

Załącznik nr 3

dr Anna Barabasz

Wydział Biologii
Uniwersytet Warszawski

Autoreferat

***Transportery transbłonowe cynku i kadmu
- funkcja oraz konsekwencje heterologicznej ekspresji u roślin***

Anna Barabasz

Załącznik nr 3: Autoreferat w języku polskim

AUTOREFERAT

I. Imię i nazwisko:

Anna Barabasz

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

04.10.2005 - nadanie stopnia doktora nauk biologicznych przez Radę Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, specjalność biochemia roślin. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Analiza ekspresji i funkcji 1,3-beta-glukanazy – produktu genu gluB20-2 w roślinach ziemniaka”, promotor pracy – prof. dr hab. Jacek Hennig.

25.09.1998 – tytuł magistra uzyskany na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł pracy magisterskiej: „Konstrukcja szczepu niezdolnego do wycinania intronu z 5'UTR mRNA arginazy *Aspergillus nidulans*”, promotor pracy – prof. dr hab. Piotr Węgleński.

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

a) Zatrudnienie – umowa o pracę

Od 05/2013 – do chwili obecnej: adiunkt w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, , wymiar - ½ etatu

01/2010 – 04/2013: specjalista naukowo-techniczny w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, , wymiar – ½ etatu

02/2005 – 06/2005: biolog w pracowni Patogenezy Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, wymiar – pełen etat

b) Zatrudnienie w ramach umów cywilno-prawnych – praca w projektach badawczych

09/2015 – 09/2018: Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Projekt badawczy nr 2014/15/B/NZ9/02303: „Molekularne podstawy zmian translokacji Zn do pędu pod wpływem Cd”, finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, kierownik projektu prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz, rola w badaniach – główny wykonawca

12/2010 – 06/2014: Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Projekt badawczy MNiSW nr 814/N-COST/2010/0: „Molekularne mechanizmy indukcji akumulacji cynku oraz redukcji kadmu w roślinach - badania na rzecz poprawy składu mineralnego”, finansowany przez MNiSW, kierownik projektu prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz, rola w badaniach – główny wykonawca

02/2006 – 08/2011: Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, 6 Projekt Ramowy Unii Europejskiej PHIME, nr FOOD-CT-2006-016253, kierownik projektu prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz, rola w badaniach – wykonawca, w tym - 09/2008 – 02/2009 – przerwa na urlop macierzyński

c) Dodatkowe informacje o dłuższych przerwach w pracy

11/2002 – 04/2004, 02/2005 – 02/2006 oraz 09/2008-02/2009 urlopy macierzyńskie, przedłużone o urlopy wychowawcze (łącznie 34 miesiące)

IV. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

***Transportery transbłonowe cynku i kadmu
- funkcja oraz konsekwencje heterologicznej ekspresji u roślin***

b) Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego:

1) **Barabasz A.**, Krämer U., Hanikenne M., Rudzka J., Antosiewicz D.M. (2010) Metal accumulation in tobacco expressing *Arabidopsis halleri* metal hyperaccumulation gene depends on external supply. *Journal of Experimental Botany*, 61: 3057-67.

IF₂₀₁₀ - 4,818; IF_{5-letni} - 6,044; punkty MNiSW - 45; liczba cytowań (wg WoS) - 45 (bez autocytowań 34)

Wkład habilitanta – 80% : współautorstwo koncepcji badań, wyprowadzenie roślin transgeniczných, analiza otrzymanych roślin pod względem obecności transgeny, planowanie i samodzielne wykonanie większości doświadczeń (uprawa roślin, zbieranie materiału, dokumentacja fotograficzna, przygotowanie prób oraz analiza stężeń pierwiastków, izolacja RNA, przygotowanie cDNA, badanie poziomu ekspresji), opracowanie wyników, przygotowanie rycin.

2) **Barabasz A.**, Wilkowska A., Ruszczyńska A., Bulska E., Hanikenne M., Czarny M., Krämer U., Antosiewicz D.M. (2012) Metal response of transgenic tomato plants expressing P1B-ATPase. *Physiologia Plantarum* 145: 315-331

IF₂₀₁₂ – 3,656; IF_{5-letni} - 2,986; MNiSW - 40; liczba cytowań (wg WoS) – 28 (bez autocytowań 17)

Wkład habilitanta – 75% : współautorstwo koncepcji badań, wyprowadzenie roślin transgeniczných, analiza otrzymanych roślin pod względem obecności transgeny, planowanie i współwykonanie wszystkich doświadczeń (uprawa roślin, zbiór materiału, dokumentacja fotograficzna, przygotowanie prób oraz analiza stężeń pierwiastków z poszczególnych organów oraz z płynu apoplastycznego, izolacja RNA, przygotowanie cDNA, projektowanie starterów i badanie poziomu ekspresji, analiza stężeń barwników fotosyntetycznych, analiza aktywności reduktazy żelazowej), opracowanie wyników, przygotowanie rycin.

3) **Barabasz A.**, Wilkowska A., Tracz K., Ruszczyńska A., Bulska E., Mills R.F., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2013) Expression of *HvHMA2* in tobacco modifies Zn-Fe-Cd homeostasis. *Journal of Plant Physiology* 170: 1176-1186

IF₂₀₁₃ – 2,770; IF_{5-letni} - 3,034; MNiSW₂₀₁₃ - 35; liczba cytowań (wg WoS) – 16 (bez autocytowań 9)

Wkład habilitanta – 40%: współautorstwo koncepcji badań, współdziałanie w wyprowadzeniu roślin transgeniczných i analiza otrzymanych roślin pod względem obecności transgeny, planowanie i współwykonanie większości doświadczeń (uprawa roślin, zbiór materiału, przygotowanie prób oraz analiza stężeń pierwiastków z poszczególnych organów oraz z płynu apoplastycznego), opracowanie wyników, przygotowanie części rycin.

4) **Barabasz A.**, Klimecka M., Kendziorek M., Weremczuk A., Ruszczyńska A., Bulska E., Antosiewicz DM (2016) The ratio of Zn and Cd supply as a determinant of metal-homeostasis gene expression in tobacco and its modulation by overexpressing the metal exporter AtHMA4. *Journal of Experimental Botany* 67: 6201-6214

IF₂₀₁₆ = 5,830; IF_{5-letni} - 6,044; MNiSW₂₀₁₆ - 45; liczba cytowań (wg WoS) – 4 (bez autocytowań 2)

Wkład habilitanta – 80%: współautorstwo koncepcji badań, planowanie oraz samodzielne lub współwykonanie wszystkich doświadczeń (wykonanie i analiza bibliotek subtrakowanych, uprawa roślin, zbieranie materiału, przygotowanie prób oraz analiza stężeń pierwiastków z poszczególnych organów i ich części oraz z płynu apoplastycznego, izolacja RNA, przygotowanie cDNA, projektowanie starterów i badanie poziomu mRNA), analiza bioinformatyczna, opracowanie wyników, przygotowanie rycin i tabel, przygotowanie części manuskryptu.

5) **Barabasz A.**, Palusińska M., Papierniak A., Kendziorek M., Kozak K., Williams L.E., Antosiewicz DM (2019) Functional analysis of *NtZIP4B* and Zn status-dependent expression pattern of tobacco *ZIP* genes. *Frontiers in Plant Science* 9: 1984

IF₂₀₁₇ = 3,677; IF_{5-letni} - 4,353; MNiSW₂₀₁₇ - 40; liczba cytowań (wg WoS) – 0

Wkład habilitanta – 75%: współautor korespondencyjny, współautorstwo koncepcji badań, planowanie oraz samodzielne lub współwykonanie wszystkich doświadczeń (uzyskanie wszystkich potrzebnych plazmidów, transformacja drożdży, analiza specyficzności transportowej poprzez komplementację mutacji drożdżowych, transformacja roślin, analiza tkankowo-specyficznej aktywności promotora), opracowanie wyników, przygotowanie rycin i tabel, przygotowanie części manuskryptu.

Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism, w których ukazały się publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Zgodnie z rokiem opublikowania - 21,114
Zgodnie z aktualnym pięcioletnim IF - 22,461

Liczba punktów MNiSW za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

Zgodnie z rokiem opublikowania - 187
Zgodnie z ostatnią dostępną listą - 205

Liczba cytowań publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego do dnia złożenia wniosku (wg bazy Web of Science) – 93 (bez autocytowań – 62)

c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Skróty i pojęcia używane w opisie:

Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Mo, Cd, Pb - w opisie przyjęto, że symbole poszczególnych pierwiastków wskazują na metal, a nie na jego formę chemiczną

TR – rośliny transgeniczne

TD – rośliny typu dzikiego

TF – współczynnik translokacji (ang. Translocation Factor), wielkość będąca ilorzem stężenia metalu w pędzie do stężenia metalu w korzeniu, im współczynnik ten jest większy, tym większa część pobranego metalu została przetransportowana do części nadziemnych

Deficytowe stężenie Zn w pożywce – stężenie Zn w pożywce wynikające jedynie z obecności śladowych ilości Zn w wodzie oraz w odczynnikach, sole Zn nie są dodawane jako oddzielne składniki

Wstęp

Żelazo (Fe), cynk (Zn), mangan (Mn), miedź (Cu), nikiel (Ni) oraz molibden (Mo) to metale ciężkie zaliczane do mikroelementów, niezbędne dla prawidłowego wzrostu roślin. Pobierane są z roztworu glebowego w formie jonowej lub w połączeniu ze związkami chelatującymi, które mogą być wydzielane przez korzenie. Absorpcja metali przez korzenie zachodzi poprzez pobieranie bierne

i czynne. W obszar apoplastu metale dostają się w sposób bierny wraz z masowym przepływem wody. Pasmka Caspary'ego obecne w komórkach endodermi (oraz warstwie egzodermi w starszych częściach korzeni) blokując radialny apoplastyczny transport wody w kierunku walca osiowego powodują zablokowanie dalszego przenoszenia metali drogą apoplastyczną. Wnikanie metali do komórek epidermy z roztworu glebowego oraz do komórek kory pierwotnej z apoplastu zachodzi w drodze transportu aktywnego z udziałem transbłonowych białek transportowych. Mogą również być pobierane na drodze endocytozy w formie kompleksu metal-pektyny (Krzyszowska, 2011). Metale, które zostały przetransportowane do wnętrza komórek przenoszone są drogą symplastyczną (poprzez plazmodesmy sąsiadujących komórek) w kierunku komórek walca osiowego, tj. okolicy, a następnie miękiszu otaczającego ksylem. Załadunek metali w walcu osiowym do ksylemu odbywa się w wyniku ich aktywnego transportu do apoplastu i dyfuzji do wnętrza martwych naczyń. Metale obecne w soku ksylemowym są transportowane wraz z prądem wody do pędów.

Wymagania co do ilości metali w różnych organellach znacznie się różnią. Kontrola procesów pobierania, buforowania, translokacji oraz przechowywania jest konieczna aby utrzymać stężenie niezbędnych metali w tkankach i organellach w fizjologicznych granicach. Jednak specyficzność transporterów nie jest absolutna, dlatego w warunkach niskiego stężenia w podłożu lub ograniczonej biodostępności niezbędnego metalu zachodzi zwiększone pobieranie innego, o odpowiednio wysokiej biodostępności. Analogicznie zbyt wysokie stężenie w podłożu jednego metalu może powodować zahamowanie pobierania innego. Brak specyficzności w systemie pobierania oraz dystrybucji ograniczonej tylko do jednego metalu prowadzi również do akumulacji metali zbędnych, m.in. kadmu (Cd) czy ołowiu (Pb). Wspomniane metale to jedne z najbardziej powszechnych metali balastowych, toksycznych dla organizmów.

Mechanizmy kontrolujące stężenie jonów metali w poszczególnych przestrzeniach komórkowych opierają się nie tylko na białkach błonowych transportujących metale „do” oraz „z” kompartmentów komórkowych, ale również na cząsteczkach wiążących jony metali. Są to białka takie jak ferrytyna, metalotieniiny czy białka opiekuńcze, wolne aminokwasy (głównie histydyna, ale także cysteina, asparagina, glutamina oraz kwas glutaminowy), niebiałkowe peptydy (nikotianamina, glutation czy fitochelatyny) oraz reszty kwasów organicznych (cytrynian, jabłczan, malonian, szczawian). Za główne miejsce „składowania” nadmiaru jonów metali uważane są wakuole oraz ściany komórkowe. W wakuolach jony metali są kompleksowane przez fitochelatyny, glutation czy niktianaminę. Tworzą też sole z resztami kwasów organicznych. Ponieważ w organizmach metale występują w różnej formie chemicznej, *przyjęłam, iż użyte symbole wskazują na metal, a nie na jego formę chemiczną.*

Poznanie genów związanych z pobieraniem i dystrybucją metali ciężkich zrodziło nadzieję, że na drodze inżynierii genetycznej będzie możliwe uzyskanie roślin transgenicznych (TR) charakteryzujących się zwiększoną akumulacją metali ciężkich w częściach nadziemnych, przydatnych dla celów fitoremediacji (oczyszczanie terenów skażonych metalami przy użyciu roślin) oraz biofortyfikacji (zwiększenia stężenia metali korzystnych dla zdrowia ludzi w jadalnych częściach roślin oraz ograniczenia pobierania metali szkodliwych). Badania w ramach mojej pracy doktorskiej prowadziłam na roślinach genetycznie modyfikowanych, począwszy od konstrukcji plazmidów niezbędnych do transformacji, poprzez procedurę transformacji, a skończywszy na charakterystyce otrzymanych roślin. Umiejętności oraz wiedza nabyta podczas studiów doktoranckich spowodowały, iż w 2006 roku zostałam członkiem grupy badawczej dr hab. Danuty Marii Antosiewicz realizującej projekt „Public health impact of long-term, low level mixed element exposure in susceptible population strata”, akronim PHIME, który był finansowany w ramach 6 Programu Ramowego UE. Celem projektu było uzyskanie, a następnie charakterystyka transgenicznych roślin tytoniu i pomidora o zwiększonej akumulacji Zn i Cd w nadziemnych częściach roślin.

Po zakończeniu projektu PHIME kontynuowałam pracę w grupie prof. dr hab. Danuty Marii Antosiewicz, będąc głównym wykonawcą części projektu COST: „Molekularne mechanizmy indukcji akumulacji cynku oraz redukcji kadmu w roślinach - badania na rzecz poprawy składu mineralnego”. Badania koncentrowały się na poszukiwaniu molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za modyfikację akumulacji Cd w pędach roślin TR w odpowiedzi na różną kombinację stężeń Zn i Cd. Analizie podlegały rośliny TR wyrażające białko eksportujące Zn i Cd do apoplastu.

W wyniku przeprowadzonych analiz zaobserwowałam m.in., że w tytoniu, w obecności Cd dochodzi do bardziej efektywnej translokacji Zn do pędów. Zjawisko to zachodzi jedynie przy niskim stężeniu Zn w podłożu. Nie jest ono opisane w literaturze i na obecnym etapie wydaje się być specyficzne gatunkowo. Aby poznać jego molekularne podstawy prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz uzyskała finansowanie projektu OPUS, pt. „Molekularne podstawy zmian translokacji Zn do pędu pod wpływem Cd”, którego jestem głównym wykonawcą.

Rezultaty badań opisanych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Pierwsze trzy prace wschodzące w skład osiągnięcia naukowego (**Barabasz i wsp., 2010, 2012, 2013, pub. 1, 2, 3 osiągnięcia**) przedstawiają otrzymanie i charakterystykę roślin transgenicznych wyrażających geny *HMA*. Geny *HMA4* i *HMA2* (**Heavy Metal ATPase**) są jednymi z nielicznych poznanych do tej pory genów zaangażowanych w długodystansowy transport metali ciężkich z korzeni do pędów. Geny *AtHMA4* z *Arabidopsis thaliana* i *AhHMA4* z *Arabidopsis halleri* ulegają ekspresji głównie w komórkach walca osiowego korzeni oraz na obszarze wiązek przewodzących, a białko przez nie kodowane lokalizuje się w plazmolemie (Mills i wsp., 2003, 2005; Verret i wsp., 2004, Hanikenne i wsp., 2008). Aktywność transportowa białek *HMA2* i *HMA4* prowadzi do załadunku Zn i Cd do ksylemu, co w efekcie prowadzi do translokacji metali do pędów. Mutant *hma4 A.thaliana*, podwójny mutant *hma2hma4 A.thaliana* oraz rośliny *A. halleri* z wyciszonymi za pomocą RNAi trzema genami *AhHMA4* charakteryzują się obniżonym transportem Zn i Cd z korzeni do części nadziemnych (Hussain i wsp., 2004, Verret i wsp., 2004, Hanikenne i wsp., 2008). **Wybierając geny *HvHMA2* z *Hordeum vulgare* i *AhHMA4* z *A. halleri* do heterologicznej ekspresji w roślinach tytoniu i pomidora oczekiwano, iż aktywność kodowanych przez nie białek usprawni translokację Zn i Cd z korzeni do pędów, przez co stężenie obu metali w częściach nadziemnych roślin TR będzie wyższe niż w roślinach TD niezależnie od warunków uprawy.** Głównym celem badań nad transgenicznymi roślinami tytoniu z ekspresją genów *HvHMA2* oraz *AhHMA4* było sprawdzenie, czy rośliny te akumulują w pędach większe ilości Zn oraz Cd niż rośliny TD, a przez co mogłyby być używane do fitoremediacji obszarów skażonych w różnym stopniu Zn i Cd. Z kolei otrzymanie i charakterystyka transgenicznych roślin pomidora wyrażających gen *AhHMA4* miało wskazać, czy można uzyskać rośliny charakteryzujące się zawsze wyższym stężeniem Zn w owocach w porównaniu do roślin TD. Ponieważ białko *AhHMA4* transportuje także Cd, istniała obawa, że rośliny transgeniczne z ekspresją *AhHMA4* mogą charakteryzować się sprawniejszym transportem Cd do części nadziemnych. Badania przeprowadzone przez Weremczuk (2016, praca będąca częścią dorobku opisana w rozdziale V autoreferatu) wykazały jednak, że proces ten nie ma miejsca.

W pierwszej pracy osiągnięcia naukowego (**Barabasz i wsp., 2010, pub. 1 osiągnięcia**) przedstawiono wyniki badań nad otrzymaniem i charakterystyką roślin tytoniu z ekspresją *AhHMA4_p::AhHMA4*. Użycie własnego promotora genu *AhHMA4*, którego aktywność w roślinach *A. halleri* jest znacznie wyższa niż promotora *CaMV 35S* (Hannikene i wsp., 2008) rodziło nadzieje, iż transport Zn i Cd do pędów będzie bardziej efektywny. Rośliny TR oraz TD były uprawiane na pożywkach hydroponicznych zawierających Zn w różnym stężeniu – od deficytowego po toksyczne.

W roślinach TR uprawianych w deficycie Zn doszło do zwiększonej akumulacji Zn w porównaniu do roślin TD, ale tylko w młodych liściach. Natomiast w przypadku roślin uprawianych w obecności optymalnego stężenia Zn akumulacja Zn w pędach roślin TR była niższa niż w TD. Dla pozostałych wariantów uprawy nie zaobserwowano różnic w stężeniu Zn w pędach pomiędzy roślinami TR a TD.

Otrzymane rośliny uprawiano również w obecności Cd o dwóch różnych stężeniach: niskiego (nie dającego objawów toksyczności) oraz toksycznego. Dla obydwu wariantów uprawy nie zanotowano wyższego stężenia Cd w pędach roślin TR w porównaniu do roślin TD. Rośliny TR charakteryzowały się natomiast obniżonym stężeniem Cd w korzeniach w porównaniu do roślin TD. Wielkość różnic pomiędzy roślinami TR a TD zależała od zastosowanego stężenia Cd.

Parametrem opisującym efektywność transportu danego pierwiastka z korzeni do pędów jest współczynnik translokacji (TF, Translocation Factor), wyrażony wzorem $TF = \frac{[\text{stężenie w pędzie}]}{[\text{stężenie w korzeniach}]}$. W przypadku roślin uprawianych w obecności Cd, wartość TF dla Cd była wyższa dla roślin TR. Wartość ta nie wynikała jednak z wyższego stężenia Cd w pędach, lecz z niższego stężenia Cd w korzeniach roślin TR.

Ekspresja *AhHMA4_p::AhHMA4* spowodowała, że rośliny TR były bardziej wrażliwe na toksyczne stężenie Zn i Cd niż TD pomimo porównywalnych stężeń Zn i Cd w pędach. Prawdopodobnie obserwowane symptomy były skutkiem zaburzonej kompartmentacji Zn oraz Cd pomiędzy symplastem a apoplastem. Potwierdzenie lub obalenie tej hipotezy było przedmiotem dalszych badań.

Ponieważ poziom akumulacji Zn i Cd w pędach roślin TR mógł być skutkiem innej regulacji aktywności promotora *AhHMA4_p* w roślinach tytoniu niż w roślinach *A.halleri* oraz mógł zależeć od stężenia Zn i Cd w pożywce wykonano analizę ekspresji genu *AhHMA4* w transgenicznym tytoniu. Nie zaobserwowano jednak znaczących różnic w ekspresji genu *AhHMA4* zarówno w pędach jak i w korzeniach pomiędzy roślinami TR rosnącymi na pożywkach o różnych stężeniach Zn oraz Cd. Jedyną różnicą jaką zanotowano dotyczyła sytuacji, kiedy rośliny TR po uprawie przez 1 tydzień w warunkach deficytu Zn zostały przeniesione do pożywki zawierającej podwyższone stężenie Zn. Po 24 godzinach uprawy w warunkach podwyższonego stężenia Zn poziom mRNA *AhHMA4* był niższy w korzeniach takich roślin niż w korzeniach roślin rosnących nadal w warunkach deficytowych. W liściach poziom mRNA transgenu pozostawał niezmienny. Wyniki te są odmienne od wyników uzyskanych dla roślin natiwnych, gdyż Talke (2006) wykazała niewielkie obniżenie ekspresji w pędach po przeniesieniu roślin w *A.halleri* z warunków deficytowych na 24 h do warunków kontrolnych, przy braku różnic w poziomie mRNA *AhHMA4* w korzeniach. **Uzyskane wyniki wskazują, że: 1) promotor *AhHMA4_p* jest aktywny w odległych filogenetycznie roślinach tytoniu, 2) jest regulowany poziomem Zn, 3) jego regulacja w tytoniu jest odmienna niż w *A.halleri*.**

Różny poziom Zn w pożywce (niski, optymalny, wysoki), jak również obecność Cd, jest przyczyną różnic w ekspresji genów odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy metali w roślinach (Talke i wsp., 2006, van de Mortel i wsp., 2006), co w konsekwencji prowadzi do zmian w akumulacji i dystrybucji metali pomiędzy poszczególnymi organami, tkankami i kompartmentami komórkowymi. Z tego powodu przypuszczano, że zależne od stężenia Zn i Cd w pożywce różnice w akumulacji Zn i Cd pomiędzy w roślinami TR i TD mogły zależeć od: 1) różnego poziomu ekspresji genów gospodarza w odpowiedzi na stężenie Zn/Cd w pożywce, 2) zmian dystrybucji Zn/Cd pomiędzy symplastem a apoplastem na skutek aktywności eksportowej *AhHMA4* w roślinach tytoniu, u których wielkość zmian zależała od stężenia metalu w pożywce. Modyfikacja poziomu ekspresji genów endogennych mogła być odpowiedzią na stężenie Zn w komórkach (co jest konsekwencją stężenia Zn w podłożu) oraz skutkiem ekspresji genu *AhHMA4* (aktywności eksportowej kodowanego białka, prowadzącej do przeładowania apoplastu Zn, zatem do zaburzenia homeostazy metali). W celu weryfikacji hipotezy, iż w roślinach TR dochodzi do zmian w ekspresji genów endogennych, a zmiany te są zależne od stężenia Zn w podłożu, zbadano ekspresję genu *NtIRT1* (Iron Regulated Transporter),

jako jednego z niewielu wówczas poznanych genów tytoniowych zaangażowanych w homeostazę mikroelementów (Yoshihara i wsp., 2006, Hodoshima i wsp., 2007). Białko AtIRT1 jest plazmolemowym transporterem Fe, Zn, Mn jak również Cd i uczestniczy w pobieraniu wspomnianych pierwiastków przez komórki korzenia (Eide i wsp., 1996, Korshunowa i wsp., 1999, Rogers i wsp., 2000). Rośliny TR uprawiane w warunkach deficytu Zn lub zwiększonego, nietoksycznego stężenia Zn charakteryzowały się wyższym poziomem transkryptyu *NtIRT1* w stosunku do roślin TR uprawianych w warunkach optymalnych oraz w porównaniu do roślin TD uprawianych we wszystkich trzech, zastosowanych warunkach. W wyniku tych badań wykazano, iż **ekspresja transgenu indukuje zmiany w ekspresji genu gospodarza regulującego homeostazę Zn, Fe, Mn i Cd w roślinach**, jednak występowanie różnic w poziomie transkryptyu oraz kierunek i wielkość obserwowanych zmian w ekspresji genów pomiędzy roślinami TR a TD będzie zależał od zastosowanych warunków uprawy.

Podsumowanie

- **Ekspresja *AhHMA4_p::AhHMA4* spowodowała wzrost:**
 - stężenia Zn w częściach nadziemnych roślin tytoniu, jednak wzrost ten nie był stabilny, niezależny od warunków uprawy (warunków środowiskowych),
 - translokacji Cd, przy jednoczesnym obniżonym pobieraniu tego pierwiastka
 - ekspresji *NtIRT1* w obecności deficytowego oraz podwyższonego stężenia Zn w podłożu, co wskazuje, że również ekspresja innych genów, kodujących transportery metali mogła ulec zmianie.
- Zmiana ekspresji genów endogennych mogła przyczynić się do zmiany akumulacji, dystrybucji, a także pobierania metali z podłoża.
- Heterologiczna ekspresja genów kodujących transportery metali może prowadzić do generowania zmian w akumulacji i pobieraniu metali, odmiennych od spodziewanych na podstawie znanej funkcji genu użytego do transformacji. Jeżeli funkcja białka kodowanego przez transgen nie jest w pełni poznana, prawidłowa interpretacja uzyskanych wyników z wykorzystaniem roślin, w których gen ten ulega ekspresji, może być utrudniona.
- Regulacja promotora genu *AhHMA4* z *A.halleri* w tytoniu jest odmienna od regulacji w roślinach, z których pochodzi gen.

Konstrukt, wykorzystany do wyprowadzenia opisanych powyżej roślin tytoniu z ekspresją *AhHMA4_p::AhHMA4* został użyty również do transformacji pomidora w celu zwiększenia stężenia Zn w pędach i owocach (Barabasz i wsp., 2012, *pub. 2 osiągnięcia*). Podobnie jak transgeniczne rośliny tytoniu, transgeniczne rośliny pomidora uprawiano w pożywkach płynnych w obecności różnych stężeń Zn, od deficytowego po toksyczne. Warto zaznaczyć, że zastosowane w tych badaniach stężenia toksyczne dla pomidora, u tytoniu nie wywołują objawów toksyczności, co świadczy o różnicach w gospodarce mineralnej pomiędzy tymi dwoma gatunkami.

Ekspresja *AhHMA4_p::AhHMA4* w pomidorze spowodowała wzrost stężenia Zn w liściach roślin uprawianych w obecności niedeficytowych stężeń Zn. Ekspresja transgenu nie spowodowała natomiast różnic w stężeniu Zn pomiędzy roślinami TR a TD uprawianymi w deficycie Zn. Okazało się także, że w roślinach TR pobieranie Zn było zwiększone w porównaniu do roślin TD uprawianych w obecności jednego z toksycznych stężeń Zn. Wskazuje to na indukcję endogennych mechanizmów odpowiedzialnych za pobieranie Zn z pożywki.

Rośliny pomidora wyrażające gen *AhHMA4_p::AhHMA4* były, podobnie do tytoniu z ekspresją *AhHMA4_p::AhHMA4*, bardziej wrażliwe na nadmiar Zn. Objawom toksyczności (niższa biomasa,

chlorozy oraz nekrozy na liściach) towarzyszyła zmiana akumulacji (niższe stężenie) i dystrybucji (mniej efektywna translokacja) Fe.

Białko HMA4 eksportuje Zn poza komórkę, zatem jego ekspresja w pomidorze może prowadzić do przeładowania apoplastu tym metalem, zaburzając homeostazę metali. Aby to sprawdzić, zbadano stężenie Zn w płynie apoplastycznym. Analizy potwierdziły to przypuszczenie. Stężenie Zn w apoplaście roślin TR było 2-3-krotnie (uprawa w optymalnym stężeniu Zn) lub 10-15-krotnie wyższe (uprawa w toksycznym stężeniu Zn) niż w apoplaście roślin TD uprawianych w tych samych warunkach. Nie zaobserwowano natomiast znaczących różnic w stężeniu Fe.

Obserwowane w roślinach TR modyfikacje w gospodarce mineralnej, takie jak zmiana akumulacji i dystrybucji Fe oraz zwiększone pobieranie Zn w określonych warunkach uprawy wskazywały, iż w roślinach TR mogło dojść do indukcji/represji ekspresji genów endogennych na skutek zaburzonej dystrybucji Zn symplast/apoplast oraz zaburzonych proporcji Zn/Fe w apoplaście, będących wynikiem aktywności białka AhHMA4. Z powodu obserwowanych zmian w akumulacji i dystrybucji Zn/Fe zbadano ekspresję wybranych genów zaangażowanych w regulację homeostazy Zn i Fe w roślinach TR oraz TD uprawianych w warunkach kontrolnych oraz w obecności toksycznego stężenia Zn. Analizie poddano geny strategii I pobierania Fe, które wykazują zwiększoną ekspresję w warunkach deficytu Fe (Ling i wsp., 2002, Bauer i wsp., 2004, Li i wsp., 2004). Były to: (a) *SIFER* (nazwa od mutanta *fer*), ulegający ekspresji tylko w korzeniach, kodujący czynnik transkrypcyjny kontrolujący ekspresję genów *SIIRT1*, *SIFRO1* oraz *SINRAMP1*; (b) *SIIRT1*, kodujący transporter Fe odpowiedzialny za pobieranie tego pierwiastka przez komórki korzeni; (c) *SIFRO1* kodujący białko zlokalizowane w błonie plazmatycznej wykazujące aktywność reduktazy Fe³⁺. Ekspresja wszystkich wymienionych genów była wyższa w korzeniach roślin TR uprawianych w obecności toksycznego stężenia Zn w porównaniu do roślin TD. Wzrostowi ekspresji genu *SIFRO1* w korzeniach towarzyszył wzrost aktywności reduktazy żelazowej w tych organach. Gen *SIFRO1* wykazywał wyższą ekspresję również w liściach roślin TR w porównaniu do roślin TD. Kolejny gen o wyższej ekspresji w korzeniach roślin TR uprawianych w obecności toksycznego stężenia Zn to *SINRAMP1* (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein), kodujący transporter Fe odpowiedzialny za eksport Fe z wakuoli do cytoplazmy, którego ekspresja jest również zależna od czynnika transkrypcyjnego SIFER. Ekspresja *SIIRT2* i *SINRAMP3* nie jest regulowana czynnikiem transkrypcyjnym FER. Poziom mRNA genu *SINRAMP3* był umiarkowanie podwyższony w korzeniach i liściach roślin TR, natomiast poziom mRNA genu *SIIRT2* nie był zmieniony w roślinach TR. Ostatnim analizowanym genem związanym z regulacją homeostazy Fe, ale również Zn, był *SICHLN* (nazwa pochodzi od mutanta *chloronerve*) kodujący syntazę nikotianaminy. W innych gatunkach geny te są znane pod nazwą NAS (Nicotianamine Synthase). Jego ekspresja w korzeniach roślin TR hodowanych w obecności toksycznego stężenia Zn była wyższa, natomiast w liściach obniżona w stosunku do roślin TD. W analizie ekspresyjnej uwzględniono również jeden z genów związanych z metabolizmem ściany komórkowej - *SIPME* (Pectin Methylesterase), kodujący metylesterazę pektyn. Zaobserwowana zwiększoną ekspresję w liściach roślin TR uprawianych w obecności toksycznego stężenia Zn świadczy o różnicach w metabolizmie ścian komórkowych pomiędzy roślinami TR a TD. Różnice te są najprawdopodobniej pochodną różnic w stężeniu Zn w tym kompartmentcie.

Uzyskane wyniki badań ekspresji genów homeostazy metali w pomidorze TR i TD wskazywały, iż w liściach transgenicznych roślin pomidora uprawianych w obecności toksycznego stężenia Zn został wygenerowany sygnał przekazujący informację o deficycie Fe, który spowodował wzrost ekspresji genów zaangażowanych w pobieranie Fe (tj. *SIFRO1* i *SIIRT1*) oraz w uwalnianie Fe z wakuoli komórek korzenia (*SINRAMP1*).

Podsumowanie

- Ekspresja genu *AhHMA4_p::AhHMA4* w pomidorze doprowadziła do wyższej akumulacji Zn w pędach (efekt oczekiwany), ale tylko przy odpowiednio wysokim stężeniu Zn w pożywce.
- Transformaty uprawiane w obecności podwyższonego stężenia Zn pobrały większe ilości Zn niż rośliny TD, pomimo iż białko HMA4 nie jest zaangażowane w pobieranie Zn z podłoża. Na skutek ekspresji *AhHMA4* uległy indukcji endogenne systemy pobierania metali w roślinie użytej do transformacji, jednak tylko wówczas, gdy była uprawiana w określonych warunkach.
- W obecności toksycznego stężenia Zn, w roślinach wyrażających gen *AhHMA4_p::AhHMA4* doszło do zahamowania pobierania oraz transportu Fe do pędów, pierwiastka, który nie jest transportowany przez białko HMA4. Otrzymane wyniki wskazują, iż w następstwie heterologicznej ekspresji białka zaangażowanego w transport poza komórkę Zn i Cd, może dojść do zmiany pobierania i dystrybucji innych metali. Aspekt zmian w pobieraniu i dystrybucji metali, które nie są transportowane przez białko kodowane przez transgen nie był do tej pory brany pod uwagę przy analizie roślin transgenicznych generowanych w celu modyfikacji gromadzenia metali w tkankach.
- Zmiany w dystrybucji Zn pomiędzy symplastem a apoplastem, jako skutek aktywności białka *AhHMA4* doprowadziły do zaburzenia homeostazy metali, a w konsekwencji do zmian w ekspresji endogennych genów pomidora związanych z jej utrzymaniem i w ostateczności do modyfikacji całego systemu kontrolującego pobieranie i dystrybucję metali w roślinie.

Drugi z genów *HMA* użyty do transformacji roślin to *HvHMA2* z jęczmienia (Mills i wsp., 2012). Wprowadzono go do roślin tytoniu pod kontrolą promotora CaMV 35S (Barabasz i wsp., 2013, *pub. 3 osiągnięcia*). Aby ocenić, czy ekspresja *35S_p::HvHMA2* prowadzi do zwiększenia akumulacji Zn i Cd w pędzie, rośliny uprawiano w obecności trzech stężeń Zn: optymalnego, podwyższonego i toksycznego oraz dwóch stężeń Cd: niskiego (przy którym nie obserwowano objawów toksyczności) oraz toksycznego. Wykazano, że w wyniku ekspresji *35S_p::HvHMA2* doszło do spodziewanego wzrostu akumulacji Zn w pędach, jednak tylko wówczas gdy rośliny rosły w obecności podwyższonego stężenia Zn. Natomiast w warunkach optymalnego oraz toksycznego stężenia Zn w pożywce nie było różnic w akumulacji Zn w pędach pomiędzy roślinami TR a TD. Podobnie jak w roślinach tytoniu i pomidora wyrażających gen *AhHMA4_p::AhHMA4*, również w roślinach tytoniu wyrażających gen *35S_p::HvHMA2* zaobserwowano wzrost wrażliwości na toksyczne stężenie Zn.

Ponieważ ekspresja genu *AhHMA4_p::AhHMA4* w pomidorze spowodowała zmiany w pobieraniu i dystrybucji Fe w roślinach uprawianych w obecności toksycznego stężenia Zn (Barabasz i wsp., 2012, *pub. 2 osiągnięcia*), zbadano stężenie Fe w uzyskanych roślinach tytoniu. Zanotowano wyższe stężenie Fe w korzeniach, a mniejsze w pędach roślin TR uprawianych w obecności toksycznego stężenia Zn w porównaniu do roślin TD uprawianych w tych samych warunkach. Wyniki te świadczyły o zahamowanym transporcie Fe do pędów roślin TR. Dla roślin TR rosnących w warunkach optymalnych nie zaobserwowano zmian w dystrybucji Fe. Pogłębionym objawom toksyczności Zn towarzyszyło również zwiększone stężenie Zn w płynie apoplastycznym.

Tytoń z ekspresją *35S_p::HvHMA2* był również uprawiany w obecności dwóch stężeń Cd, jednak nie stwierdzono zwiększonej akumulacji tego metalu w pędach. W roślinach uprawianych w obecności toksycznego stężenia Cd zmierzono stężenie Zn i Fe. Obecność Cd w podłożu u roślin TD

powoduje wzrost translokacji Zn oraz obniżenie translokacji Fe do pędów. Heterologiczna ekspresja *35S_p::HvHMA2* w tytoniu skutkowałą zwiększeniem efektywności transportu Zn do pędów lecz obniżeniem pobierania Zn w obecności toksycznego stężenia Cd (w porównaniu do TD). Ponadto skutkowałą wzrostem pobierania Fe, bez wpływu na jego translokację. Zatem, obniżone pobieranie Zn, a zwiększone pobieranie Fe na skutek ekspresji *35S_p::HvHMA2* prawdopodobnie jest wynikiem modyfikacji endogennych genów odpowiedzialnych za pobieranie metali.

Podsumowanie

- Ekspresja *35S_p::HvHMA2*, doprowadziła do wzrostu akumulacji Zn w pędach (efekt oczekiwany), jednak pojawienie się takiej modyfikacji zależało od składu pożywki.
- Nie zaobserwowano zwiększonego stężenia Cd w pędach roślin TR.
- Obecność Cd w pożywce skutkuje intensyfikacją transportu Zn do pędów tytoniu TD. Ekspresja *35S_p::HvHMA2* spowodowała dodatkową indukcję translokacji Zn w obecności Cd, ale była jednocześnie przyczyną obniżenia pobierania Zn.
- Ekspresja *35S_p::HvHMA2* spowodowała zwiększoną wrażliwość na toksyczne stężenie Zn. Analogicznie do roślin pomidora z genem *AhHMA4* zwiększonej toksyczności Zn towarzyszył wzrost stężenia Zn w apoplacie liści oraz obniżenie stężenia Fe w pędach.
- Ekspresja *35S_p::HvHMA2* zaburzyła homeostazę nie tylko Zn (*HvHMA2* usuwa Zn do apoplastu), ale także Fe (Fe nie jest substratem dla *HvHMA2*). Za pierwotną przyczynę uznano zwiększony eksport Zn do apoplastu, co spowodowało zaburzenie homeostazy metali oraz zmianę ekspresji endogennych genów tytoniu jako efekt regulacji zaburzonej gospodarki metalami.

Transformacja roślin jest metodą powszechnie stosowaną w celu uzyskania osobników o nowych lub spotęgowanych dla danego gatunku cechach (aspekt biotechnologiczny). Prowadzone badania oparte o wygenerowane transformanty z ekspresją genów *HMA* kodujących białka eksportujące Zn i Cd do apoplastu miały na celu uzyskanie roślin o zwiększonej akumulacji w pędach Zn (tytoń, pomidor) oraz Cd (tytoń) w porównaniu do roślin TD. Badania na uzyskanych roślinach wykazały jednak, że do zwiększonej akumulacji Zn w częściach nadziemnych dochodziło tylko w niektórych z zastosowanych warunkach uprawy. Nie zaobserwowano natomiast zwiększonej akumulacji Cd w pędach, chociaż wartość współczynnika translokacji (stosunek stężenia metalu w pędzie do stężenia metalu w korzeniach) była wyższa, co wskazuje na zwiększoną intensywność transportu tego pierwiastka do części nadziemnych. Otrzymane rośliny charakteryzowały się również zmianami w akumulacji/dystrybucji Fe – pierwiastka, który nie jest transportowany przez białka *HMA*. Uzyskane wyniki doprowadziły do wskazania mechanizmów generowania zmian w akumulacji/translokacji metali. Ekspresja genów endogennych w roślinach TD jest zależna od stężenia poszczególnych metali w pożywce oraz w tkankach. Aktywność białka heterologicznego zmieniając stężenie jednego pierwiastka na poziomie komórek/tkanek/organów może w różnym stopniu modyfikować ekspresję endogennych genów homeostazy metali, co skutkuje innym wzorem ich ekspresji w porównaniu do roślin TD. Ze względu na brak pełnej specyficzności substratowej, w konsekwencji dochodzi do zmian w akumulacji i dystrybucji innych metali, nie tylko tych, które są transportowane przez białko kodowane przez transgen. Zatem obserwowane różnice w stężeniu i dystrybucji poszczególnych metali pomiędzy roślinami TR a TD będą zależały od: (a) użytego do transformacji genu kodującego białko transportujące metale, (b) zastosowanego promotora, (c) gatunku użytego do transformacji, (d) warunków uprawy, (e) wieku roślin, (e) długości prowadzonego eksperymentu. Obserwacje roślin tytoniu z ekspresją *HvHMA2* wskazują, iż zastosowanie nawet

konstytutywnego promotora CaMV 35S nie gwarantuje wygenerowania nowej, spodziewanej cechy, (t.j. wyższego stężenia metalu w pędach w porównaniu do roślin TD) bez względu na skład pożywki. Z tego powodu wyniki uzyskiwane w eksperymentach polowych z wykorzystaniem roślin TR wyrażającymi geny homeostazy metali często nie są zgodne z wynikami uzyskanymi w badaniach z wykorzystaniem upraw hydroponicznych oraz szklarniowych. Model wskazujący na mechanizmy molekularne prowadzące do zmiany fenotypu roślin w wyniku transformacji przedstawiono w pracy przeglądowej będącej częścią dorobku opisanego w rozdziale V autoreferatu (**Antosiewicz i wsp., 2014**).

W ramach prac nad wygenerowaniem transformantów przydatnych do fitoremediacji Zn i Cd (zwiększona akumulacja Zn i Cd w pędach / zwiększona efektywność translokacji tych metali do pędów) otrzymano również transgeniczne rośliny tytoniu wyrażające gen *AtHMA4* pod kontrolą promotora CaMV 35S (Siemianowski i wsp., 2011). Rośliny te charakteryzowały się m.in. niższym niż rośliny TD stężeniem Cd w korzeniach i pędach po uprawie w obecności Cd. Ze względu na tę cechę rośliny te posłużyły jako materiał badawczy w projekcie MNiSW: „Molekularne mechanizmy indukcji akumulacji cynku oraz redukcji kadmu w roślinach - badania na rzecz poprawy składu mineralnego”. Jednym z celów była charakterystyka molekularna roślin TR z ekspresją *35S_p::AtHMA4* cechujących się zmniejszoną akumulacją Cd w określonych warunkach uprawy. Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych badań weszły w skład publikacji z 2016 roku (**Barabasz i wsp., 2016, pub. 4 osiągnięcia**)

W momencie rozpoczęcia badań sekwencja genomu tytoniu nie była znana, a dostępne mikromacierze zawierały sondy rozpoznające jedynie część genów tytoniu. Z tej przyczyny posłużono się metodą bibliotek subtrakowanych (SSH – z ang. Suppression Subtractive Hybridization) w celu identyfikacji i sklonowania genów o zmienionej ekspresji w korzeniach roślin TR uprawianych w obecności 0,25 μM Cd w porównaniu do roślin TD uprawianych w takich samych warunkach. Biblioteki wykonano w oparciu o mRNA pozyskane z apikalnych części korzeni, gdyż wiadomo, że są one odpowiedzialne za pobieranie pierwiastków z podłoża oraz za załadunek ksylemu (Puig i Peñarrubia, 2009). Zidentyfikowano 316 fragmentów genów o potencjalnie zwiększonej ekspresji w roślinach transgenicznych oraz 354 fragmentów genów o potencjalnie obniżonej ekspresji w roślinach transgenicznych w porównaniu do roślin TD. Pośród nich były geny kodujące transportery jonów oraz niskocząsteczkowych związków organicznych, regulujące budowę i modyfikację ściany komórkowej, stres biotyczny i abiotyczny. Wśród otrzymanych fragmentów genów zidentyfikowano 5 genów związanych bezpośrednio z regulacją homeostazy metali. Trzy geny pochodziły z biblioteki zawierającej geny o potencjalnie zwiększonej ekspresji w roślinach TR, co potwierdziła późniejsza analiza. Były to: a) nieznan wcześniej w tytoniu gen *NtZIP4* (ZRT-IRT-like Protein), b) *NtIRT1-like* – wykazujący 96% homologii do znanego genu *NtIRT1*, c) *NtNAS* – wykazujący 99% homologii z genem *NtNAS1*. Dwa pozostałe geny, tj. *NtZIP2* oraz *NtVTL* (Vacuolar Iron Transporter – Like), nieznan wcześniej w tytoniu, pochodziły z biblioteki zawierającej geny o potencjalnie niższej ekspresji w roślinach TR w porównaniu do roślin TD. Otrzymane wyniki wykorzystano do dalszych badań mających na celu poznanie molekularnych mechanizmów stojących za obserwowaną regulacją translokacji do pędów Cd i Zn w roślinach TD zależną od wzajemnych stężeń tych metali w pożywce oraz za zmianami generowanymi w wyniku ekspresji *35S_p::AtHMA4*. Analizowano różnice w akumulacji Zn, Cd, a także Fe w powiązaniu z ekspresją genów homeostazy metali w apikalnych fragmentach korzeni pomiędzy roślinami TR a TD uprawianymi w kombinacji stężeń Zn i Cd: 1) Zn 0,5 μM (pożywka kontrolna); 2) Zn 0,5 μM + Cd 0,25 μM ; 3) Zn 0,5 μM + Cd 4 μM ; 4) Zn 10 μM ; 5) Zn 10 μM + Cd 0,25 μM ; 6) Zn 10 μM + Cd 4 μM .

W roślinach TD uprawianych w obecności niskiego stężenia Cd w podłożu translokacja Cd do pędów była bardziej sprawna niż przy uprawie w obecności wysokiego stężenia Cd. Co interesujące, przy niskim stężeniu Cd, obecność w podłożu podwyższonego stężenia Zn stymulowała pobieranie oraz transport Cd do pędów. Zjawisko to nie zostało do tej pory opisane. Po uprawie w obecności wysokiego stężenia Cd znacznie większa część pobranego Cd została zakumulowana w korzeniach niż przy uprawie w obecności niskiego Cd. Obecny w podłożu Zn o podwyższonym stężeniu nie miał wpływu na ilość zakumulowanego Cd, a także na jego dystrybucję pomiędzy korzeniami a pędami. Ekspresja *35S_p::AtHMA4* w tytoniu zmodyfikowała translokację Cd do pędów w sposób zależny od kombinacji stężeń Zn/Cd. Przy niskim stężeniu Zn i wysokim stężeniu Cd zaobserwowano bardziej wydajną translokację Cd, natomiast przy podwyższonym stężeniu Zn i niskim stężeniu Cd mniej wydajną translokację Cd do pędów w roślinach TR w porównaniu do roślin TD. W pozostałych warunkach uprawy (niskie stężenia Zn i niskie stężenia Cd oraz podwyższone stężenia Zn i wysokiego stężenia Cd) nie zaobserwowano różnic w translokacji Cd pomiędzy roślinami TR a TD. Wyniki te wskazują, iż wpływ ekspresji *35S_p::AtHMA4* na translokację Cd zależał od wzajemnych proporcji Cd:Zn w pożywce. Im stosunek ten jest wyższy, tym większa część Cd pobranego przez rośliny TR jest transportowana do pędów. Ekstopowa ekspresja genu kodującego białko eksportujące Zn i Cd do apoplastu spowodowała również obniżenie pobierania Cd przed rośliny TR uprawiane w obecności niskiego Cd (niezależnie od stężenia Zn) w stosunku do roślin TD uprawianych w tych samych warunkach.

Transport Zn do pędów w roślinach TD uprawianych w obecności 0,5 μM Zn był bardziej wydajny w obecności Cd w podłożu, zarówno w niskim jak i wysokim stężeniu, co potwierdziło wcześniejsze wyniki. Ekspresja *35S_p::AtHMA4* zintensyfikowała transport Zn do pędów (wynik oczekiwany) w roślinach uprawianych w obecności niskiego stężenia Zn, niezależnie od braku lub obecności Cd. Po uprawie w podwyższonym stężeniu Zn, niezależnie od stężenia Cd, nie stwierdzono różnic w akumulacji i dystrybucji Zn pomiędzy roślinami TR a TD.

Akumulacja i dystrybucja Fe w roślinach TD zależała także od stężeń Zn i Cd w pożywce. W obecności 4 μM Cd, zarówno przy niższym jak i wyższym stężeniu Zn, doszło do obniżenia stężenia Fe w korzeniach i pędach. Z kolei w obecności 10 μM Zn w podłożu, transport Fe do pędów został zahamowany, co skutkowało wzrostem stężenia Fe w korzeniach i obniżeniem stężenia w pędach. Ekspresja *35S_p::AtHMA4* spowodowała zahamowanie transportu Fe do pędów w obecności 4 μM Cd. Jest to wynik nieoczekiwany, gdyż białka HMA nie transportują Fe.

Zmiany w translokacji oraz akumulacji Cd, Zn i Fe indukowane ekspresją genu *AtHMA4*, a także zależne od kombinacji stężeń Zn/Cd mogły wynikać ze zmodyfikowanej ekspresji endogennych genów tytoniu. Aby to sprawdzić przeprowadzono analizę poziomu mRNA genów których fragmenty sekwencji poznano w ramach analizy bibliotek subtrakowanych, tj. *NtZIP2*, *NtZIP4*, *NtIRT1-like*, *NtNAS* oraz *NtVTL*. Dodatkowo zbadano ekspresję *NtZIP1* oraz *NtMTP1A* (Metal Tolerance Protein), których sekwencje zostały wcześniej zdeponowane w bazach danych (Sano i wsp., 2012, Shingu i wsp., 2005). Ponieważ funkcja nowo poznanych genów tytoniu była nieznana, a opublikowane wyniki dotyczące genów *NtZIP1* i *NtMTP1a* nie obejmowały badań ekspresji pod wpływem deficytu metali, ważne dla dalszego wnioskowania było określenie czy ekspresja tych genów jest regulowana deficytem Zn i Fe. Wyniki wcześniejszych badań wskazywały bowiem, że ekspresja *AhHMA4p::AhHMA4* w pomidorze wywołała deficyt Fe (Barabasza i wsp., 2012, pub. 2 osiągnięcia). Przypuszczano więc, że również w roślinach tytoniu z ekspresją *35S_p::AtHMA4* może dochodzić do deficytu Fe bądź Zn. Przeprowadzone analizy wykazały, iż ekspresja wszystkich wymienionych wyżej genów była indukowana deficytem Zn. Z kolei deficyt Fe spowodował wzrost ekspresji genów *NtZIP1*, *NtNAS* i *NtMTP1a* oraz obniżenie ekspresji genów *NtZIP2* i *NtVTL*.

Poziom ekspresji badanych genów w roślinach TD zależał od zastosowanej kombinacji stężeń Zn i Cd. Ekspresja *35S_p::AtHMA4* spowodowała modyfikację ich ekspresji w odniesieniu do roślin TD uprawianych w tych samych warunkach. Dla przejrzystości opisu dotyczącego wieloczynnikowego wpływu zastosowanych kombinacji stężeń Zn i Cd na zmiany w ekspresji badanych genów w roślinach TR, najpierw przedstawiono wyniki dla roślin TD wraz z interpretacją uzyskanych rezultatów, jako punkt odniesienia dla zmian ekspresji w roślinach TR.

U roślin TD obecność w podłożu Cd (4 μ M) indukowała wzrost ekspresji genów *NtZIP1*, *NtZIP2*, *NtZIP4*, *NtNAS*, *NtMTP1a* w apikalnych częściach korzeni co wskazuje, że wysokie stężenie Cd wywołuje w roślinach stan deficytu Zn. Zjawisko to określane jest w literaturze pojęciem „deficyt Zn wywołany Cd” (Küpper i Kochian, 2010). Poziom wzrostu ekspresji genów *NtZIP1*, *NtZIP4* oraz *NtNAS* w odpowiedzi na wysokie stężenie Cd zależał jednak od stężenia Zn w podłożu, co wskazuje, że deficyt Zn wywołany Cd może mieć różne nasilenie w zależności od proporcji stężeń Cd/Zn, a co za tym idzie od dostępności Zn. Z kolei wzrost ekspresji genu *NtZIP2* oraz *NtMTP1a* pod wpływem 4 μ M Cd był niezależny od zastosowanego stężenia Zn. Być może pierwotna przyczyna wzrostu ekspresji tych genów pod wpływem 4 μ M Cd jest inna niż deficyt Zn wywołany Cd. W przypadku genu *NtMTP1a* może to być deficyt Fe, gdyż wzrost jego ekspresji jest również indukowany deficytem Fe. Analiza akumulacji Fe wykazała bowiem, że obecność Cd w wysokim stężeniu skutkowała obniżonym pobieraniem Fe. Nie można wykluczyć, że sama obecność Cd spowodowała wzrost ekspresję genów *NtZIP2* i *NtMTP1a*. Nie zaobserwowano wpływu Cd na pobieranie Zn. Brak obniżonej akumulacji Zn w obecności 4 μ M Cd (zwłaszcza przy 0,5 μ M Zn, czego można było się spodziewać biorąc pod uwagę współzawodnictwo tych dwóch pierwiastków o białka transportowe), prawdopodobnie jest wynikiem skoordynowanego wzrostu ekspresji genów *NtZIP1*, *NtZIP2*, *NtZIP4*, *NtMTP1a* oraz *NtNAS*.

Jedyny gen, którego ekspresja była niższa w obecności 4 μ M Cd to *NtVTL*. Obniżenie jego ekspresja prawdopodobnie wynikało z deficytu Fe w tych roślinach, a nie deficytu Zn, gdyż deficyt Zn indukuje jego ekspresję. Z danych literaturowych wiadomo, iż w roślinach tytoniu uprawianych w deficycie Zn wzrasta stężenie Fe zarówno w korzeniach jak i w pędach, w porównaniu do roślin uprawianych warunkach kontrolnych (Kobayashi i wsp., 2003). Nie można wykluczyć, że wzrost ekspresji *NtVTL* pod wpływem deficytu Zn w pożywce jest wynikiem odpowiednio wysokiej akumulacji Fe w pędach, zaś wyższa ekspresja genu *NtVTL* w korzeniach ma chronić pędy przed nadmiernym napływem tego pierwiastka.

Obecność w podłożu 0,25 μ M Cd nie wpłynęła na ekspresję analizowanych genów w roślinach TD za wyjątkiem genów *NtIRT1-like* oraz *NtVTL* (niewielkie obniżenie w obecności 0,5 μ M Zn + 0,25 μ M Cd).

Obecny w podłożu Cd w niskim i wysokim stężeniu spowodował u roślin TD wzrost translokacji Zn do pędów, ale tylko przy niskim stężeniu Zn w pożywce. Ekspresja żadnego z analizowanych genów nie uległa zwiększeniu w apikalnych częściach korzeni w obecności 0,25 μ M Cd jak i 4 μ M Cd. Jedynym genem, którego ekspresja przyjęła jednakowy kierunek zmian zarówno w obecności 0,25 μ M oraz 4 μ M Cd był *NtVTL*. Nie można wykluczyć, że kodowane przez nie białko może być zaangażowane w regulację tego procesu. Ponadto za zjawisko to mogą być odpowiedzialne: a) zmiany ekspresji innych genów niż badane; b) zmiany na poziomie aktywności białek; c) zmiany ekspresji genów w innych niż apikalne częściach korzeni. Obecność w podłożu Cd wpływając na efektywność pobierania i translokacji Zn i Fe, prawdopodobnie w wyniku współzawodnictwa, powoduje zmiany w wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym stężeniu Zn i Fe, a przez to moduluje ekspresję genów zaangażowanych w utrzymanie homeostazy metali. Ostateczny poziom akumulacji i dystrybucji Zn/Cd/Fe jest więc wynikiem skoordynowanej aktywności białek kodowanych nie tylko przez analizowane geny, ale także inne geny homeostazy metali.

Jedynym genem, którego ekspresja miała różny poziom w roślinach TD rosnących we wszystkich kombinacjach Zn/Cd był gen *NiVTL*. Poziom jego ekspresji w apikalnych częściach korzeni był skorelowany ze stężeniem Fe w pędach po uprawie w obecności różnego stężenia Zn/Cd. Obserwacja ta jest podstawą do postawienia hipotezy o pędowym pochodzeniu sygnału regulującego ekspresję tego genu.

Ekspresja 35S_p::*AtHMA4* w tytoniu indukowała ekspresję wszystkich badanych genów w porównaniu do roślin TD uprawianych w tych samych warunkach, za wyjątkiem *NiZIP2*, przy czym występowanie różnic w ekspresji oraz ich wielkość zależały od wzajemnego stężenia Zn i Cd (składu pożywki). Ponieważ wszystkie analizowane geny w roślinach TD są indukowane w warunkach deficytu Zn w pożywce, otrzymane wyniki są przesłanką wskazującą, iż w roślinach wyrażających *AtHMA4* generowany jest deficyt Zn.

Ścieżki sygnałowe regulujące ekspresję genów pod wpływem deficytu Zn (sygnał lokalny, sygnał systemiczny, sygnały informujące o stężeniu Zn w symplacie lub stężeniu Zn w apoplastie) nie są znane. Nie można wykluczyć, że wzrost ekspresji niektórych genów w wyniku uprawy w niedoborze Zn może być mechanizmem zabezpieczającym przed nadmiernym napływem innych metali z powodu braku pełnej specyficzności substratowej transporterów. Szczególnie może to dotyczyć genów kodujących białka transportujące metale do wakuoli. Taka sytuacja może mieć miejsce w przypadku genu *NiMTP1a* lub *NiVTL*. Niewykluczone, że poziom ekspresji *NiVTL* jest determinowany nie tylko stężeniem Fe w pędach, o czym wspomniano wyżej, ale również niskim stężeniem Zn w komórkach. Pomimo, że dla większości zastosowanych kombinacji Zn/Cd nie zanotowano różnic w akumulacji Fe pomiędzy roślinami TR a TD to wzrost ekspresji *NiVTL* w roślinach TR był obserwowany.

Mimo podwyższonej w roślinach TR ekspresji genów *ZIP*, w tym *NiIRT1-like*, nie zaobserwowano zwiększonego pobierania Zn i Fe przez te rośliny. Możliwe, że badane geny, których ekspresja jest zwiększona w roślinach TR, kodują białka zaangażowane w pobieranie Zn z przestrzeni apoplastycznej wokół komórek położonych głębiej w korzeniach, tj. komórek kory, w tym endodermi oraz komórek walca osiowego. Zwiększona ilość kodowanych przez nie białek prowadziłaby do bardziej efektywnego pobierania Zn z apoplastu, który już raz został pobrany przez komórki ryzodermi, a następnie został wyeksportowany do apoplastu na skutek aktywności *AtHMA4*.

Podsumowanie

- W roślinach tytoniu TD obecność Cd usprawnia translokację Zn do pędów, ale tylko w określonym zakresie stężeń Zn i Cd (niskie stężenie Zn, stężenie Cd 4 μ M i niższe). Ekspresja 35S_p::*AtHMA4* zintensyfikowała transport Zn do pędów w obecności niskiego stężenia Zn w pożywce niezależnie od obecności Cd.
- Stosując metodę SSH zidentyfikowano fragmenty genów tytoniu zaangażowanych w regulację homeostazy Zn i Cd.
- Wykazano, że zidentyfikowane geny o wyższej ekspresji w roślinach TR są indukowane deficytem Zn.
- Ekspresja 35S_p::*AtHMA4* w tytoniu indukuje deficyt Zn w komórce (co nie jest powiązane z całkowitym stężeniem tego metalu w tkankach), o czym świadczy wzrost ekspresji genów w roślinach TR indukowanych deficytem Zn.
- Skoordynowane zmiany ekspresji endogennych genów homeostazy metali w roślinach TR indukowane ekspresją transgenu to kluczowy mechanizm generowania fenotypu

transformatów: występowania różnic w akumulacji i dystrybucji Zn i Cd w roślinach TR (w porównaniu do roślin TD).

- Na podstawie różnic modyfikacji ekspresji badanych genów, za kluczowe dla generowania fenotypu transformantów (modyfikacja dystrybucji Zn i Cd korzeń/pęd zależnej od stężenia Zn) uznano geny *NtZIP1*, *NtZIP4*, *NtIRT1-like* i *NtVTL*.
- Ekspresja genu *NtVTL* w roślinach TD oraz TR podlegała największym modyfikacjom pod wpływem zmiennych, wzajemnych stężeń Zn i Cd, co wskazuje na jego istotną rolę w homeostazie tych metali.

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, iż tylko w jednej z zastosowanych kombinacji stężeń Zn/Cd, tj. 0,5 μ M Zn + 4 μ M Cd, rośliny TR wykazują zwiększoną translokację zarówno Zn jak i Cd. Ponieważ w tych warunkach w roślinach TD najwyższą indukcję ekspresji wykazują geny *NtZIP1* i *NtZIP4*, a heterologiczna ekspresja *AtHMA4* dodatkowo indukuje ich ekspresję, przyjęto hipotezę, iż geny te są zaangażowane w regulację translokacji Zn i Cd do pędów. Z tego powodu dalszy ciąg badań miał na celu poznanie roli *NtZIP1* i *NtZIP4* w procesie translokacji Zn i Cd, który to proces jest zależny od wzajemnych stężeń Zn i Cd w pożywce. Wyniki części badań z tego obszaru zawarto w kolejnej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia naukowego (Barabasz i wsp., 2019, *pub. 5 osiągnięcia*).

Wzrost ekspresji genów *ZIP4* uznaje się za molekularny marker fizjologicznego deficytu Zn (Sinclair i wsp., 2018). Pomimo, iż sekwencje genów *ZIP4* zostały poznana dla wielu gatunkach (*A.thaliana*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Zea mays* i in.), przed rozpoczęciem badań dotyczących genów ZIP w tytoniu tylko dla nielicznych znana była ich lokalizacja komórkowa i tkankowa, specyficzność substratowa i profil ekspresji (Grotz i wsp., 1998, Wintz i wsp., 2003, López-Millán i wsp., 2004, Ishimaru i wsp., 2005). Potencjalne sekwencje mRNA genów tytoniowych udostępniono w 2016 roku. W ramach przeprowadzonych badań w genomie tytoniu zidentyfikowano dwa geny *ZIP4*, a każdy ze zidentyfikowanych genów pochodzi od innego przodka (tytoń szlachetny jest allotetraploidem i powstał poprzez hybrydyzację genomu *Nicotiana tomentosiformis* z genomem *Nicotiana glauca*, Ren i Timko, 2001; Sierro i wsp., 2013). Geny te zostały nazwane *NtZIP4A* i *NtZIP4B*. Białka przez nie kodowane wykazują 97,57% homologii pomiędzy sobą i posiadają wszystkie cechy charakterystyczne dla białek ZIP, tj. 8 domen transbłonowych, długi N-terminalny koniec, bardzo krótki C-terminalny koniec oraz długą pętlę cytoplazmatyczną bogatą w histydyny pomiędzy III a IV domeną transbłonową.

Seqwencja kodująca genu *NtZIP4B* została sklonowana. Ekspresja *NtZIP4B* w szczepie drożdży $\Delta zrt1zrt2$ posiadającym dwa zmutowane geny kodujące białka transportujące Zn do cytoplazmy (o wysokim i niskim powinowactwie), przywróciła ich wzrost w obecności niskiego stężenia Zn. Doświadczenie to wykazało, iż białko ZIP4B odpowiada za transport Zn do wnętrza komórki. Wykorzystując szczep dziki drożdży wykazano, że *NtZIP4B* transportuje również Cd.

Wyniki analizy bioinformatycznej wskazywały, że białko *NtZIP4B* lokalizuje się w plazmolemie, co potwierdzono doświadczalnie stosując ekspresję przejściową białka fuzyjnego GFP::*ZIP4B* w komórkach epidermy dolnej liści tytoniu.

Analizy ekspresji wykazały, że geny *NtZIP4A* i *NtZIP4B* są regulowane podobnie, dlatego w prezentowanych poniżej wynikach jest mowa o ekspresji genów *NtZIP4*, bez rozdzielania na poszczególne kopie.

Geny *NtZIP4* ulegają ekspresji we wszystkich organach wegetatywnych. W młodych siewkach wyższą ekspresję obserwowano w korzeniach, natomiast w 2-miesięcznych roślinach najwyższa ekspresja miała miejsce w młodych liściach. O ile w przypadku części nadziemnych występowały różnice w poziomie ekspresji pomiędzy liśćmi młodymi i starszymi, to w korzeniach

ekspresja w częściach apikalnych i nasadowych była na jednakowym poziomie. Wyniki te wskazują, iż w młodych siewkach białka NtZIP4 uczestniczą głównie w pobieraniu Zn z podłoża, w starszych roślinach w większym stopniu są odpowiedzialne za dostarczenie Zn do komórek młodych, rozwijających się liści.

Krótkoterminowy deficyt Zn w podłożu spowodował wzrost ekspresji genów *NtZIP4* we wszystkich poddanych analizie częściach rośliny (apikalne i nasadowe części korzeni oraz dolne liście), co wskazuje że geny *NtZIP4* są składową procesów odpowiedzialnych za efektywne pobieranie Zn do komórki przy ograniczonej dostępności Zn. Analiza akumulacji Zn po uprawie w tych samych warunkach wykazała, iż pomimo ograniczonej dostępności Zn, jego stężenie w pędach utrzymywało się na poziomie zbliżonym do poziomu w roślinach rosnących w warunkach optymalnych. Natomiast stężenie Zn w korzeniach uległo obniżeniu. Wyniki te świadczą, że deficyt Zn w podłożu indukuje mechanizmy odpowiedzialne za zwiększenie translokacji zakumulowanego w korzeniach Zn do pędów, w celu utrzymania optymalnego stężenia Zn w fotosyntetyzujących częściach roślin. Geny *NtZIP4* mogą uczestniczyć w tym procesie.

Przełożenie roślin tytoniu na pożywkę o wyższym stężeniu Zn skutkowało obniżeniem poziomu mRNA genów *NtZIP4*, lecz nawet przy długoterminowej uprawie w obecności wysokiego, lecz nietoksycznego stężenia Zn zachowana była różnica w ekspresji pomiędzy liśćmi młodymi a starymi. Represja ekspresji genów kodujących białka transportujące Zn do komórki jest mechanizmem zabezpieczającym przed intensywnym napływem Zn do komórek.

Obecność Cd w pożywce (3 dni) nie indukuje ekspresji *NtZIP4*. Wprawdzie wcześniejsze badania wykazały, iż w wyniku 11-dniowej uprawy w obecności 4 μ M Cd dochodzi do indukcji ekspresji genów *NtZIP4* w apikalnych częściach korzeni, jednak krótkoterminowa uprawa w obecności toksycznego stężenia tego pierwiastka nie wywołała takiego efektu. Wyniki te uwiarytelniały wcześniejsze wnioski, iż wzrost ekspresji genów *NtZIP4* w obecności Cd jest efektem wtórnym, wynikającym z deficytu Zn wywołanego Cd.

W celu poznania tkankowo-specyficjnej ekspresji genu *NtZIP4B* sklonowano jego promotor. Poznano również sekwencję promotora genu *NtZIP4A* z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych. Obydwa promotory zawierają sekwencję ZDRE (Zinc Deficiency Response Element, Assunção et al., 2010) odpowiedzialną za indukcję ekspresji w warunkach deficytu Zn. Używając genu reporterowego *uidA* (koduje β -glucuronidazę - GUS, w wyniku jej aktywności powstaje produkt o niebieskiej barwie) poznano tkankowo-specyficzną aktywność promotora genu *NtZIP4* w 4-tygodniowych siewkach uprawianych w warunkach kontrolnych lub w deficycie Zn.

W korzeniach roślin uprawianych w warunkach kontrolnych aktywność białka GUS została zaobserwowana w części apikalnej powyżej cichego centrum w komórkach prokambium oraz w sąsiadujących z nimi komórkach pramiększu. W obszarze gdzie dochodzi do różnicowania się komórek wraz ze znaczną ich wakuolizacją niebieskie zabarwienie świadczące o aktywności GUS było słabsze, a w niektórych komórkach było niewidoczne. Pojawiało się ponownie ok. 1 cm powyżej stożka wzrostu, najpierw w komórkach walca osiowego, a w wyższych partiach obejmowało komórki kory pierwotnej oraz ryzodermy. Taki wzór aktywności GUS był widoczny przez całą część środkową korzeni i zanikał w pobliżu połączenia korzeń-pęd. W korzeniach roślin uprawianych w deficycie Zn niebieskie zabarwienie było mocniejsze, a w obszarze różnicowania barwa wskazująca na aktywność GUS nie zanikała do końca. Niebieski kolor był wciąż widoczny w komórkach różnicujących się w komórki walca osiowego. Ponadto zabarwione były komórki kory pierwotnej i ryzodermy położonych bliżej stożka wzrostu w porównaniu do korzeni roślin kontrolnych. W przypadku pędów roślin uprawianych na pożywce kontrolnej najmocniej były wybarwione młode liście znajdujące się wokół stożka wzrostu oraz liścienie. Starsze liście były słabiej wybarwione, a niektóre z nich były niewybarwione. W liściach najmocniejszy sygnał pochodził z komórek wiązek przewodzących, słabszy z komórek miękiszu palisadowego i gąbczastego. W przypadku liści z roślin uprawianych w

deficycie Zn sygnał GUS był mocniejszy, obecny we wszystkich liściach, w komórkach wiązek przewodzących oraz miękiszu palisadowego i gąbczastego, był widoczny również w epidermie. Tkankowo-specyficzna analiza aktywności promotora wykazała więc, że promotor ten jest aktywny zarówno w komórkach okrywających organy jak również w umiejscowionych wewnątrz rośliny, nie mających bezpośredniego kontaktu ze środowiskiem zewnętrznym. Taka aktywność promotora wskazuje, że białko NtZIP4B uczestniczy w pobieraniu Zn i Cd do komórek zarówno ze środowiska zewnętrznego jak i z apoplastu. NtZIP4 to jedno z niewielu białek (obok AtIRT1 i HvNRAMP5, Vert i wsp., 2002, Wu i wsp., 2016), które jest zaangażowane w pobieranie metali z roztworu glebowego.

Podsumowanie

- **Białko NtZIP4B uczestniczy w pobieraniu Zn bezpośrednio z pożywki przez komórki epidermy korzenia, jak też z przestrzeni apoplastycznej korzeni, łodyg i liści. Ponadto jest odpowiedzialne za pobieranie Cd.**
- **Gen *NtZIP4A* najprawdopodobniej pełni te same funkcje co gen *NtZIP4B***
- **W promotorach genów *NtZIP4A* i *NtZIP4B* obecna jest sekwencja ZDRE odpowiedzialna za indukcję ekspresji w warunkach deficytu Zn, co wskazuje, że ich ekspresja jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne homologiczne do bZIP19 i bZIP23 z *A. thaliana* (Lilay i wsp., 2019).**
- **Geny *NtZIP4A* i *NtZIP4B* są składową mechanizmów odpowiedzialnych za efektywne pobieranie Zn z pożywki oraz z apoplastu przy niskim stężeniu Zn w pożywce.**
- **Geny *NtZIP4A* i *NtZIP4B* prawdopodobnie należą do kluczowych genów zaangażowanych w regulację homeostazy Zn, gdyż ulegają ekspresji w wielu typach komórek oraz zakresie stężeń Zn. W obecności wysokiego stężenia Zn ich ekspresja również ma miejsce, chociaż jest niższa niż w warunkach optymalnych.**
- **Ekspresja genów *NtZIP4A* i *NtZIP4B* nie jest indukowana obecnością Cd, a obserwowana indukcja ekspresji tych genów po dłuższej uprawie w obecności Cd jest efektem wtórnym wywołanym deficytem Zn indukowanym Cd.**

Wyniki opublikowane w 2016 roku (Barabas i wsp., 2016, *pub. 4 osiągnięcia*) wykazały, iż ekspresja genów *NtZIP1*, *NtZIP2*, *NtZIP4* i *NtIRT1-like* uległa indukcji w wyniku uprawy przez 11 dni w deficycie Zn. Badania z wykorzystaniem roślin TD jak również roślin wyrażających gen *35S_p::AtHMA4* (uprawianych w obecności 4 μ M Cd oraz niskiego i podwyższonego stężenia Zn) sugerowały, iż wzrost ekspresji niektórych genów mógł być efektem wtórnym i wynikał ze zmian w akumulacji innych pierwiastków. W celu bardziej dokładnego poznania roli genów ZIP w regulacji homeostazy Zn zbadano ich ekspresję w różnych częściach roślin w krótkoterminowym deficycie i nadmiarze Zn. Dodatkowo, analizie poddano geny *NtZIP5-like* i *NtZIP8*, których sekwencje nie były wówczas znane.

Przeprowadzone analizy wykazały, że ekspresja genu *NtZIP1* w warunkach kontrolnych ma miejsce głównie w apikalnych częściach korzeni, w mniejszym nasileniu w liściach. Krótkoterminowy deficyt Zn spowodował znaczny wzrost ekspresji we wszystkich analizowanych częściach rośliny, tj. apikalnych i nasadowych częściach korzeni oraz dolnych liściach. Przeniesienie do pożywki kontrolnej spowodowało obniżenie ekspresji. Natomiast jednodniowa uprawa przy nadmiarze Zn nie wywołała zmian w ekspresji tego genu.

Gen *NtZIP2* ulega ekspresji jedynie w korzeniach i to głównie w częściach apikalnych. Uprawa w warunkach deficytowych przez 4 dni, jak również późniejsze przeniesienie do warunków

kontrolnych nie spowodowała zmian w jego ekspresji. Natomiast 1-dniowa uprawa w obecności 50 μM Zn wywołała ok. 2-krotny wzrost ekspresji *NtZIP2*. Wyniki te potwierdzają przypuszczenia, iż wzrost ekspresji tego genu w warunkach deficytu Zn (**Barabasz i wsp., 2016, pub. 4 osiągnięcia**) najprawdopodobniej nie wynikał z deficytu Zn lecz ze zmian w stężeniu w roślinach innych pierwiastków. Ich stężenie uległo zmianie prawdopodobnie również w obecności 4 μM Cd w sposób niezależny od stężenia Zn w podłożu, o czym wspomniano wcześniej przy omawianiu poprzednich wyników.

Ekspresja genów *NtIRT1* oraz *NtIRT1-like* ma miejsce jedynie w korzeniach i ulega represji wraz z wiekiem roślin. Pomimo bardzo znaczącej homologii pomiędzy genami *NtIRT1* i *NtIRT1-like* ich regulacja pod wpływem obecności lub braku metali w podłożu jest odmienna. Gen *NtIRT1* nie był indukowany deficytem oraz nadmiarem Zn w zastosowanych warunkach. Z poprzednich badań wiadomo, iż uprawa w warunkach deficytu Fe spowodowała wzrost ekspresji tego genu. Z kolei gen *NtIRT1-like* nie ulega indukcji w deficycie Fe, jego ekspresja jest natomiast indukowany deficytem Zn (**Barabasz i wsp., 2016, pub. 4 osiągnięcia**). Badania, w których analizowano ekspresję ze względu na części roślin, wykazały, że krótkoterminowy deficyt Zn spowodował wzrost ekspresji, ale tylko w części nasadowej korzeni. Przeniesienie roślin uprawianych w deficycie Zn na pożywkę kontrolną spowodowało obniżenie ekspresji w obydwu analizowanych, tj. apikalnych i nasadowych częściach korzeni. Również uprawa w nadmiarze Zn skutkowała obniżeniem ekspresji, ale tylko w częściach apikalnych korzeni. Uzyskane wyniki potwierdzają, że ekspresja tego genu jest regulowana stężeniem Zn.

Dwa geny *ZIP*, których ekspresja nie była do tej pory badana to *NtZIP5-like* i *NtZIP8*. *NtZIP5-like* ulega ekspresji głównie w liściach (wyższa w młodszych), a jej poziom wzrasta z wiekiem roślin. Zastosowany deficyt Zn powoduje wzrost ekspresji w liściach, a przeniesienie roślin do pożywki o wyższym stężeniu Zn, w stosunku do tego na którym wcześniej uprawiano rośliny, spowodowało obniżenie ekspresji. Analiza ekspresji tego genu wykazała, że wzór jego ekspresji w liściach ze względu na stężenie Zn jest taki sam jak genów *NtZIP4*, co może świadczyć o wspólnych ścieżkach sygnalnych w liściach dla tych genów.

Ostatnim z analizowanych genów był *NtZIP8*. Gen ten jest wyrażany zarówno w liściach, łodygach jak i korzeniach. Ekspresja w korzeniach miała miejsce głównie w częściach nasadowych i była na podobny poziomie jak w liściach dolnych. Krótkoterminowy deficyt Zn w pożywce spowodował wzrost ekspresji w liściach oraz częściach nasadowych korzeni. Przeniesienie roślin do warunków kontrolnych spowodowało obniżenie ekspresji, bardziej istotne w liściach niż w korzeniach. Jednodniowa uprawa w nadmiarze Zn spowodowała zmniejszenie ilości mRNA dla tego genu w sposób jednakowy dla liści i części nasadowych korzeni. W częściach apikalnych korzeni nie zaobserwowano różnic ze względu na stężenie Zn.

Uzyskane wyniki wskazują, iż spośród sześciu, dodatkowo analizowanych genów, ekspresja czterech z nich (*NtZIP2*, *NtZIP5-like*, *NtZIP8* i *NtIRT1-like*) jest indukowana deficytem Zn. Obserwowany wzrost ekspresji jest specyficzny dla organu, co świadczy iż białka kodowane przez te geny pełnią w roślinie odmienną rolę w regulacji homeostazy Zn jednocześnie uzupełniając się.

Podsumowanie

- Ekspresja genów *NtZIP1*, *NtZIP2*, *NtIRT1* i *NtIRT1-like* w warunkach optymalnego składu pożywki zachodzi głównie w częściach apikalnych korzeni. Przy wzroście roślin na podłożu stałym części apikalne korzeni jako pierwsze mają styczność z nowo penetrowanym podłożem. Za pośrednictwem białek kodowanych przez te geny metale wnikają do komórek korzeni z nowego podłoża.

- W warunkach deficytu Zn, w częściach apikalnych korzeni zachodzi indukcja ekspresji *NtZIP1* oraz *NtZIP4*, co świadczy o roli tych genów w intensyfikacji pobierania Zn do młodych części korzeni przy niedoborze tego metalu.
- Krótkoterminowy deficyt Zn nie powoduje zmian w ekspresji genu *NtZIP2*, co sugeruje, iż obserwowany w poprzednich badaniach (Barabasz i wsp., 2016, *pub. 4 osiągnięcia*) wzrost ekspresji w wyniku dłużej trwającego deficytu Zn mógł być spowodowany zmianami wtórnymi w homeostazie metali.
- W obecności obniżonego stężenia Zn zachodzi indukcja ekspresji genów *NtZIP1*, *NtZIP4* i *NtZIP8* i *NtIRT1-like* w częściach nasadowych korzeni, co świadczy o roli tego fragmentu w regulacji pobierania i/lub redystrybucji Zn w warunkach deficytu Zn. Zwiększona ekspresja tych genów w części nasadowej może świadczyć o: (a) zwiększonym pobieraniu Zn z pożywki przez komórki ryzodermy tej części korzeni, (b) zwiększonym pobieraniu Zn z apoplastu przez komórki kory, w tym endodermy (c) uwalnianiu Zn do cytoplazmy z wakuol komórek tej części korzenia, jeżeli któreś z białek jest zlokalizowane w tonopląście, (d) regulacji stężenia Zn w soku ksylemowym poprzez przejściowe magazynowanie Zn w komórkach walca osiowego, (e) magazynowaniu innych pierwiastków w komórkach walca osiowego, które zostały pobrane przez komórki korzenia z powodu braku specyficzności białek transportowych tylko do jednego metalu.
- Za utrzymanie homeostazy Zn w liściach odpowiedzialne są białka kodowane przez geny *NtZIP4*, *NtZIP5-like* i *NtZIP8*. Ich ekspresja w liściach jest skorelowana z etapem rozwoju i odpowiedzią na zmienne zaopatrzenie w Zn. Wykazują one bowiem: (a) wyższą ekspresję w liściach roślin starszych niż młodszych, (b) indukcję ekspresji w warunkach deficytu Zn, (c) obniżenie ekspresji po przeniesieniu na pożywkę o wyższym stężeniu Zn. Taka skorelowana ekspresja w liściach może świadczyć o wspólnych mechanizmach regulacji ich transkrypcji w tych organach oraz o podobnej roli w homeostazie Zn. Wzrost poziomu ich transkryptu w warunkach deficytu Zn wskazuje, że kodowane przez nie białka współuczestniczą w bardziej efektywnej gospodarce Zn przez komórki fotosyntetyzujące.

Najważniejsze osiągnięcia i wnioski płynące z badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

- A. Heterologiczna ekspresja genów *HMA* ingeruje w procesy regulacji homeostazy metali rośliny użytej do transformacji
- W celu uzyskania roślin o zwiększonej akumulacji Zn i Cd w częściach nadziemnych wykonano transformację roślin genami *HMA*, zaangażowanymi w długodystansowy transport metali ciężkich z korzeni do pędów. Wykazano, że zmiany akumulacji i dystrybucji Zn i Cd w roślinach TR w porównaniu do roślin TD nie były stabilne. Kierunek i wielkość zmian zależały nie tylko od użytego do transformacji konstruktów i gatunku rośliny, ale również składu pożywki, na której rośliny były uprawiane (Barabasz i wsp., 2010, 2012, 2013, 2016, *pub. 1, 2, 3 i 4 osiągnięcia*).
 - Wykazano, że w roślinach transgenicznych wyrażających geny *AhHMA4_p::AhHMA4*, *35S_p::AtHMA4* i *35S_p::HvHMA2* nastąpiły zmiany w akumulacji i dystrybucji nie tylko Zn i Cd (metale będące substratem białek HMA), ale również Fe, metalu który nie jest substratem dla białek HMA (Barabasz i wsp., 2012, 2013, 2016, *pub. 2, 3 i 4 osiągnięcia*).

- Zaproponowano model wyjaśniający, dlaczego różnice w akumulacji i dystrybucji Zn i Cd (metali eksportowanych poza komórkę przez białka HMA4 i HMA2) oraz Fe (metal nie będący substratem dla obu białek) obserwowane pomiędzy roślinami TR a TD nie są stałe (**Barabasz i wsp., 2010, pub. 1 osiągnięcia, Antosiewicz i wsp., 2014, Kendziorek i wsp., 2016**, prace będące częścią dorobku opisane w rozdziale V autoreferatu).
 - Heterologiczne białka HMA transportując Zn/Cd poza komórkę powodują zwiększenie stężenia tych metali w apoplacie i obniżenie ich stężenia w symplacie, prowadząc do zmiany w ich dystrybucji symplast/apoplast.
 - Zmiany w stężeniu metali na poziomie komórki/tkanki aktywują endogenne mechanizmy homeostazy metali w komórce przeciwdziałające wygenerowanym zaburzeniom równowagi.
 - W konsekwencji dochodzi do zmiany w poziomie ekspresji genów w porównaniu do roślin TD uprawianych w tych samych warunkach wzrostu.
 - Ponieważ białka transportujące metale w poprzek błon biologicznych nie wykazują specyficzności substratowej tylko do jednego metalu (Korshunova i wsp., 1999, Milner i wsp., 2013), a efektywność przenoszenia zależy od powinowactwa do przenoszonych metali oraz od wzajemnego stosunku stężeń tych metali, zmiana profilu białek transportujących metale w poprzek błon biologicznych skutkuje zmianami w ilości przenoszonych metali będącymi ich substratami.
 - Niskie/optymalne/wysokie stężenie metali w podłożu dodatkowo moduluje proporcje stężeń pomiędzy metalami wpływając w ten sposób na ekspresję genów endogennych.
 - Ostatecznie fenotyp roślin TR uprawianych w obecności różnych (niskich/optymalnych/wysokich) stężeń Zn i Cd wynika ze wzajemnego oddziaływania transgenu z różnym tłem molekularnym rośliny gospodarza jakie jest skutkiem różnego poziomu metali w podłożu.
- Eksperymentalnie wykazano, że heterologiczna ekspresja genów *HMA* (kodujących białka eksportujące Zn i Cd do apoplastu) doprowadziła do zależnej od zastosowanych stężeń Zn i Cd w pożywce modyfikacji ekspresji genów gospodarza (tytoniu i pomidora, **Barabasz i wsp., 2010, 2012, 2016, pub. 1, 2, 4 osiągnięcia**). Ponieważ specyficzność substratowa transporterów metali nie jest ograniczona do jednego pierwiastka, zmiana profilu ekspresji genów endogennych skutkowała modyfikacją w pobieraniu/dystrybucji nie tylko metali transportowanych przez białka HMA2 i HMA4, ale również tych, które nie są dla nich substratem (Fe).
- Wykazano na poziomie molekularnym, że ekspresja genu *AtHMA4* w tytoniu wywołuje deficyt Zn w komórkach (**Barabasz i wsp., 2016, pub. 4 osiągnięcia**).
- Promotor *AhHMA4_p* jest aktywny w odległych filogenetycznie roślinach tytoniu, jednak jego regulacja w tym gatunku jest odmienna niż w *A.halleri* (**Barabasz i wsp., 2010, pub. 1 osiągnięcia**).

B. Określenie funkcji wybranych genów tytoniu w regulacji homeostazy metali

- Sklonowano fragmenty wcześniej nieznanych genów z tytoniu kodujących potencjalne transportery metali, tj. *NiZIP2*, *NiZIP4*, *NiIRT1-like* oraz *NiVTL* wykorzystując rośliny transgeniczne jako materiał do poszukiwania genów zaangażowanych w regulację homeostazy metali (**Barabasz i wsp., 2016, pub. 4 osiągnięcia**).
- Sklonowano sekwencję kodującą oraz promotor genu *NiZIP4B* (**Barabasz i wsp., 2019, pub. 5 osiągnięcia**).

- Wykazano, że białko NtZIP4B transportuje Zn i Cd do wnętrza komórek (**Barabasz i wsp., 2019, pub. 5 osiągnięcia**).
- Białko NtZIP4B uczestniczy w pobieraniu Zn i Cd z pożywki oraz przestrzeni apoplastycznej zarówno przez komórki korzenia, jak też łodygi oraz liści (**Barabasz i wsp., 2019, pub. 5 osiągnięcia**).
- Rola białka NtZIP4 jest szczególnie istotna w warunkach niskiego stężenia Zn w pożywce (**Barabasz i wsp., 2019, pub. 5 osiągnięcia**).
- Wykazano, że deficyt Zn indukuje ekspresję genów *NtZIP1*, *NtZIP2*, *NtZIP4*, *NtZIP5-like*, *NtZIP8*, *NtIRT1-like*, *NtNAS*, *NtMTP1a* i *NtVTL* (**Barabasz i wsp., 2016, 2019, pub. 4 i 5 osiągnięcia**). Jednak wzrost ekspresji genów *NtZIP2*, *NtMTP1a* i *NtVTL* jest prawdopodobnie efektem wtórnym, związanym ze zmianą stężenia innych metali w roślinie, występującym przy niedoborze Zn w podłożu. Ekspresja genów *NtZIP1*, *NtNAS* i *NtMTP1a* była również indukowana deficytem Fe, co wskazuje, że m.in. te geny mogą być odpowiedzialne za zjawisko homeostazy krzyżowej.
- Wzrost ekspresji genów *NtZIP1*, *NtZIP4*, *NtNAS* w obecności toksycznego stężenia Cd jest zależny od stężenia Zn w podłożu i prawdopodobnie wynika z deficytu Zn wywołanego Cd, natomiast wzrost ekspresji genów *NtZIP2* oraz *NtMTP1a* w obecności toksycznego stężenia Cd jest niezależny od stężenia Zn, co sugeruje że jest wynikiem zaburzonej homeostazy innych niż Zn pierwiastków (**Barabasz i wsp., 2016, pul. 4 osiągnięcia**).
- Poziom ekspresji genu *NtVTL* w korzeniach prawdopodobnie jest regulowany stężeniem Fe w pędach. Przyczyna wzrostu ekspresji genu *NtVTL* w roślinach transgenicznych wyrażających gen *AtHMA4* pozostaje jednak nieznana (**Barabasz i wsp., 2016, pub. 4 osiągnięcia**).
- Za utrzymanie homeostazy Zn w liściach odpowiedzialne są białka kodowane przez geny *NtZIP4*, *NtZIP5-like* i *NtZIP8*.
- Ze względu na zróżnicowanie ekspresji w poszczególnych częściach korzeni geny *ZIP* tworzą następujące grupy funkcjonalne:
 - geny ulegające ekspresji głównie w apikalnych częściach korzenia – *NtZIP1*, *NtZIP2*, *NtIRT1*, *NtIRT1-like*, ekspresja genów *NtZIP1* i *NtIRT1-like* zachodzi również w częściach nasadowych, lecz w określonych warunkach uprawy,
 - geny ulegające ekspresji na podobnym poziomie w całych korzeniach – *NtZIP4A* i *NtZIP4B*,
 - geny ulegające ekspresji głównie w nasadowych częściach korzeni – *NtZIP8*.
- Zróżnicowana ekspresja genów *ZIP* w poszczególnych częściach korzeni świadczy, że geny te mogą pełnić różne funkcje w mechanizmie regulacji homeostazy Zn (**Barabasz i wsp., 2019, pub. 5 osiągnięcia**).
- Wykazano, że w roślinach tytoniu uprawianych na pożywce zawierającej Cd i niskie stężenie Zn dochodzi do zwiększonej translokacji Zn pod wpływem Cd (**Barabasz i wsp., 2016, pub. 5 osiągnięcia**). Mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko na obecnym etapie badań są nieznane.

Obecnie realizowane zadania oraz plany na przyszłość:

- 1) Kontynuowanie badań nad poznaniem roli białek ZIP4 w akumulacji i dystrybucję Zn i Cd poprzez analizę roślin z wyciszoną ekspresją genów *NtZIP4A* i *NtZIP4B*,

- 2) Poznanie roli genu *NtZIP1* w akumulacji i dystrybucji Zn i Cd,
- 3) Poszukiwanie mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększoną translokację Zn w obecności Cd z uwzględnieniem roli genów *NtZIP4A*, *NtZIP4B* oraz *NtZIP1* w tym procesie,
- 4) Poznanie roli części nasadowych korzeni w akumulacji i dystrybucji Zn i Cd,
- 5) Poznanie funkcji molekularnej i fizjologicznej genów *NtVTL* w regulacji homeostazy metali, szczególnie Zn i Cd, w roślinach tytoniu.

V. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

a) Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora

1. Mac A., Krzymowska M., **Barabasz A.**, Hennig J. (2004) Transcriptional regulation of the *gluB* promoter during plant response to infection. *Cellular and Molecular Biology Letters* 9: 843-53.
IF₂₀₀₄ = 0,495; IF_{5-letni} - 1,291; MNiSW_{2007*s} - 10 (2017 - 15) ; liczba cytowań (wg WoS) - 7 (bez autocyt. - 7)
* punkty za rok 2004 niedostępne
2. Patent # PL 200176 B1 „Gen kodujący enzym hydrolityczny 1,3-βglukanazy, sposób jego wytwarzania, enzym kodowany przez ten gen oraz sposób wytwarzania enzymu hydrolitycznego 1,3- βglukanazy” - Hennig J., **Barabasz A.**, Witek K.
3. Patent # PL 202050 B1 „Sposób wytwarzania roślin z rodziny Solanaceae, zwłaszcza ziemniaka, o ulepszonych cechach hodowlanych” - Hennig J., **Barabasz A.**

b) Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora

b1) Spis publikacji

1. **Barabasz A.**, Mills R.F., Trojanowska E., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2011) Expression of *AtECA3* in tobacco modifies its responses to manganese, zinc and cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 202-209
IF₂₀₁₁ - 2,985 ; IF_{5-letni} - 4,234; MNiSW₂₀₁₁ - 40 ; liczba cytowań (wg WoS) - 11 (bez autocytowań 4)
Wkład habilitanta - 40% współdział w: wyprowadzeniu roślin transgenicznych, analizie otrzymanych roślin pod względem obecności transgeny, uprawie roślin, zbieraniu materiału, przygotowaniu prób oraz analiza stężeń pierwiastków, izolacji RNA, przygotowaniu cDNA, badaniu poziomu ekspresji, opracowaniu wyników, przygotowaniu rycin
2. Siemianowski O., **Barabasz A.**, Weremczuk A., Ruszczynska A., Bulska E., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2013) Development of Zn-related necrosis in tobacco is enhanced by expressing *AtHMA4* and depends on the apoplastic Zn levels. *Plant, Cell and Environment* 36: 1093-1104
IF₂₀₁₃ - 5,906; IF_{5-letni} - 6,151; MNiSW₂₀₁₃ - 45; liczba cytowań (wg WoS) - 21 (bez autocytowań 11)
Wkład habilitanta - 15% współautorstwo koncepcji niektórych badań, pomoc przy zbieraniu płynu apoplastycznego, przygotowaniu próbek do analiz ICP-MS, oznaczanie stężenia Zn metodą ASA
3. Antosiewicz D.M., **Barabasz A.**, Siemianowski O. (2014) Phenotypic and molecular consequences of overexpression of metal-homeostasis genes. *Frontiers in Plant Science* 5: 80
IF₂₀₁₄ - 3,948; IF_{5-letni} - 4,353; MNiSW₂₀₁₄ - 40; liczba cytowań (wg WoS) - 19 (15)
Wkład habilitanta - 25% - współdział w koncepcji pracy

4. Kendziorek M., **Barabasz A.**, Rudzka J., Tracz K., Mills R.F., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2014) Approach to engineer tomato by expression of AtHMA4 to enhance Zn in the aerial parts. *Journal of Plant Physiology*, 171: 1413-1422
IF₂₀₁₄ - 2,557; IF_{5-letni} - 3,034; MNiSW₂₀₁₄ - 35; liczba cytowań (wg WoS) – 10 (bez autocytowań 4)
Wkład habilitanta – 30% - wyprowadzenie i analiza roślin transgeniczných, analiza otrzymanych roślin pod względem obecności transgenu, współudział w przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA, współudział w analizie ekspresji.
5. Siemianowski O., **Barabasz A.**, Kendziorek M., Ruszczyńska A., Bulska E., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2014) AtHMA4 expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1125-1139
IF₂₀₁₄ 5,526; IF_{5-letni} - 6,044 ; MNiSW₂₀₁₄ - 45; liczba cytowań (wg WoS) – 29 (bez autocytowań 25)
Wkład habilitanta – 10% - współautorstwo koncepcji badań, współudział w przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA, współudział w analizie ekspresji.
6. Kendziorek M., Klimecka M., **Barabasz A.**, Borg S., Rudzka J., Szczęśny P., Antosiewicz D.M. (2016) Engineering high Zn in tomato shoots through expression of AtHMA4 involves tissue-specific modification of endogenous genes. *BMC Genomics* 17: 625
IF₂₀₁₆ = 3,729; IF_{5-letni} - 4,257; MNiSW₂₀₁₆ - 35; liczba cytowań (wg WoS) – 3 (bez autocytowań 0)
Wkład habilitanta – 8% - współudział w przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA, współudział w analizie ekspresji.
7. Weremczuk A., **Barabasz A.**, Ruszczyńska A., Bulska E., Antosiewicz D.M. (2016) Determination of usefulness of AhHMA4_{p1}::AhHMA4 expression in biofortification strategies. *Water, Air, & Soil Pollution* 227: 186
IF₂₀₁₆ = 1,702; IF_{5-letni} - 1,972; MNiSW₂₀₁₆ - 25; liczba cytowań (wg WoS) – 0
Wkład habilitanta – 35% - współautorstwo koncepcji badań, współudział w: hodowli roślin, zbieraniu materiału roślinnego, przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA, analizie ekspresji.
8. Papierniak A., Kozak K., Kendziorek M., **Barabasz A.**, Palusińska M., Tiuryn J., Paterczyk B., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2018) Contribution of NtZIP1-Like to the Regulation of Zn Homeostasis. *Frontiers in Plant Science* 9: 185
IF₂₀₁₇ = 3,677; IF_{5-letni} - 4,353; MNiSW₂₀₁₇ - 40; liczba cytowań (wg WoS) – 3 (bez autocytowań 1)
Wkład habilitanta – 5% - pomoc przy zbieraniu materiału biologicznego, współudział w analizie ekspresji, wkład merytoryczny przy klonowaniu, przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA
9. Kozak K., Papierniak A., **Barabasz A.**, Kendziorek M., Palusińska M., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2019) NtZIP11, a new Zn transporter specifically upregulated in tobacco leaves by toxic Zn level. *Environmental and Experimental Botany* 157: 69-78
IF₂₀₁₇ = 3,666; IF_{5-letni} - 4,234; MNiSW₂₀₁₇ - 40; liczba cytowań (wg WoS) – 0
Wkład habilitanta – 5% - pomoc przy zbieraniu materiału biologicznego, współudział w przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA, współudział w analizie ekspresji.

b2) Omówienie poszczególnych publikacji

Wpływ heterologicznej ekspresji genów kodujących transportery metali na akumulację metali oraz ekspresję genów endogennych

Tematyka większości prac dorobku naukowego koncentrowała się na genetycznie modyfikowanych roślinach tytoniu i pomidora, wyprowadzonych w celu otrzymania roślin

o zwiększonej akumulacji wybranych metali w pędach. Jednak uzyskane rośliny transgeniczne często posiadały nowe cechy, których nie oczekiwano przystępując do transformacji roślin. W celu poznania mechanizmów molekularnych i fizjologicznych indukowanych w otrzymanych roślinach, a warunkujących generowanie nowych cech transformantów, przeprowadzono szereg badań, których wyniki opisano w 6 pracach badawczych oraz jednej pracy przeglądowej. Prace pogrupowano ze względu transformowany gatunek rośliny oraz użyty do transformacji gen.

Transgeniczne rośliny tytoniu z ekspresją genu AtECA3

Barabasz A., Mills R.F., Trojanowska E., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2011) Expression of AtECA3 in tobacco modifies its responses to manganese, zinc and cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 202-209

pub. 1 (wg spisu)

IF₂₀₁₁ - 2,985 ; IF_{5-letni} - 4,234; MNiSW₂₀₁₁ - 40 ; liczba cytowań (wg WoS) – 11 (bez autocytowań 4)

Wkład habilitanta – 40% , współudział w: wyprowadzeniu roślin transgenicznych, analizie otrzymanych roślin pod względem obecności transgeny, uprawie roślin, zbieraniu materiału, przygotowaniu prób oraz analiza stężeń pierwiastków, izolacji RNA, przygotowaniu cDNA, badaniu poziomu ekspresji, opracowaniu wyników, przygotowaniu rycin

W celu uzyskania roślin charakteryzujących się zwiększoną akumulacją Zn i Mn w częściach nadziemnych oraz zwiększoną tolerancją na te metale otrzymano transgeniczne rośliny tytoniu wyrażające gen *AtECA3*, pod kontrolą konstytutywnego promotora CaMV 35S. Gen ten koduje zlokalizowaną w błonie aparatu Golgiego ATPazę typu P_{2A}, która transportuje Mn i Ca do wnętrza pęcherzyków aparatu Golgiego (Mills i wsp., 2008). Wyniki badań z wykorzystaniem drożdży sugerowały, że również Zn może być transportowany przez to białko. Otrzymane rośliny transgeniczne uprawiano na pożywkach płynnych w obecności trzech stężeń manganu: optymalnego, podwyższonego i toksycznego. Wykazano, że po uprawie w obecności podwyższonego stężenia Mn rośliny TR charakteryzowały się większą biomasą niż rośliny TD, a stężenie Mn w korzeniach i pędach roślin TR było niższe niż w roślinach TD. Z kolei, w obecności toksycznego dla roślin TD stężenia Mn, rośliny TR charakteryzowały się zwiększoną tolerancją, co objawiało się większą biomasą. Stężenie Mn w korzeniach i pędach było na podobnym poziomie jak w roślinach TD. Wyniki takie sugerują, że w roślinach transgenicznych doszło do zmian w wewnątrzkomórkowej kompartmentacji Mn przez co obecny w tkankach Mn był mniej toksyczny. Rośliny TR i TD uprawiano również w obecności deficytowego stężenia Ca. Wykazywały one większą tolerancję na deficyt Ca, pomimo braku różnic w stężeniu Ca w pędach i korzeniach w porównaniu do roślin TD. Wpływ ekspresji genu *AtECA3* na akumulację Zn zależał od zastosowanego stężenia Zn w pożywce, jednak wzrost akumulacji Zn obserwowano tylko w korzeniach roślin TR uprawianych w obecności optymalnego stężenia Zn.

Podsumowując: Ekspresja *35S_p::AtECA3* nie wpłynęła na zwiększenie stężenia Mn, Ca, Zn i Cd w pędach, spowodowała natomiast zwiększoną tolerancję na Mn oraz zwiększoną produktywność roślin w obecności podwyższonego stężenia Mn oraz deficytowego stężenia Ca. Cechy takie świadczą, że uzyskane rośliny mogą być wykorzystane do celów biotechnologicznych w określonych warunkach środowiskowych.

Transgeniczne rośliny tytoniu z ekspresją genu AtHMA4

Siemianowski O., **Barabasz A.**, Weremczuk A., Ruszczyńska A., Bulska E., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2013) Development of Zn-related necrosis in tobacco is enhanced by expressing AtHMA4 and depends on the apoplastic Zn levels. *Plant, Cell and Environment* 36: 1093-1104

pub. 2 (wg spisu)

IF₂₀₁₃ - 5,906; IF_{5-letni} - 6,151; MNiSW₂₀₁₃ = 45; liczba cytowań (wg WoS) – 21 (bez autocytowań 11)

Wkład habilitanta – 15%, współautorstwo koncepcji niektórych badań, pomoc przy zbieraniu płynu apoplastycznego, przygotowaniu próbek do analiz ICP-MS, oznaczanie stężenia Zn metodą ASA

W celu uzyskania roślin o zwiększonej akumulacji Zn i Cd w pędach otrzymano również transgeniczne rośliny tytoniu wyrażające gen *AtHMA4* pod kontrolą promotora CaMV 35S (Siemianowski i wsp., 2011). Podobnie do roślin tytoniu z ekspresją *AhHMA4p::AhHMA4* charakteryzowały się one zwiększoną wrażliwością na Zn. Aby poznać mechanizmy odpowiedzialne za powstawanie nekroz (uznawanych za objaw toksyczności Zn), zbadano stężenia Zn w całych blaszkach liściowych oraz w płynie apoplastycznym. Zauważono, że pojawienie się nekroz zależało od stężenia Zn w apoplaście, a nie od całkowitego stężenia Zn w tkance. U roślin TR nekrozy pojawiały się przy niższym całkowitym stężeniu Zn w liściach w porównaniu do roślin TD, jednak przy podobnym poziomie Zn w apoplaście. W wyniku aktywności białka AtHMA4 transportującego Zn poza komórkę, stężenie Zn w apoplaście indukujące powstawanie nekroz w roślinach TR uzyskano przy niższym całkowitym stężeniu Zn w liściach w porównaniu do roślin TD. Analiza lokalizacji Zn „in situ” wykazała, że pojawienie się nekroz jest poprzedzone powstaniem skupisk komórek o wyższym stężeniu Zn w porównaniu do komórek je otaczających. Skupiska „komórek akumulujących Zn” obecne były nie tylko w roślinach TD, ale również w roślinach TR. W roślinach TR obszary „komórek akumulujących Zn” były widoczne przy niższym stężeniu Zn w podłożu niż w roślinach TD (ale przy tym samym stężeniu Zn w apoplaście). Na podstawie otrzymanych wyników postawiono hipotezę, iż (i) stężenie Zn w apoplaście (a nie całkowite stężenie w tkance) jest czynnikiem determinującym powstawanie nekroz; (ii) zwiększony załadunek Zn do apoplastu liści roślin TR na skutek aktywności eksportowej AtHMA4 indukuje powstawanie nekroz, które jest poprzedzone pojawieniem się skupisk „komórek akumulujących Zn”. W roślinach TR stężenie Zn w apoplaście indukujące nekrozy było osiągalne przy niższym stężeniu Zn w podłożu niż w roślinach TD. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, iż w apoplaście liści są obecne sensory stężenia Zn. Po przekroczeniu progowego stężenia Zn w apoplaście dochodzi do akumulacji Zn w określonej grupie komórek, z których następnie powstają nekrozy. Mechanizm ten prawdopodobnie chroni sąsiadujące komórki przed toksycznością Zn.

Podsumowując: stężenie Zn w apoplaście jest czynnikiem determinującym powstawanie nekroz.

Siemianowski O., **Barabasz A.**, Kendziorek M., Ruszczyńska A., Bulska E., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2014) AtHMA4 expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1125-1139

pub. 5 (wg spisu)

IF₂₀₁₄ 5,526; IF_{5-letni} - 6,044 ; MNiSW₂₀₁₄ = 45; liczba cytowań (wg WoS) – 29 (bez autocytowań 25)

Wkład habilitanta – 10% - współautorstwo koncepcji badań, współdziałal w przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA, współdziałal w analizie ekspresji.

Badania prowadzone na transgenicznych roślinach tytoniu z ekspresją *35S_p::AtHMA4* wykazały, że, przeciwnie do oczekiwań, rośliny te charakteryzowały się obniżoną akumulacją Cd w korzeniach i pędach w obecności niskiego stężenia Cd w podłożu (Siemianowski i wsp., 2011). Ponieważ jest to cecha pożądana w roślinach jadalnych ze względu na zanieczyszczenie Cd terenów rolniczych, celem kolejnych badań było poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za taki fenotyp. Zastosowanie mikromacierzy wykazało, iż w roślinach TR uprawianych w obecności niskiego stężenia Cd dochodzi do indukcji genów zaangażowanych w lignifikację ścian komórkowych. Używając technik mikroskopowych wykazano, że w roślinach TR ściany komórkowe zlokalizowane pomiędzy ryzodermą a najbardziej zewnętrzną warstwą komórek kory ulegały lignifikacji, czemu towarzyszyła zwiększona akumulacja nadtlenu wodoru. Za lignifikację tę

prawdopodobnie odpowiedzialne było zwiększone lokalnie stężenie Cd, będące następstwem aktywności eksportowej białka AtHMA4 w stosunku do Cd. Dalsze badania wykazały, iż również stężenie B, Co, Cu, Ni, Mo i Zn było obniżone w roślinach transgenicznych uprawianych w obecności Cd. W roślinach uprawianych w warunkach kontrolnych nie zaobserwowano obniżonego stężenia tych pierwiastków. Wyniki wskazują, na zależne od ektopowej ekspresji *AtHMA4* zwiększenie stężenia Cd w apoplacie, co indukuje zmiany w budowie ścian komórkowych, powodujące w konsekwencji ograniczenie transportu metali drogą apoplastyczną.

Przeprowadzone badania mikromacierzowe wykazały, iż w roślinach transgenicznych dochodzi do zwiększonej ekspresji genów *NtZIP1* i *NtIRT1*. Wyniki takie świadczą o tym, że ograniczony transport Zn i Fe drogą apoplastyczną indukuje mechanizmy odpowiedzialne za zwiększoną ekspresję genów związanych z pobieraniem wspomnianych metali przez komórki, a w konsekwencji do zwiększonego ich transportu drogą symplastyczną. Prawdopodobnie z tego powodu stężenie Zn i Fe w pędach nie uległo zmianie.

Podsumowując: Stężenie Cd w apoplacie wpływa na lignifikację ścian komórkowych, w konsekwencji obniżając efektywność transportu metali drogą apoplastyczną.

Transgeniczne rośliny pomidora z ekspresją genu AtHMA4

Kendzior M., **Barabasz A.**, Rudzka J., Tracz K., Mills R.F., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2014) Approach to engineer tomato by expression of AtHMA4 to enhance Zn in the aerial parts. *Journal of Plant Physiology*, 171: 1413-1422

pub. 4 (wg spisu)

IF₂₀₁₄ - 2,557; IF_{5-letni} - 3,034; MNiSW₂₀₁₄ = 35; liczba cytowań (wg WoS) – 10 (bez autocytowań 4)

Wkład habilitanta – 30% - wyprowadzenie i analiza roślin transgenicznych, analiza otrzymanych roślin pod względem obecności transgeny, współudział w przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA, współudział w analizie ekspresji.

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wpisują się w nurt badań realizowanych w ramach projektu PHIME, a skupiających się na otrzymaniu i charakterystyce roślin transgenicznych generowanych w celu zwiększenia poziomu akumulacji Zn w częściach nadziemnych (w porównaniu do roślin TD). Konstrukcja genu *35S_p::AtHMA4* została wprowadzona do pomidora w celu określenia jej przydatności dla potrzeb biofortyfikacji (otrzymania owoców o wyższym stężeniu Zn). W pracy opisano wyniki analizy stężeń Zn, Cd i Fe w uzyskanych roślinach oraz analizy ekspresji wybranych genów homeostazy metali w liściach i korzeniach. Otrzymane rośliny transgeniczne charakteryzowały się zwiększoną translokacją oraz akumulacją Zn w liściach, ale tylko w obecności podwyższonego stężenia Zn w podłożu. W warunkach tych rośliny transgeniczne wykazywały również zwiększoną wrażliwość na Zn. Rośliny te wykazują więc fenotyp podobny do roślin wyrażających *AhHMA4_p::AhHMA4* (**Barabasz i wsp., 2012, pub. 2 osiagnięcia**). W uzyskanych roślinach TR rosnących w obecności toksycznego stężenia Zn nie zaobserwowano natomiast obniżonego stężenia Fe w liściach, a analiza ekspresji genów związanych z homeostazą Fe wykazała obniżoną ekspresję większości analizowanych genów, co wskazuje, że nie doszło do deficytu Fe na poziomie komórkowym. Wyniki te różnią się od wyników uzyskanych dla roślin pomidora transformowanego konstruktem *AhHMA4_p::AhHMA4*, co może być skutkiem m.in. zastosowania innych promotorów.

Otrzymane w ramach niniejszej pracy rośliny TR nie różniły się poziomem akumulacji Cd w pędach w stosunku do roślin TD. Zanotowano natomiast wzrost translokacji Cd po uprawie przy niskim stężeniu Cd, co wynikało z obniżonego stężenia Cd w korzeniach. Ponadto wykazano różnice w akumulacji Zn i Fe pomiędzy roślinami TR a TD pod wpływem obecności Cd w podłożu. Istnienie różnic było zależne od zastosowanego stężenia Cd.

Podsumowując: Ekspresja 35S:: *AtHMA4* (eksport Zn i Cd do apoplastu) w pomidorze, ingerując w akumulację i dystrybucję Zn i Cd na poziomie komórki, wpływa na ekspresję genów homeostazy Fe oraz akumulację i dystrybucję Zn-Fe-Cd na poziomie organów. Uzyskane wyniki nie we wszystkich aspektach są zgodne z wynikami dla roślin pomidora wyrażającymi *AhHMA4p::AhHMA4* (**Barabasz i wsp., 2012, pub. 2 osiągnięcia**), co wskazuje m.in. na rolę zastosowanego promotora, a więc i wpływ miejsca ekspresji transgenu na obserwowany fenotyp.

Kendziorek M., Klimecka M., **Barabasz A**, Borg S., Rudzka J., Szczęsny P., Antosiewicz D.M. (2016) Engineering high Zn in tomato shoots through expression of *AtHMA4* involves tissue-specific modification of endogenous genes. *BMC Genomics* 17: 625

pub. 6 (wg spisu)

IF₂₀₁₆ = 3,729; IF_{5-letni} - 4,257; MNiSW₂₀₁₆ = 35; liczba cytowań (wg WoS) – 3 (bez autocytowań 0)

Wkład habilitanta – 8% - współudział w przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA, współudział w analizie ekspresji.

Poszukując mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zależne od stężenia Zn w podłożu zmiany w dystrybucji Zn w roślinach transgenicznym wyrażających 35S_p::*AtHMA4* wykonano analizę ekspresji genów z użyciem mikromacierzy, a następnie qPCR. Zastosowanie laserowego wycinania tkanek pozwoliło na zbadanie ekspresji w wyodrębnionych obszarach korzenia, tj.: a) epidermie korzenia + korze, b) walcu osiowym, c) epidermie górnej liści + mięksiszu palisadowym d) epidermie dolnej liści + mięksiszu gąbczastym. Szczegółowej analizie ekspresji poddano geny związane z homeostazą metali oraz metabolizmem etylenu. Wykazano, że w roślinach TR uprawianych w obecności podwyższonego stężenia Zn (akumulacja Zn w pędach roślin TR wyższa niż w TD, brak różnic w akumulacji Fe) doszło do obniżenia ekspresji genów związanych z metabolizmem etylenu, tj.: *SIACO4*, *SIACO5* (koduują oksydazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego, ang. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase) oraz *SINR* (koduje receptor etylenu, od nazwy mutantu *never-ripe*), zarówno w komórkach kory pierwotnej jak i walca osiowego. Również obniżeniu w tych obydwu pulach komórek uległa ekspresja genów związanych z homeostazą żelaza: *SIFER*, *SINRAM1*, *SINRAMP3* oraz *SIIRT1* (gen ten nie ulega ekspresji w walcu osiowym). Natomiast modyfikacja ekspresji genów *SICHLN* oraz *SINRAMP2* przyjmowała różny kierunek, w zależności od tkanki. W korze obserwowano represję, natomiast w walcu osiowym – indukcję ekspresji. Zmiany w ekspresji analizowanych genów w roślinach TR były również obserwowane po uprawie w warunkach kontrolnych (brak różnic w akumulacji Zn i Fe pomiędzy roślinami TR a TD). Ekspresja genów metabolizmu etylenu była wyższa w roślinach TR w komórkach kory, natomiast w komórkach walca osiowego na podobnym poziomie jak w roślinach TD, za wyjątkiem genu *SINR*, którego ekspresja była wyższa. Różnice w ekspresji genów związanych z homeostazą Fe pomiędzy roślinami TR a TD były następujące: a) geny *SIFER* i *SIIRT1* wykazywały zwiększoną ekspresję w komórkach kory, natomiast w komórkach walca osiowego różnica w ekspresji genu *SIFER* nie były widoczna, b) ekspresja genu *SICHLN* była podwyższona w obydwu pulach wyizolowanych komórek, c) ekspresja genów *SINRAMP1* i *SINRAMP3* była obniżona w obydwu pulach komórek, d) ekspresja genu *SINRAMP2* była podwyższona w komórkach kory, a obniżona w komórkach walca osiowego. Uzyskane wyniki wskazują, że ekspresja genów *SIFER* i *SIIRT1* jest skorelowana z ekspresją genów metabolizmu etylenu, co wskazuje że w regulacji ich ekspresji w roślinach TR uczestniczy etylen. Ekspresja genów *SINRAMP1* i *SINRAMP3* była obniżona w roślinach TR, niezależnie od stężenia Zn w podłożu i analizowanej puli komórek. Natomiast ekspresja genu *SINRAMP2* w korzeniach roślin uprawianych w warunkach kontrolnych była podwyższona w komórkach kory, a obniżona w komórkach walca osiowego, natomiast w roślinach uprawianych w obecności podwyższonego stężenia Zn obniżona w komórkach kory, a podwyższona w komórkach walca osiowego. Również w

tkankach liści zaobserwowano, iż zmiany w ekspresji genów homeostazy metali oraz metabolizmu etylenu były różne, ze względu na analizowane pule zebranych komórek.

Podsumowując: Ekspresja $35S_p::AtHMA4$ wpływając na wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe stężenie Zn indukowała skoordynowaną, tkankowo-specyficzną odpowiedź genów związanych z metabolizmem etylenu oraz transportem metali. Modyfikacja ekspresji genów homeostazy metali w korzeniach najprawdopodobniej przyczyniła się do utrzymania stężenia Fe w pędach roślin TR na poziomie obserwowanym w roślinach TD.

Transgeniczne rośliny pomidora z ekspresją genu AhHMA4

Weremczuk A., **Barabasz A.**, Ruszczyńska A., Bulska E., Antosiewicz D.M. (2016) Determination of usefulness of $AhHMA4_p::AhHMA4$ expression in biofortification strategies. *Water, Air, & Soil Pollution* 227: 186

pub. 7 (wg spisu)

IF₂₀₁₆ = 1,702; IF_{5-letni} - 1,972; MNiSW₂₀₁₆ = 25; liczba cytowań (wg WoS) – 0

Wkład habilitanta –35% - współautorstwo koncepcji badań, współdziałal w: hodowli roślin, zbieraniu materiału roślinnego, przygotowaniu prób i analiza stężeń pierwiastków metodą ASA, analizie ekspresji.

Gen $AhHMA4$ z *A. halleri* koduje białko uczestniczące w transporcie Zn i Cd do pędów. Wyniki opisane w publikacji 2 wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego (**Barabasz i wsp., 2012, pub. 1 osiągnięcia**) nie uwzględniały badań dotyczących wpływu ekspresji genu $AhHMA4$ na akumulację Cd. Ponieważ akumulacja Cd w roślinach pomidora jest cechą niepożądaną należało sprawdzić, czy ekspresja $AhHMA4_p::AhHMA4$ modyfikuje akumulację tego toksycznego metalu. Pobieranie i translokacja Cd zależy od dostępności innych pierwiastków w podłożu, z tego powodu w przeprowadzonych doświadczeniach zastosowano dwa stężenia pożywki hydroponicznej (pożywka wyjściowa rozcieńczona 10 razy i 2 razy) oraz jedno niskie, nietoksyczne stężenie Cd (imitujące stężenie Cd w roztworze glebowym). Ekspresja $AhHMA4_p::AhHMA4$ nie spowodowała zmian w akumulacji Cd w roślinach TR rosnących w obydwu stężeniach pożywki. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły, że akumulacja Cd w pędach i korzeniach pomidora była wyższa w przy zastosowaniu pożywki bardziej rozcieńczonej. Obecność Cd spowodowała wzrost translokacji Zn w roślinach TR uprawianych w obydwu stężeniach pożywki. Zwiększona translokacja Zn miała również miejsce w roślinach TR uprawianych na pożywce bardziej rozcieńczonej bez dodatku Cd. Wyniki te sugerowały, że na glebach ubogich w składniki mineralne transgeniczne rośliny pomidora z ekspresją $AhHMA4_p::AhHMA4$ będą charakteryzowały się bardziej efektywną translokacją Zn do pędów. Doświadczenia glebowe wykazały, że rośliny TR uprawiane na glebie skażonej Cd charakteryzowały się wyższym stężeniem Zn w liściach, zarówno górnych jak i dolnych. Stężenie Zn w liściach roślinach TR uprawianych na glebie kontrolnej było na podobnym poziomie jak w roślinach TD. Nie zaobserwowano różnic w stężeniu Zn w owocach pomiędzy roślinami TR a TD uprawianymi na tej samej glebie. W roślinach TR uprawianych na glebie skażonej zaobserwowano niższe stężenie Cd niż w roślinach TD. Ekspresja $AhHMA4_p::AhHMA4$ miała również wpływ na ilość i masę zebranych owoców. Z roślin TR zebrano większą ilość owoców, a ich całkowita masa była większa (zarówno na glebie z Cd jak i bez Cd).

Podsumowując: Ekspresja $AhHMA4_p::AhHMA4$ w roślinach pomidora spowodowała wzrost stężenia Zn w liściach roślin uprawianych na glebie skażonej Cd. Nie skutkowało jednak wzrostem stężenia Zn w owocach roślin uprawianych na glebie kontrolnej jak również skażonej Cd. Rośliny z ekspresją $AhHMA4_p::AhHMA4$ charakteryzowały się zwiększonym plonowaniem w warunkach niedoboru Zn, także w obecności Cd w glebie, co wskazuje na ewentualną przydatność genu $AhHMA4_p::AhHMA4$ w biofortyfikacji.

Praca przeglądowa – konsekwencje nadekspresji genów homeostazy metali w roślinach

Antosiewicz D.M., **Barabasz A.**, Siemianowski O. (2014) Phenotypic and molecular consequences of overexpression of metal-homeostasis genes. *Frontiers in Plant Science* 5: 80

pub. 3 (wg spisu)

IF₂₀₁₄ - 3,948; IF_{5-letni} - 4,353; MNiSW₂₀₁₄ = 40; liczba cytowań (wg WoS) – 19 (15)

Wkład habilitanta – 25% - współautorstwo koncepcji publikacji

Transformacja roślin genami związanymi z homeostazą metali jest jedną z metod, stosowanych w celu uzyskania roślin o zwiększonej akumulacji/translokacji do pędów pożądaných pierwiastków. Wiele badań wskazuje jednak, że otrzymane rośliny często nie wykazują cech oczekiwanych przy ich wyprowadzaniu. Niniejsza praca jest pracą przeglądową, w której przedstawiono często zaniebdwany przez autorów badań wpływ ekspresji transgenu związanego z homeostazą metali na ekspresję genów endogennych. W pracy położono nacisk na wyniki badań wskazujące, że w roślinach TR dochodzi do modyfikacji ekspresji genów endogennych uczestniczących w regulacji homeostazy metali. Wykazano, że ekspresja wprowadzonego genu powodując zmiany w akumulacji/dystrybucji określonych metali na poziomie komórkowym i tkankowym, w rzeczywistości narusza stan równowagi związany z dystrybucją danego metalu jak i proporcjami pomiędzy różnymi metalami w kompartmentach komórkowych, a w konsekwencji prowadzi do zmian w ekspresji genów endogennych regulujących homeostazę metali. Ze względu na wzajemne oddziaływania transgenu z genami gospodarza, których ekspresja zależy od składu pożywki, zmiany w akumulacji/dystrybucji metali w roślinach TR w stosunku do roślin TD mogą przyjmować różny kierunek i nasilenie. Występujące różnice pomiędzy roślinami TR a TD mogą być przeoczone, ze względu na zastosowanie wąskiego zakresu stężeń metali w pożywce. Analiza ekspresji genów endogennych w uzyskanych roślinach transgeniczných może ponadto dostarczyć informacji o regulacji ekspresji poszczególnych genów.

Rola genów ZIP w akumulacji Zn w roślinach tytoniu

Poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za pobieranie i akumulację Zn przez rośliny rosnące w obecności wysokich stężeń Zn jest niezwykle ważne, zarówno ze względu na aspekt poznawczy jak i biotechnologiczny. Dotychczasowe badania wykazały, iż w liściach roślin tytoniu uprawianych w obecności wysokiego stężenia Zn ma miejsce niejednorodna akumulacja Zn, gdyż w obrębie blaszki liściowej można wyróżnić grupy komórek akumulują znacznie większe ilości Zn niż pozostałe komórki. Celem obecnie prowadzonych badań, w których uczestniczę, jest poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za wyżej wspomniane zjawisko. Opisane poniżej dwie prace przedstawiają pierwsze wyniki badań mających na celu poznanie procesów odpowiedzialnych za niejednorodną akumulację Zn.

Papierniak A., Kozak K., Kendziorek M., **Barabasz A.**, Palusińska M., Tiuryn J., Paterczyk B., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2018) Contribution of NtZIP1-Like to the Regulation of Zn Homeostasis. *Frontiers in Plant Science* 9: 185

pub. 8 (wg spisu)

IF₂₀₁₇ = 3,677; IF_{5-letni} - 4,353; MNiSW₂₀₁₇ = 40; liczba cytowań (wg WoS) – 3 (bez autocytowań 1)

Wkład habilitanta – 5% - pomoc przy zbieraniu materiału biologicznego, współdział w analizie ekspresji, wkład merytoryczny przy klonowaniu, przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA

W ramach prowadzonych badań zidentyfikowano geny z rodzin *ZIP*, *NRAMP*, *MTP* i *MRP* (ang. **M**ultidrug **R**esistance-associated **P**rotein), których ekspresja była zmieniona w liściach pod

wplywem toksycznego stężenia Zn w podłożu. Geny te kodują białka zaangażowane zarówno w transport metali do komórki, jak i w transport w poprzek wewnątrzkomórkowych błon biologicznych. Pośród zidentyfikowanych genów, których ekspresja uległa obniżeniu w liściach pod wpływem wysokiego stężenia Zn był *NtZIP1-like*. Gen ten został sklonowany. Białko przez niego kodowane lokalizuje się w błonie komórkowej i transportuje Zn do wnętrza komórki. Nie transportuje natomiast Fe i Cd. Gen *NtZIP1-like* w warunkach optymalnych ulegał ekspresji w korzeniach i liściach, a poziom jego mRNA w liściach wzrastał wraz z wiekiem roślin, co wskazuje że gen ten prawdopodobnie odgrywa podstawową rolę w homeostazie Zn, szczególnie w starszych roślinach. Deficyt Zn w podłożu powodował wzrost jego ekspresji w liściach oraz w części nasadowej korzeni. Ekspresji *NtZIP1-like* ulegała obniżeniu w obecności toksycznego, jak również wysokiego, lecz nietoksycznego stężenia Zn. Prawdopodobnie obniżenie jego ekspresji jest mechanizmem chroniącym komórki przez nadmierną akumulacją Zn w obecności wysokiego stężenia Zn w podłożu.

Podsumowując: Gen *NtZIP1-like* to drugi ze zidentyfikowanych genów ZIP, dla którego potwierdzono, że kodowane przez nie białko jest zaangażowane w pobieranie Zn przez komórki tytoniu. Wzrost jego ekspresji w warunkach deficytu Zn oraz obniżenie przy nadmiarze wskazuje, że kontrola pobierania Zn przez komórki tytoniu następuje m.in. poprzez regulację ekspresji tego genu.

Kozak K., Papierniak A., **Barabasz A.**, Kendziorek M., Palusińska M., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2019) NtZIP11, a new Zn transporter specifically upregulated in tobacco leaves by toxic Zn level. *Environmental and Experimental Botany* 157: 69-78

pub. 9 (wg spisu)

IF₂₀₁₇ = 3,666; IF_{5-letni} - 4,234; MNiSW₂₀₁₇ = 40; liczba cytowań (wg WoS) – 0

Wkład habilitanta – 5% - pomoc przy zbieraniu materiału biologicznego, współdziałal w przygotowaniu prób i analizie stężeń pierwiastków metodą ASA, współdziałal w analizie ekspresji.

Gen *NtZIP11* to drugi z genów ZIP, który został zidentyfikowany podczas realizacji badań mających na celu poznanie mechanizmów związanych z akumulacją Zn w grupach komórek miękiszu palisadowego akumulujących Zn w liściach roślin uprawianych w obecności toksycznego stężenia Zn. Podobnie jak pozostałe zidentyfikowane do tej pory geny ZIP z tytoniu, gen ten koduje lokalizujące się w plazmolemie białko transportujące Zn do wnętrza komórki. Analizy z wykorzystaniem drożdży nie wykazały aby białko przez niego kodowane transportowało Fe, Mn czy Cd. Ekspresja genu *NtZIP11* zachodziła we wszystkich analizowanych częściach rośliny i wzrastała wraz wiekiem roślin. Obecność w podłożu Zn o podwyższonym, lecz nietoksycznym stężeniu, indukowała ekspresję w liściach. Natomiast krótkoterminowy deficyt Zn nie powodował zmian w poziomie jego mRNA. Szczegółowa analiza ekspresji w liściach o różnych etapach rozwoju, zebranych z roślin traktowanych Zn o stężeniu 0,5 μM, 10 μM, 50 μM i 200 μM wykazała, że najwyższy poziom mRNA genu *NtZIP11* był obserwowany w starszych liściach roślin uprawianych w najwyższym stężeniu Zn.

Podsumowując: Uzyskane wyniki wskazują, że podstawową rolą białka NtZIP11 jest transport Zn do cytoplazmy komórek liści, szczególnie wówczas gdy rośliny rosną w obecności wysokiego stężenia Zn.

VI. Bibliografia

1. Antosiewicz D.M., **Barabasz A.**, Siemianowski O. (2014) Phenotypic and molecular consequences of overexpression of metal-homeostasis genes. *Frontiers in Plant Science* 5: 80
2. Assunção, A. G. L., Herrero, E., Lin, Y.-F., Huettel, B., Talukdar, S., Smaczniak, C., Immink R.G.H., van Eldik M., Fiers M., Schat H., Aarts M.G.M. (2010). Arabidopsis thaliana transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 10296-10301

3. Barabasz A., Krämer U., Hanikenne M., Rudzka J., Antosiewicz D.M. (2010) Metal accumulation in tobacco expressing *Arabidopsis halleri* metal hyperaccumulation gene depends on external supply. *Journal of Experimental Botany*, 61: 3057-67.
4. Barabasz A., Mills R.F., Trojanowska E., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2011) Expression of AtECA3 in tobacco modifies its responses to manganese, zinc and cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 202-209
5. Barabasz A., Wilkowska A., Ruszczyńska A., Bulska E., Hanikenne M., Czarny M., Krämer U., Antosiewicz D.M. (2012) Metal response of transgenic tomato plants expressing P1B-ATPase. *Physiologia Plantarum* 145: 315-331
6. Barabasz A., Wilkowska A., Tracz K., Ruszczyńska A., Bulska E., Mills R.F., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2013) Expression of HvHMA2 in tobacco modifies Zn-Fe-Cd homeostasis. *Journal of Plant Physiology* 170: 1176-1186
7. Barabasz A., Klimecka M., Kendziorek M., Weremczuk A., Ruszczyńska A., Bulska E., Antosiewicz D.M. (2016) The ratio of Zn and Cd supply as a determinant of metal-homeostasis gene expression in tobacco and its modulation by overexpressing the metal exporter AtHMA4. *Journal of Experimental Botany* 67: 6201-6214
8. Barabasz A., Palusińska M., Papierniak A., Kendziorek M., Kozak K., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2019) Functional analysis of *NtZIP4B* and Zn status-dependent expression pattern of tobacco ZIP genes. *Frontiers in Plant Science* 9: 1984
9. Bauer P., Thiel T., Klatte M., Zsolt Bereczky Z., Brumbarova T., Hell R., Grosse I. (2004) Analysis of sequence, map position, and gene expression reveals conserved essential genes for iron uptake in Arabidopsis and tomato. *Plant Physiology* 136: 4169-4183
10. Eide D., Broderius M., Fett J., Guerinot M.L. (1996) A novel iron-regulated transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 5624-5628
11. Grotz N., Fox T., Connolly E., Park W., Guerinot M.L., Eide D. (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from Arabidopsis that respond to zinc deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7220-7224
12. Hanikenne M., Talke I.N., Haydon M.J., Lanz C., Nolte A., Motte P., Kroymann J., Weigel D., Krämer U. (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of *HMA4*. *Nature* 453: 391-395
13. Hodoshima H., Enomoto Y., Shoji K., Shimada H., Goto F., Yoshihara T. (2007) Differential regulation of cadmium-inducible expression of iron-deficiency-responsive genes in tobacco and barley. *Physiologia Plantarum* 129: 622-634
14. Hussain D., Haydon M.J., Wang Y., Edwin Wong E., Sherson S.M., Young J., Camakaris J., Jeffrey F. Harper J.F., Christopher S. Cobbett C.S. (2004) P-Type ATPase Heavy Metal Transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 1327-1338
15. Ishimaru Y., Suzuki M., Kobayashi T., Takahashi M., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa N.K. (2005) OsZIP4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. *Journal of Experimental Botany* 56: 3207-3214
16. Kendziorek M., Barabasz A., Rudzka J., Tracz K., Mills R.F., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2014) Approach to engineer tomato by expression of AtHMA4 to enhance Zn in the aerial parts. *Journal of Plant Physiology*, 171: 1413-1422
17. Kendziorek M., Klimecka M., Barabasz A., Borg S., Rudzka J., Szczęsny P., Antosiewicz D.M. (2016) Engineering high Zn in tomato shoots through expression of AtHMA4 involves tissue-specific modification of endogenous genes. *BMC Genomics* 17: 625
18. Kobayashi T., Yoshihara T., Jiang T., Goto F., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa N.K. (2003) Combined deficiency of iron and other divalent cations mitigates the symptoms of iron deficiency in tobacco plants. *Physiologia Plantarum* 119: 400-408
19. Korshunova Y.O., Eide D., Clark W.G., Guerinot M.L., Pakrasi H.B. (1999) The IRT1 protein from Arabidopsis thaliana is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Molecular Biology* 40: 37-44

20. Kozak K., Papierniak A., **Barabasz A.**, Kendziorek M., Palusińska M., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2019) NtZIP11, a new Zn transporter specifically upregulated in tobacco leaves by toxic Zn level. *Environmental and Experimental Botany* 157: 69-78
21. Küpper H., Kochian L.V. (2009) Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). *New Phytologist* 185: 114-129
22. Li L., Cheng X., Ling H.-Q. (2004) Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene LeFRO1 in tomato. *Plant Molecular Biology* 54: 125-136
23. Lilay G.H., Castro P.H., Campilho A., Assunção A.G.L. (2019) The Arabidopsis bZIP19 and bZIP23 Activity Requires Zinc Deficiency – Insight on Regulation From Complementation Lines. *Frontiers in Plant Science* 9: 1955
24. Ling H.Q., Bauer P., Berezky Z., Keller B., Ganai M. (2002) The tomato fer gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13938-13943
25. López-Millán A.-F., Ellis D.R., Grusak M.A. (2004) Identification and characterization of several new members of the ZIP family of metal ion transporters in *Medicago Truncatula*. *Plant Molecular Biology* 54: 583-596
26. Mills R.F., Krijgen G.C., Baccarini B.J., Hall J.L., Williams L.E. (2003) Functional expression of AtHMA4, a P_{1B}ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb subclass. *The Plant Journal* 35: 164-176
27. Mills R.F., Francini A., daRocha P.S.C.F., Bacarini P.J., Aylett M., Krijger G.C., Williams L.E. (2005) The plant P-1B-type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Letters* 579: 783-791
28. Mills R.F., Doherty M.L., López-Marqués R.L., Weimar T., Dupree P., Palmgren M.G., Pittman J.K., Williams L.E. (2008) ECA3, a Golgi-localized P_{2A}-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in Arabidopsis. *Plant Physiology* 146: 116-128
29. Mills R.F., Peaston K.A., Runions J., Williams L.E. (2012) HvHMA2, a P1B-ATPase from barley, is highly conserved among cereals and functions in Zn and Cd transport. *PLOS One* 7: e42640
30. Milner M.J., Seamon J., Craft E., Kochian L.V. (2013) Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of Experimental Botany* 64: 369-381
31. Papierniak A., Kozak K., Kendziorek M., **Barabasz A.**, Palusińska M., Tiuryn J., Paterczyk B., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2018) Contribution of NtZIP1-Like to the Regulation of Zn Homeostasis. *Frontiers in Plant Science* 9: 185
32. Puig S., Peñarrubia L. (2009) Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 299-306
33. Ren N., Timko M.P. (2001) AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome* 44: 559-571
34. Rogers E.E., Eide D.J., Guerinot M.L. (2000) Altered selectivity in an Arabidopsis metal transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 12356-12360
35. Sano T., Yoshihara T., Handa K., Sato M.H., Nagata T., Hasezawa S. (2012) Metal ion homeostasis mediated by NRAMP transporters in plant cells-focused on increased resistance to iron and cadmium ion. In: Weigert R, ed. *Crosstalk and integration of membrane trafficking pathways*. Rijeka, Shanghai: INTECH, 214–228.
36. Shingu Y., Kudo T., Ohsato S., Kimura M., Ono Y., Yamaguchi I., Hamamoto H. (2005) Characterization of genes encoding metal tolerance proteins isolated from *Nicotiana glauca* and *Nicotiana tabacum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331: 675-680
37. Siemianowski O., Mills R.F., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2011) Expression of the P_{1B}- type ATPase AtHMA4 in tobacco modifies Zn and Cd root to shoot partitioning and metal tolerance. *Plant Biotechnology Journal* 9: 64-74
38. Siemianowski O., **Barabasz A.**, Weremczuk A., Ruszczynska A., Bulska E., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2013) Development of Zn-related necrosis in tobacco is enhanced by expressing AtHMA4 and depends on the apoplastic Zn levels. *Plant, Cell and Environment* 36: 1093-1104
39. Siemianowski O., **Barabasz A.**, Kendziorek M., Ruszczynska A., Bulska E., Williams L.E., Antosiewicz D.M. (2014) AtHMA4 expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1125-1139

40. Sierro N., van Oeveren J., van Eijk M.J.T., Martin F., Stormo K.E., Peitsch M.C., Ivanov N.V. (2013) Whole genome profiling physical map and ancestral annotation of tobacco Hicks Broadleaf. *The Plant Journal* 75: 880-889
41. Sinclair S.A., Senger T., Talke I.N., Cobbett C.S., Haydon M.J., Krämer U. (2019) Systemic Upregulation of MTP2- and HMA2-Mediated Zn Partitioning to the Shoot Supplements Local Zn Deficiency Responses. *The Plant Cell* 30: 2463-2479
42. Talke I.N., Hanikenne M., Krämer U. (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology* 142: 148-167
43. van de Mortel J.E., Villanueva I.A., Schat H., Schat K., Kwekkeboom J., Coughlan S., Moerland P.D., van Themaat E.V.L., Koornneef M., Aarts M.G.M. (2006) Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology* 142: 1127-1147
44. Verret F., Gravot A., Auroy P., Leonhardt N., David P., Nussaume L., Vavasseur A., Richaud P. (2004) Overexpression of *AtHMA4* enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Letters* 576: 306-312
45. Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F., Gaymard F., Guerinet M.L., Briat J.-F. Curie C. (2002) IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell* 14: 1223-1233
46. Weremczuk A., Barabasz A., Rusczyńska A., Bulska E., Antosiewicz D.M. (2016) Determination of usefulness of AhHMA4p1::AhHMA4 expression in biofortification strategies. *Water, Air, & Soil Pollution* 227: 186
47. Wintz H., Fox T., Wu Y.-Y., Feng V., Chen W., Chang H.-S., Zhu T., Vulpe C. (2003) Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* 48: 47644-47653
48. Wu D., Yamaji N., Yamane M., Kashino-Fujii M., Sato K., Ma J.F. (2016) The HvNramp5 mediate uptake of cadmium and manganese, but not iron. *Plant Physiology* 172: 1899-1910
49. Yoshihara T., Hodoshima H., Miyano Y., Shoji K., Shimada H., Goto F. (2006) Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. *Plant Cell Reports* 25: 365-373

VII. Wnioski o granty NCN złożone przez habilitanta, dla których nie uzyskano finansowanie

1. Konkurs HARMONIA – 09/2013 – „Analiza funkcji molekularnej i fizjologicznej wybranych genów ZIP z tytoniu zaangażowanych w homeostazę metali ciężkich”
2. Konkurs OPUS – 06/2014 – „Poszukiwanie funkcji tytoniowego białka ZIP2-like w kontekście mineralnego odżywiania roślin”
3. Konkurs OPUS – 12/2014 – „Poszukiwanie funkcji tytoniowego białka ZIP2 w kontekście mineralnego odżywiania roślin”
4. Konkurs MINIATURA – 08/2018 – „Identyfikacja metali transportowanych przez białko NtVTL”

Anna Barabasz