. (2006) 'Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases', *Plant Physiology*, 141(2), pp. 336–340. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.106.078089>.

Sauer, M. *et al.* (2006) 'Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity', *Genes & Development*, 20(20), pp. 2902–2911. Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.390806>.

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

Shi, Y. (2009) 'Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure', *Cell*, 139(3), pp. 468–484. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.006>.

Shin, H. *et al.* (2005) 'Complex regulation of *Arabidopsis* AGR1/PIN2-mediated root gravitropic response and basipetal auxin transport by cantharidin-sensitive protein phosphatases', *The Plant Journal*, 42(2), pp. 188–200. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02369.x>.

Shinozaki, K. *et al.* (2015) 'Responses to Abiotic Stress', in B.B. Buchanan, W. Gruissem, and R.L. Jones (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2nd edn. John Wiley & Sons, pp. 1085–1094.

Skokan, R. *et al.* (2019) 'PIN-driven auxin transport emerged early in streptophyte evolution', *Nature Plants*, 5(11), pp. 1114–1119. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0542-5>.

Smith, R.D. and Walker, J.C. (1996) 'Plant Protein Phosphatases', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), pp. 101–125. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.101>.

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

Sugiyama, N. *et al.* (2008) 'Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis', *Molecular Systems Biology*, 4(1), p. 193. Available at: <https://doi.org/10.1038/msb.2008.32>.

Swarup, R. and Bennett, M.J. (2018) 'Root Gravitropism', in J.A. Roberts (ed.) *Annual Plant Reviews online*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 157–174. Available at: <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0401>.

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

Templeton, G.W. and Moorhead, G.B.G. (2005) 'The phosphoinositide-3-OH-kinase-related kinases of Arabidopsis thaliana', *EMBO Reports*, 6(8), pp. 723–728. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400479>.

Torres-Martínez, H.H. *et al.* (2019) 'Lateral Root Primordium Morphogenesis in Angiosperms', *Frontiers in Plant Science*, 10. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00206> (Accessed: 28 July 2023).

Trotta, A., Konert, G., *et al.* (2011) 'Knock-down of protein phosphatase 2A subunit B γ promotes phosphorylation of CALRETICULIN 1 in Arabidopsis thaliana', *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), pp. 1665–1668. Available at: <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17829>.

Trotta, A., Wrzaczek, M., *et al.* (2011) 'Regulatory Subunit B γ of Protein Phosphatase 2A Prevents Unnecessary Defense Reactions under Low Light in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 156(3), pp. 1464–1480. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.111.178442>.

Tyagi, S. *et al.* (2019) 'Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Stress Tolerance in Plants', in S.P. Singh *et al.* (eds) *Molecular Approaches in Plant Biology and Environmental Challenges*. Singapore: Springer (Energy, Environment, and Sustainability), pp. 51–77. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-15-0690-1_3.

Uhrig, R.G., Labandera, A.-M. and Moorhead, G.B. (2013) 'Arabidopsis PPP family of serine/threonine protein phosphatases: many targets but few engines', *Trends in Plant Science*, 18(9), pp. 505–513. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.05.004>.

Valério, E., Vasconcelos, V. and Campos, A. (2016) 'New Insights on the Mode of Action of Microcystins in Animal Cells - A Review', *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 16(13), pp. 1032–1041.

Van Breusegem, F. *et al.* (1999) 'Overproduction of Arabidopsis thaliana FeSOD Confers Oxidative Stress Tolerance to Transgenic Maize', *Plant and Cell Physiology*, 40(5), pp. 515–523. Available at: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029572>.

Vasas, G. *et al.* (2004) 'Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis', *ELECTROPHORESIS*, 25(1), pp. 108–115. Available at: <https://doi.org/10.1002/elps.200305641>.

Virshup, D.M. and Shenolikar, S. (2009) 'From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover', *Molecular Cell*, 33(5), pp. 537–545. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.015>.

Waadt, R. *et al.* (2015) 'Identification of Open Stomata1-Interacting Proteins Reveals Interactions with Sucrose Non-fermenting1-Related Protein Kinases2 and with Type 2A Protein Phosphatases That Function in Abscisic Acid Responses1[OPEN]', *Plant Physiology*, 169(1), pp. 760–779. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.15.00575>.

Wang, Y. *et al.* (2004) 'Transgenic Arabidopsis overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance', *Plant Science*, 4(167), pp. 671–677. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.032>.

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

Wrzaczek, M. and Hirt, H. (2001) 'Plant MAP kinase pathways: how many and what for?', *Biology of the Cell*, 93(1–2), pp. 81–87. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(01\)01121-2](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(01)01121-2).

Xi, W. *et al.* (2016) 'Pin1At regulates PIN1 polar localization and root gravitropism', *Nature Communications*, 7(1), p. 10430. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms10430>.

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

Xu, J. *et al.* (2019) 'GhL1L1 affects cell fate specification by regulating GhPIN1-mediated auxin distribution', *Plant Biotechnology Journal*, 17(1), pp. 63–74. Available at: <https://doi.org/10.1111/pbi.12947>.

Yao, H.-Y. and Xue, H.-W. (2011) 'Signals and mechanisms affecting vesicular trafficking during root growth', *Current Opinion in Plant Biology*, 14(5), pp. 571–579. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.06.009>.

Yoon, J.-T., Ahn, H.-K. and Pai, H.-S. (2018) 'The subfamily II catalytic subunits of protein phosphatase 2A (PP2A) are involved in cortical microtubule organization', *Planta*, 248(6), pp. 1551–1567. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3000-0>.

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

Zandalinas, S.I. and Mittler, R. (2018) 'ROS-induced ROS release in plant and animal cells', *Free Radical Biology and Medicine*, 122, pp. 21–27. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.11.028>.

Zer, H., Chevion, M. and Goldberg, I. (1993) 'Effect of Paraquat on Dark-Grown *Phaseolus vulgaris* Cells', *Weed Science*, 41(4), pp. 528–533. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0043174500076268>.

Zhou, H.-W. *et al.* (2004) 'Disparate Roles for the Regulatory A Subunit Isoforms in *Arabidopsis* Protein Phosphatase 2A', *The Plant Cell*, 16(3), pp. 709–722. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.018994>.

Zhou, X. *et al.* (2020) 'Modulatory Role of Reactive Oxygen Species in Root Development in Model Plant of *Arabidopsis thaliana*', *Frontiers in Plant*

Science, 11. Available at:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.485932> (Accessed: 13
May 2023).

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