

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

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

Beyer Dániel Ernő

Témavezetők: Dr. Máthé Csaba

Dr. Borbély György



Debreceni Egyetem

Juhász Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2010

1. Bevezetés és célkitűzések

1.1. Bevezetés

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

A cianotoxinok károsak az emberre és haszonállatokra, emellett a vízi ökoszisztémák fenntartásában szerepet játszó állatokra (Carmichael 1994). Két cianotoxinról ismeretes, hogy a növényekre is káros hatású. Az egyik az alkaloid típusú cilindrospermopszin (CYN), amelyet főként az *Aphanizomenon* és *Cylindrospermopsis* genuszba tartozó törzsek termelnek, a másik a heptapeptid típusú mikrocisztinek (MCY) családja, amelyeket a *Microcystis spp.* termel (Sivonen és Jones 1999). Gerinces állatokban mindkét toxin elsősorban májkárosító hatású, és számos esetben okozott emberi megbetegedéseket is (Jochimsen és mtsai, 1998, Humpage és Falconer, 2003). A CYN és MCY-ek növényekre gyakorolt toxikus hatásáról is több szerző értekezik (pl. M-Hamvas és mtsai, 2003, Máthé és mtsai 2007, 2009, Vasas és mtsai. 2002, Pflugmacher 2004; Kinnear és mtsai, 2008), de kevésbé ismertek a toxikus hatás hátterében álló sejtszintű folyamatok. A vízi ökoszisztémákat igen súlyosan érintheti, ha az uralkodó növényzet károsodik, vagy elpusztul. Az európai nádasok az utóbbi évtizedekben egy lassú pusztulási folyamaton mennek keresztül, amely hátterében számos tényező mellett a cianobakteriális toxinok is szerepet játszhatnak (Ostendorp, 1989; Yamasaki és mtsai, 1993). Kutatócsoportunk korábban bizonyította, hogy a mikrocisztin-LR (MCY-LR) toxikus hatású a *Phragmites australis* növényekre (Máthé és mtsai, 2007).

A MCY-ek citotoxikus hatásairól állati sejtekben számos adat áll rendelkezésre, az 1 és 2A típusú protein foszfatázok gátlószereiként a foszforilációval szabályozott folyamatokkal interferál, így elsősorban a citoszkeleton szerveződését, ezen kívül a sejtek növekedését, és a programozott sejthalált befolyásolja (Toivola és Eriksson, 1999; Lankoff és mtsai, 2003). A CYN gátolja a fehérjeszintézist az állatokban és a növényekben egyaránt (Froscio és mtsai, 2001), továbbá állati sejtekben bizonyított a DNS károsító hatása (Humpage és mtsai, 2000). Állati sejtekben a mikrotubulusok és a mikrofilamentumok dezorganizációját indukálja (Gácsi és mtsai, 2009). A CYN a vörösvértestekben jellegzetes morfológiai elváltozást okoz (Sukénik és mtsai, 2006). A fentiekből kitűnik, hogy a két ismert és kutatott cianobakteriális toxin, a CYN és a MCY sejtszintű hatásai viszonylag ismertek az állati sejtekben, mindkét cianotoxin hatást gyakorol a citoszkeletális elemekre és a kromatin szerkezetére. A növényi sejtekkel kapcsolatosan azonban, mindezidáig kevés az irodalmi adat (a CYN esetében, egyáltalán nincs tudomásunk a toxin által a növényi sejtben okozott elváltozásokról). Ennek megfelelően, a célkitűzéseinket az alábbiakban fogalmazzuk meg.

1.2. Célkitűzések

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

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

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

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

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

1.3. Anyag és módszer

A CYN-t Vasas és mtsai (2002) módszere alapján tisztítottuk az *Aphanizomenon ovalisporum* ILC-164 jelű törzséből. A cianobaktérium fonalakat összegyűjtöttük, majd feltártuk, és extraháltuk. Az extraktumot méretkizárásos kromatográfia (Toyopearl HSW 40, Tosoh) segítségével tisztítottuk, a végleges tisztítást szemipreparatív HPLC oszlopon végeztük. (Supercosyl TM HPLC-18 column, Supelco). A preparátum tisztaságát HPLC és kapilláris elektroforézis módszerekkel ellenőriztük, Vasas és mtsai (2002a, 2004) módszere szerint.

A MCY-LR-t a *Microcystis aeruginosa* BGSD 243 jelű cianobaktérium törzs tenyészetéből tisztítottuk Kós és mtsai (1995) módosított módszere alapján. A sejtek extrakciója után a toxint DE-52 ioncserélő oszlopon tisztítottuk, majd a végső tisztítást Waters Sep-Pak® töltetek segítségével végeztük. A kivonat tisztaságát HPLC és kapilláris elektroforézis segítségével ellenőriztük Vasas és mtsai (2004) módszere alapján.

A kísérletekben felhasznált kalluszból regenerált axenikus „mini” nádnövényeket a Máthé és munkatársai (2000) által kidolgozott módszer alapján hoztuk létre. A toxinkezeléseket Máthé és mtsai (2007; 2009) által leírt módszer szerint végeztük. A cilindrospERMopszin kezelések 10 napig tartottak 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -től 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ -ig terjedő cianotoxin koncentráció tartományban. A MCY-LR kezelések időtartama 2-20 napig terjedt, az alkalmazott MCY-LR koncentrációk a 0,1 - 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (0,1-40,2 μM) közé estek. A tengelyszervek hosszát lemértük és az újonnan képződő gyökereket megszámoltuk.

A szövettani és a kromatin szerkezet, a mikrotubuláris citoszkeleton és az apoptózis vizsgálatához a formaldehiddel fixált gyökereket, szövETFagyasztó folyadékba (TBS) ágyasztuk be, majd CO₂ segítségével lefagyasztottuk és, Leica Jung Histoslide mikrotómmal 10-20 μm hossz- illetve keresztmetszeteket készítettünk belőlük. A kromatin megjelenítését DAPI festéssel végeztük, a mikrotubuláris rendszert pedig immunhisztokémiai úton Cy3 konjugált anti β -tubulin (Sigma-Aldrich) segítségével tettük láthatóvá Máthé és mtsai (2009) módszere szerint. Az apoptózist TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) módszer segítségével végeztük, amelyet a Roche-tól szereztünk be, a gyártó leírása alapján. A mikroszkópos vizsgálatokhoz Zeiss LSM 510 konfokális lézer pásztázó mikroszkópot, 543 nm (Cy3) és 351/364 nm (DAPI) gerjesztő lézerrel, illetve Olympus Provis

AX-70/A hagyományos fluoreszcens mikroszkópot használtunk, 540–580 nm és 320–360 nm gerjesztő filterekkel. A szövettani vizsgálatokhoz és a TUNEL pozitivitás láthatóvá tételéhez Olympus Provis AX-70/A mikroszkópot használtunk világos látóterű beállítással. Megszámoltuk az aberráns mitotikus sejteket, a mitotikus indexeket, illetve az apoptotikus sejteket tartalmazó gyökereket, és megfigyeltük a kortikális mikrotubulusokat (CMT-t) érintő elváltozásokat. Az immunoblot analízishez a növényekből teljes protein kivonatot készítettünk Hurkmann és Tanaka (1986) módszere alapján. A fehérjekivonatokat SDS-PAGE gélelektroforézis segítségével szétválasztottuk (Laemmli, 1970), majd a proteineket Biorad elektroblot berendezéssel nitrocellulóz membránra (Millipore) vittük át. A β -tubulin elleni elsődleges ellenanyagot (nyúlban készült poliklonális anti- β -tubulin, Abcam) 2000-szeres hígításban alkalmaztuk, a másodlagos ellenanyagot (nyúl IgG elleni alkalikus foszfatáz konjugált ellenanyag, Abcam) 1500-szorosára hígítottuk. Az előhívást NBT-BCPIP (Fluka) segítségével végeztük.

Az adatok kiértékelését, a szórás kiszámítását, és az eredmények grafikus megjelenítést a Sigma Plot 8.0 program segítségével végeztük.

2. Eredményeink és megbeszélésük

Vizsgálataink során a következő eredményekre jutottunk:

a. Kimutattuk, hogy a CYN nagymértékben gátolja a nád gyökerek növekedését, az IC_{50} érték $0,5 \mu g ml^{-1}$ -nek adódott. Azonban a hajtások növekedését a CYN kevésbé befolyásolta, igen magas ($20 \mu g ml^{-1}$) koncentrációban is csak mintegy 20 %-al csökkentette a hajtások növekedését. A CYN a nádnövényekben védekezési reakciót, azaz stresszválaszt váltott ki, melynek részét képezi, hogy az újonnan képződő gyökerek száma CYN hatására megnövekedett. A gyökérszám megnövekedése a növények emelkedett detoxifikáló kapacitását eredményezheti (Kinneer 2008).

b. A CYN kezelt növények gyökereiben nekrotikus foltok képződtek, és az aerenchimák sok helyen eltömődtek, így csökkentve a toxin felvételét (lásd még a szerves savak és a szulfidok hatására bekövetkező szövettani elváltozásokat a nádban, Armstrong és Armstrong, 1999). A nekrotikus sejthalál mellett apoptózisra utaló folyamatokat is detektáltunk a rizodermisszben, a kéregparenchimában és az elágazási zónában. Nem zárhatjuk ki, hogy a CYN hatás következtében az apoptotikus folyamatokat nekrozis követte ugyanazokban a sejtekben: hasonló jelenséget leírtak már növényi sejtekben.

c.1. A CYN a kortikális mikrotubuláris citoszkeleton (CMT) reorientációját okozta a gyökerek elongációs zónájában. A jelenség stresszválaszként értelmezhető, ugyanis az irodalomban számos helyen találkozhatunk a CMT reorientációjával különböző stresszfaktorok hatására (Yuan és mtsai, 1994). Az interfázisos sejtekben a CYN a mikrotubuláris rendszer denzitásának csökkenését okozta, amely némely esetben együtt járt a mikrotubulusok reorientációjával, azonban a leggyakrabban külön jelentkezett, így a két jelenség között nem lehet direkt összefüggést megállapítani. A CMT dezorganizációja a sejtek laterális expanzióját, és ezáltal a gyökércsúcsok megduzzadását okozta.

A CYN a mitotikus apparátusok anomáliáit indukálta az osztódó sejtekben. Jellegzetes CYN hatás volt a dupla, ill. hasadt preprofázisos kötegek (PPB) megjelenése. Ezek a struktúrák nagy valószínűséggel összefüggésbe hozhatóak a cianotoxin fehérjeszintézis gátló hatásaival. Megfigyeltük továbbá a metafázis-anafázis orsók és a fragmoplaszt dezorganizációját a CYN kezelés hatására. Mitotikus rendellenességeket már $1 \mu g ml^{-1}$ CYN hatására megfigyeltünk, míg a CMT dezorganizációja $5 \mu g ml^{-1}$ CYN kezelés következtében jelentkezett. A CMT

denzitásának csökkenése és a mitotikus rendellenességek hátterében a CYN protein szintézist gátló hatása feltételezhető, ugyanis a szakirodalomban számos különböző fehérjeszintézis gátló vegyület az általunk leírtakhoz hasonló elváltozást okozott (Mineyuki és mtsai, 1994; Baluska és mtsai, 1995).

A mikrotubuláris citoszkeleton denzitás csökkenése nem magyarázható a tubulin mennyiségének csökkenésével, ugyanis immunoblot vizsgálataink szerint a β -tubulin mennyisége a CYN hatására növekedett.

c.2. A MCY-LR kezelt növényekben kimutattuk a kortikális mikrotubuláris citoszkeleton dezorganizációját, sok esetben, pedig a CMT teljes eltűnését. Számos sejtben a CMT eltűnése mellett a citoplazma megnövekedett diffúz festődését láttuk, ezek alapján feltételezzük, hogy a MCY-LR a CMT depolimerizációját okozta. A szerin-threonin protein foszfatázokat gátló calyculin-A, cantharidin és okadainsav hatására Baskin és Wilson (1997) hasonló jelenségeket figyelt meg. Megfigyeléseink szerint a MCY-LR hatására az osztódó sejtekben számos, a citoszkeletonot érintő elváltozás jelent meg. A mitotikus orsó szerkezete megváltozott, sok sejtben hézagossá vált, gyakran jelentek meg tripoláris orsók. Sok sejtben megfigyeltük a fragmoplaszt szétesését. A MCY-LR a CYN-nel ellentétben nem okozott rendellenességeket a preprofázisos kötegben. Ismert, hogy a MAP-ok foszforilációs szintjének növelése csökkenti a mikrotubulusok stabilitását (Wright és Smiths 2007). A MCY-LR mikrotubuláris citoszkeletonra gyakorolt hatásainak hátterében az 1 és 2A típusú protein foszfatázok gátlása állhat.

d.1. A CYN a sejtciklus folyamatával is interferált, az összes mitózisok száma CYN kezelés hatására enyhén megnövekedett. Az egyes stádiumokat külön vizsgálva előtűnt, hogy a CYN hatására a profázisban lévő sejtek száma növekedett, míg a metafázisos és anafázisos sejtek aránya csökkent. A sejtciklusra gyakorolt hatást a CYN fehérjeszintézist gátló hatása magyarázhatja. Ugyanis irodalmi adatok szerint más fehérjeszintézist gátló vegyületek az általunk leírtakhoz hasonló jelenségeket idézték elő (De la Torre és mtsai, 1989, Olszewska, és mtsai, 1990; Nogami és mtsai, 1996).

d.2. A MCY-LR a más protein foszfatáz inhibitorok esetén állati rendszerekben már megfigyelt dualisztikus választ (Lankoff és mtsai, 2003) váltotta ki a nád gyökerekben. Hosszútávú toxinkezelések esetében, alacsony koncentrációban ($0,1-5 \mu\text{g ml}^{-1}$) a sejtosztódás mértékének növekedését okozta, míg magas koncentrációban ($5-40 \mu\text{g ml}^{-1}$) alkalmazva gátolta azt. A MCY-LR megnövelte a mitotikus sejtek tartózkodási idejét a profázisban és a telofázisban. Hasonló jelenségeket figyeltek meg az ugyancsak a szerin-threonin foszfatázokat gátló endothall és okadainsav hatására (Zhang és mtsai, 1992, Ayaydin és mtsai, 2000). A MCY-LR mikrotubuláris citoszkeletonra és a sejtciklusra gyakorolt hatásainak hátterében az 1 és 2A típusú protein foszfatázok gátlása áll, a toxin nagy valószínűséggel a MAP kináz kaskádokkal illetve a ciklin dependens kinázok hatásaival interferál, megnövelve a mikrotubulus asszociált proteinek foszforiláltsági állapotát (lásd: Sasabe és Machida, 2007).

e. A CYN és a MCY-LR egyaránt apoptotikus folyamatokat indukált. A CYN számottevően nagyobb mértékben növelte az apoptotikus sejtek számát, mint a MCY-LR. A CYN már $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koncentrációban növelte az apoptotikus TUNEL pozitív sejtek számát, míg MCY-LR esetén csak $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ feletti koncentrációnál jelentkeztek szórványosan apoptotikus tünetek. A CYN-ból a sejt méregtelenítésében résztvevő enzimek hatására képződő toxikus metabolitok képesek a DNS-t károsítani, ezáltal apoptózist kiváltani, a jelenséget állati sejtekben figyelték meg (Shaw és mtsai, 2000). A MCY-LR apoptogén hatásai, Bouaicha és Maatouk (2004) eredményeit figyelembe véve, feltehetőleg nem közvetlenül a protein foszfatáz gátlása miatt, hanem a MCY-LR szabadgyököt generáló képessége miatt jelentkeztek.

A jelen kísérleteinkben tapasztaltak egyértelműen alátámasztják azt, hogy a két cianotoxin, a CYN és a MCY-LR citotoxikus hatású a szövettenyésztés útján előállított axenikus nádnövények sejteire az ökológiai szempontból releváns koncentráció tartományokban.

3. English summary

3.1. Introduction

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

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

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

3.2. Goals of the study

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

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

3.3. Materials and methods

Cylindrospermopsin (CYN, MW: 415 Da) was purified from the cultures of *Aphanizomenon ovalisporum* (Forti) strain ILC-164 isolated from Lake Kinneret, Israel in 1994 (Banker et al., 1997). The purification method was described previously by Vasas et al. (2002, 2004). Briefly, cyanobacterial filaments were collected and extracted, the extract was loaded onto Toyopearl HW-40 (Tosoh, Tokyo, Japan) size exclusion column and further purified by semi preparative HPLC (Supercosyl TM SPLC-18 column, Supelco).

MCY-LR was purified from *Microcystis aeruginosa* BGSD243 isolated from Lake Velencei, Hungary, essentially by the method of Kós et al. (1995) with slight modifications. Briefly, after cell extraction, we performed ion-exchange chromatography on DEAE cellulose (DE-52, Whatman) followed by desalting with Waters Sep-Pak® cartridges according to Kós et al. (1995). The purity of MCY-LR used in this study was of NMR grade and checked by HPLC and capillary electrophoresis methods as described by Vasas et al. (2004).

Common reed (*P. australis*/Cav./Trin. Ex Steud.) plantlets were produced from stem node derived embryogenic calli as previously described (Máthé et al., 2000). MCY-LR treatments of reed plantlets were performed as described for histological investigations (Máthé et al., 2007). In case of CYN the conditions were the same, with toxin concentrations ranging from 0,5 to 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The length of axial organs was measured, and the number of newly formed roots was counted.

For histological analyses, chromatin staining, microtubule immunohistochemistry and TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) assay, sections were made from formaldehyde (4 %) fixed roots embedded in tissue freezing media (TBS), and subjected to cryosectioning using Leica Yung Histoslide 2000 microtome according to Máthé et al. (2009). The visualisation of chromatin and microtubular cytoskeleton was carried out as described by Máthé et al. (2009), for chromatin staining we used DAPI (4,6,-diamidino-2-phenylindole, Fluka), for immunostaining of microtubular system we used Cy3 conjugated monoclonal anti- β -tubulin antibody. TUNEL assay was carried out by the method described by the provider (Roche). Visualization of MTs and chromatin was carried out using a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope and an Olympus Provis AX-70/A fluorescence microscope. The excitation wavelengths used in confocal microscopy were 543 nm (Cy3) and 351/364 nm (DAPI), for conventional fluorescence microscopy 540–580 nm and 320–360 nm excitation filters were used. The organization of cortical microtubules of interphase meristematic cells and differentiated roots cells was analyzed, aberrant mitotic cells and roots with TUNEL positive cells were counted, and mitotic indices were calculated. Autofluorescence of reed tissues was detected with the aid of an Olympus Provis AX-70 microscope, by using 450-480 nm excitation wavelengths.

For Western blot analysis total protein extracts from whole plants were prepared according to Hurkmann and Tanaka (1986). SDS-PAGE gel electrophoresis was carried out (Laemmli, 1970), then proteins were blotted to nitrocellulose membrane (Millipore) using a Biorad electroblot system (Biorad, Heidelberg, Germany). The primary antibody was rabbit polyclonal anti- β -tubulin (Abcam, Cambridge, UK) diluted 2000-fold. The secondary antibody was goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (Abcam) diluted 1500-fold. The development was carried out using NBT-BCPIP (Fluka).

Data was analyzed and standard errors were calculated using Sigma Plot 8.0 software.

3.4. Results and discussion

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

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

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

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

MCY-LR also caused alteration of microtubular cytoskeleton, in concentrations above $0,5 \mu g ml^{-1}$. In many interphase cells CMTs were disorganised or absent, these cells showed increased background fluorescence in the cytoplasm. The best explanation of these effects is that MCY caused the depolymerisation of microtubules. It is known that increased phosphorylation state of tubulins or MAPs leads to reduced stability of microtubules, which is highly important for the mitosis related microtubule reorganisations (Wright és Smith, 2007). The cells with disrupted microtubules could not grow unidirectionally, they were swollen.

This is in accordance with the histological effects previously detected by our laboratory (Máthé et al. 2009).

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

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

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

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

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

4. Irodalomjegyzék

1. **Armstrong J.,** Armstrong W., 1999. Phragmites die-back: toxic effects of propionic, butyric and caproic acids in relation of pH. *New Phytologist*: 142, 201–217.
2. **Ayaydin, F.,** Vissi, E., Mészáros, T., Miskolczi, P., Kovács, I., Fehér, A., Dombrádi, V., Erdődi, F., Gergely, P., Dudits, D., 2000. Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *Plant Journal*. 23, 85-96.
3. **Baluska, F.,** Barlow, P.W., Hauskrecht, M., Kubica, S., Parker, J.S., Volkmann, D., 1995. Microtubule arrays in maize root cells. Interplay between the cytoskeleton, nuclear organization and post-mitotic cellular growth patterns. *New Phytologist*. 130, 177–192.
4. **Banker, R.,** Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R., Sukenik, A., 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology*: 33, 613-616.
5. **Baskin, T.I., Wilson, I.E.,** 1997. Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiology*, 113, 413–502.
6. **Bouaicha, N.,** Maatouk, I., 2004. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes, *Toxicology Letters*: 148, 53–63
7. **Carmichael, W.W.,** 1992. Cyanobacterial secondary metabolites the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*: 72, 445–459.
8. **Carmichael, W.W.,** 1994. Toxins of cyanobacteria. *Scientific American*: 270, 78-86
9. **Danon, A., Gallois, P.** 1998. UV-C radiation induces apoptotic-like changes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*: 437: 131-136.
10. **Gácsi, M.,** Antal, O., Vasas, G., Máthé, C., Borbély, G., Saker, M.L., Győri, J., Farkas, A., Vehovszky, Á., Bánfalvi, G., 2009. Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicology in vitro*: 23, 710-718.
11. **Humpage, A.R.,** Falconer, I.R., 2003. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss Albino Mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology* 18, 94–103.
12. **Humpage, A.R.,** Fenech, M., Thomas, P., Falconer, I.R. 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*: 472, 155-161.
13. **Hurkman, W.J.,** Tanaka, C.K., 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*: 81, 802–806.
14. **Jochimsen E. M.,** Carmichael W.W., An J., Cardo D.M., Cookson S.T., Holmes C., De C., Antunes B., De Melo Filho D., Lyra T.M., Barreto V.S.T., Azevedo S.M.F.O., Jarvis W.R. 1998 Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *New England Journal of Medicine*: 338, 873–878.
15. **Kinnear, S.H.W.,** Fabbro, L., Duivenvoorden, L.J., 2008. Variable growth responses of water thyme (*Hydrilla verticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Arch. Environ. Contam. Toxcol*. 54, 187–194.
16. **Kós, P.,** Gorzó, G., Surányi, G., Borbély, G., 1995. Simple and efficient method for isolation and measurement of cyanobacterial hepatotoxins by plant tests (*Sinapis alba* L.). *Analytical Biochemistry*: 225, 49–53.
17. **Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*: 227, 680–685.
18. **Lankoff, A.,** Banasik, A., Obe, G., Deperas, M., Kuzminski, K., Tarczynska, M., Jurczak, T., Wojcik, A., 2003. Effect of microcystin-LR and cyanobacterial extract from Polish

reservoir of drinking water on cell cycle progression, mitotic spindle, and apoptosis in CHO-K1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 204–213.

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

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

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

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

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

24. Nogami, A., Suzaki, T., Shigenaka, Y., Nagahama, Y., Mineyuki, Y., 1999. Effects of cycloheximide on preprophase bands and prophase spindles in onion (*Allium cepa* L.) root tip cells. *Protoplasma*: 192, 109–121.

25. Olszewska, M.J., Marciniak, K., Kuran, H., 1990. The timing of synthesis of proteins required for mitotic spindle and phragmoplast in partially synchronized root meristems of *Vicia faba* L. *European Journal of Cell Biology*: 53, 89–92.

26. Olszewska, M.J., Marciniak, K., Kuran, H., 1990. The timing of synthesis of proteins required for mitotic spindle and phragmoplast in partially synchronized root meristems of *Vicia faba* L. *European Journal of Cell Biology*: 53, 89–92.

27. Ostendorp, W., 1989. „Die-back” of reeds in Europe - a critical review of literature. *Aquatic Botany*: 35, 5–26.

28. Pflugmacher, S., 2004. Promotion of oxidative stress in the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* during biotransformation of the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Aquatic Toxicology*: 70, 169–178.

29. Sasabe, M., Machida, Y., 2007 MAP Kinase Signalling During M Phase Progression. In Verma, D.P.S., Hong, Z.,: *Cell Division control in plants*. *Plant Cell Monographs*: 9, 233–250.

30. Shaw, G.R., Seawright, A.A., Moore, M.R., Lam, P.K.S., 2000. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: evaluation of its toxicologic activity. *Therapeutic Drug Monitoring*: 22, 89–92.

31. Sivonen, K., Jones, G., 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J, eds. *Toxic cyanobacteria in water*. London-NY: E & FN Spon: 41–111.

32. Sukenik, A., Reisner, M., Carmeli, S., Werman, M., 2006. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: Long-term exposure to low doses. *Environmental Toxicology*: 21, 575–582.

33. Toivola, D.M., Eriksson, J.E., 1999. Toxins affecting cell signalling and alteration of cytoskeletal structure *Toxicology in Vitro*: 13, 521–530.

34. De la Torre, C., Gonzalez-Fernandez, A., Gimenez-Martin, G., 1989. Stringency at four regions of the plant cell cycle where proteins regulating its progression are synthesized. *Journal of Cell Science*: 94, 259–265.

35. Vasas, G., Gáspár, A., Surányi, G., Batta, G., Gyémánt, G., M-Hamvas, M., Máthé, C., Grigorszky, I., Molnár, E., Borbély, G., 2002. Capillary electrophoretic assay and purification of

cylindrospermopsin, a cyanobacterial toxin from *Aphanizomenon ovalisporum*, by plant test (blue–green Sinapis test). Analytical Biochemistry: 302, 95–103.

36. **Vasas, G.**, Gáspár, A., Páger, C., Surányi, G., Máthé, C., M-Hamvas, M., Borbély, G., 2004. Analysis of cyanobacterial toxins (anatoxin-a, cylindrospermopsin, microcystin-LR) by capillary electrophoresis. Electrophoresis: 25, 108-115.

37. **Vásquez, R.J.**, Gard, D.L., Cassimeris, L., 1999. Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. Cell Motility and Cytoskeleton: 43, 310–321.

38. **Yin, L.**, Huang, J., Li, W., Liu, Y., 2006. Microcystin-RR-induced apoptosis in tobacco BY-2 cells. Toxicon: 48, 204-210.

39. **Zhang, K.**, Tsukitani, Y., John, P.C.L., 1992. Mitotic arrest in tobacco caused by the phosphoprotein phosphatase inhibitor okadaic acid. Plant and Cell Physiology: 33, 677–68.

Publikációs lista

a. Fontosabb, a témához kapcsolódó nemzetközi publikációk

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

Impact factor: 2,128

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

Impact factor: 5,249

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

Impact factor: 3,124

b. Egyéb közlemények

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

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

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

Impact factor: 1,271

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

Impact factor: 1,697

c. Konferencia előadások és posztterek:

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

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

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

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

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

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