

# Zakład Molekularnych Podstaw Homeostazy Metali u Roślin

Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii, UW;

**Kierownik Zakładu:** Prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

Blok C, pok. 105; tel: +48-22-55 42 105; e-mail: dma@biol.uw.edu.pl

## **Skład osobowy:**

- Dr hab. Anna Barabas – adiunkt
- Dr Oskar Siemianowski – adiunkt
- Mgr Magdalena Pypka - doktorant
- Mgr inż. Katarzyna Kozak – doktorant
- Mgr Karolina Maślińska - doktorant
- Mgr Małgorzata Palusińska – doktorant
- Mgr Nina Adamek-Siwirykow – doktorant

## **Dydaktyka**

1. Bioremediacja środowiska (wykłady i ćwiczenia)
2. Monitoring organizmów genetycznie zmodyfikowanych (wykłady i ćwiczenia)
3. Biotechnologia Roślin (wykład połączony z ćwiczeniami)
4. Transformacja roślin (ćwiczenia, OGUN)
5. „GMO dla ochrony środowiska” – wykład monograficzny
6. Wstęp do biologii dla MSOŚ (wykład)
7. Ćwiczenia laboratoryjne z biologii – botanika (dla MSOŚ)

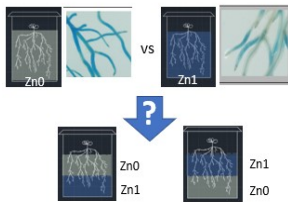
## **Aktualne projekty badawcze – abstrakty graficzne**

**Kierownik: dr Oskar Siemianowski**

Finansowanie SONATA 18

### **Odżywianie mineralne roślin i Zn/Fe-tropizm:**

- Molekularne i fizjologiczne podstawy integracji procesów pobierania i dystrybucji Zn w systemie korzeniowym



**Nowe metody hodowli roślin Przejroczysta Ziemia**  
żelowa pożywka umożliwiająca wzrost roślin w niejedolitym środowisku (np. z Zn lub bez Zn w „jednej doniczce”),

Przykładowe metody badawcze:

- GUS - analiza miejsce ekspresja transportów Zn,
- qPCR - badanie ekspresja genów związanych z transportem i dystrybucją Zn i Fe,
- Next Gen Seq., klonowanie, transformacje roślin
- Atomowa Spektroskopia Absorpcyjna - badanie składu mineralnego roślin,
- Mikroskopia rentgenowska i/lub badania z użyciem światła synchrotronowego (XANES/EXAFS) - mapowanie/lokalizacja pierwiastków w korzeniach,
- Mikroskopia konfokalna - lokalizacja Zn z użyciem fluoroforów lub białek fuzyjnych z GFP,
- Immunolokalizacja - np. badanie rozmieszczenia różnych peptydów w ścianie komórkowej.

- Jak rośliny znajdują pierwiastki w środowisku:
  - ✓ Zn-tropizm
  - ✓ Fe-tropizm

Przykładowe wyniki badania wzrostu korzeni *in situ*:



Wzrost w kierunku bez porów z wodą

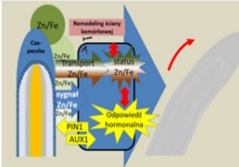
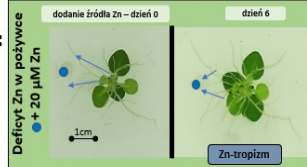
Wzrost kierunku z porów wodnym

Pierwszy kontakt z porów wodnym

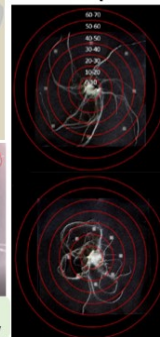
Drugi kontakt z porów wodnym

Dostosowanie kierunku wzrostu do obecności wody

Przykładowe wyniki i hipotetyczny mechanizm Zn/Fe-tropizmu



Jak korzenie znajdują wodę?





**Finansowanie – grant NCN - OPUS18**  
**Mechanizmy redystrybucji cynku z korzeni do pędów w warunkach deficytu cynku.**

**Kierownik dr hab. Anna Barabasz**

**Główne pytania badawcze:**

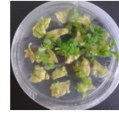
- Czy na skutek pojawienia się deficytu Zn w podłożu wzrasta efektywność transportu Zn z korzeni do pędów?
- Które białka uczestniczą z redystrybucji Zn ze starszych części korzeni do części młodszych korzeni oraz do pędów?
- Czy istnieją geny wczesnej i później odpowiedzi na deficyt Zn w podłożu?
- Które czynniki – egzo- (obniżenie stężenia Zn w podłożu) czy endogenne (obniżenie stężenia Zn w komórce) uruchamiają procesy związane z redystrybucją Zn z części starszych korzenia do części młodszych/rozwijających się?

**Stosowane metody i narzędzia badawcze:**

- hodowla roślin na pożywkach płynnych

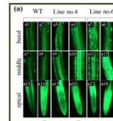


- klonowanie genów oraz otrzymywanie konstruktów do transformacji drożdży i roślin

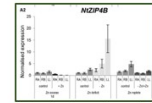


- transformacja roślin w celu uzyskania odpowiednich linii wykorzystywanych do analizy molekularnej i fizjologicznej funkcji wybranych genów

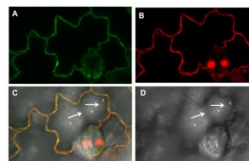
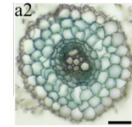
- analiza ekspresji genów – qPCR



- określenie stężenia pierwiastków w organach i tkankach (absorpcyjna spektrometria atomowa, związki fluorescencyjne)



- tkankowo-specyficzna analiza aktywności promotorów z wykorzystaniem białek reporterowych



- analiza komórkowej lokalizacji białek (ekspresja przejściowa, białka fuzyjne, mikroskopia fluorescencyjna/konfokalna)

**Tematyka badawcza Zakładu Molekularnych Podstaw Homeostazy Metali u Roślin:**

Badania wykonywane w Zakładzie mają na celu poznanie mechanizmów odpowiedzi roślin na obecność jonów metali w środowisku - mikroelementów (w tym cynk, żelazo, miedź), a także metali balastowych (np kadmu, którego obecność w żywności stanowi aktualnie poważny problem). Prowadzą, ogólnie mówiąc, do określenia procesów regulujących pobieranie, transport, akumulację, detoksykację i dystrybucję metali w tkankach i organach.

O znaczeniu naszych badań i otrzymanych wyników świadczy między innymi włączenie w 2021 roku kierownika Zakładu, prof. dr hab. Danuty Marii Antosiewicz, do grona najbardziej wpływowych naukowców na świecie (do tej pory tylko trzy osoby na Wydziale Biologii miały ten zaszczyt). Było to możliwe dzięki bardzo wysokiemu poziomowi naukowemu całego zespołu biorącego udział w pracach:

**Troje badaczy z Wydziału Biologii wśród 2% najbardziej wpływowych naukowców świata**



Prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz, prof. dr hab. Jerzy Dzik i prof. dr hab. Z. Maciej Gliwicz zostali zaliczeni do grona najbardziej wpływowych naukowców świata w kontekście całego dorobku naukowego. Gratulujemy!

Po raz trzeci ukazało się zestawienie 2% najbardziej wpływowych uczonych z całego świata reprezentujących wszystkie dziedziny nauki. Baza danych utworzona została na podstawie cytowań (oraz pokrewnych wskaźników) dorobku dostępnego w bazie Scopus i zawiera zestawienie w oparciu o dwie kategorie: całego dorobku naukowego oraz tylko jednego roku.

## Spis treści:

1. Zakres badań	s. 3
2. Prace dyplomowe (licencjackie i magisterskie)	s. 5
3. Prace doktorskie	s. 8
4. Publikacje	s. 9
5. Granty	s. 12

### ***Zakres badań – aktualności:***

Żelazo (Fe), mangan (Mn), miedź (Cu) i cynk (Zn) to mikroelementy niezbędne dla prawidłowego wzrostu rośliny. Zatem zarówno ich deficyt jak i zbyt wysokie stężenie w podłożu wpływa negatywnie na rozwój roślin. Wiadomo, że obecność metali balastowych, na przykład kadm (Cd), ołów (Pb) czy rtęć (Hg), wpływa na ich pobieranie ze środowiska.

U podłoża tej zależności leżą dwa kluczowe procesy: (1) transport transbłonowy metali balastowych odbywa się poprzez białka transportujące makro- i/lub mikroelementy (głównie Zn i Fe oraz Ca); (2) ścieżki molekularne i biochemiczne zaangażowane w regulację odpowiedzi rośliny na obecne w środowisku metale (balastowe oraz mikroelementy), mają wiele elementów wspólnych (tzw. „cross-homeostasis” – homeostaza krzyżowa). Pomimo postępującej wiedzy, mechanizmy odpowiedzialne za kontrolę pobierania z gleby pierwiastków pokarmowych i metali balastowych oraz dystrybucji w organach i tkankach wciąż są słabo poznane.

Dla poznania tych zależności konieczne jest prowadzenie szerokich badań nad procesami odbywającymi się w korzeniu. I tak, zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za formowanie struktury systemu korzeniowego wynikające z jego interakcji ze środowiskiem glebowym, będzie kluczem do selekcji i modyfikacji nowych odmian roślin o większym potencjale wzrostu, a także optymalnym składzie mineralnym.

Badania prowadzone w Zakładzie skupiają się na szeroko rozumianym poznaniu mechanizmów fizjologicznych i molekularnych odpowiedzialnych za regulację homeostazy Zn-Fe-Cd oraz oddziaływań obecności tych metali na kształtowanie systemu korzeniowego. W ostatnim czasie szczególnie nacisk położony jest na następujące aspekty tak szerokiego obszaru badawczego:

- 1) Jakie białka przenośnikowe, czynniki transkrypcyjne oraz związki niskocząsteczkowe uczestniczą w pobieraniu i dystrybucji Zn, Fe i Cd przez rośliny.
- 2) Jakie białka uczestniczą w redystrybucji Zn pomiędzy organami rośliny w warunkach deficytu Zn w podłożu?
- 3) Dlaczego w warunkach uprawy tytoniu na podłożu z wysokim stężeniem Zn objawy toksyczności widoczne są w pierwszej kolejności na liściach dolnych, a nie górnych?
- 4) Jakim zmianom podlega architektura systemu korzeniowego na skutek nierównomiernej dostępności mikroelementów w podłożu?
- 5) Jakie mechanizmy odpowiadają za chemotropizm Zn/Fe, czyli co sprawia, że korzenie poruszają się (rosną) w kierunku tych metali?
- 6) Dlaczego Cd, pierwiastek balastowy i jednocześnie toksyczny, jeżeli występuje w niskich stężeniach w podłożu powoduje zintensyfikowanie transportu Zn z korzeni do pędów?

W szerszym kontekście zdobyta wiedza ma doprowadzić do znalezienia rozwiązań poniższych problemów środowiskowych (**aspekt biotechnologiczny**):

- 1) Jak zwiększyć wydajność pobierania mikroelementów (Zn, Fe, Cu) w warunkach ich deficytu w podłożu?
- 2) Jak usprawnić transport Zn z korzeni do pędów, szczególnie w przypadku jego niskiej dostępności w środowisku? (przeciwdziałanie skutkom deficytu);
- 3) Jak zoptymalizować architekturę systemu korzeniowego aby zwiększyć efektywność pobierania mikroelementów w warunkach ich nierównomiernej dystrybucji w glebie?
- 4) Jak zahamować pobieranie Cd bez jednoczesnej redukcji pobierania pierwiastków pokarmowych, co prowadziłyby do ich deficytu w roślinie?
- 5) Jak poprawić jakość żywności pod względem zawartości metali, optymalizując ilość mikroelementów z jednoczesną eliminacją Cd (biofortyfikacja żywności pochodzenia roślinnego).
- 6) Jak zwiększyć pobieranie i akumulację Cd w wybranym gatunku rośliny, by użyć jej do usuwania nadmiaru Cd czy Zn z gleby (fitoremediacja gleb)?

**Materiałem do badań są rośliny tytoniu (*Nicotiana tabacum* v. *Xanthii*) – typu dzikiego (nietransgeniczne) oraz następujące transformanty:**

- z ekspresją genów kodujących białka odpowiedzialne za transport transbłonowy jonów metali:
  - Przenośnik typu ABC – AtMRP7 z *Arabidopsis thaliana*
  - P<sub>1B</sub>ATPazy (tzw, heavy-metal ATPazy): z *Arabidopsis thaliana* (*AtHMA4*); z *Arabidopsis hallerii* (*AhHMA4*); z *Hordeum vulgare* (*HvHMA2*);
  - P<sub>2A</sub>ATPaza z *Arabidopsis thaliana* (*AtECA3*).
- z ekspresją genów kodujących enzymy zaangażowane w syntezę związków odpowiedzialnych za proces detoksykacji metali w komórce,
  - syntaza fitochelatyn (PCS): z *Arabidopsis thaliana* (*AtPCS1*) oraz z *Caenorhabditis elegans* (*CePCS*). PCS to ostatni enzym ze szlaku biosyntezy fitochelatyn (PC
  - syntaza nikotianaminy (NAS) z *Arabidopsis hallerii* (*AhNAS2*). NAS katalizuje syntezę nikotianaminy [NA], niebiałkowego aminokwasu wiążącego jony metali (przypisywana rola m.in. w żywieniu mineralnym, utrzymywaniu homeostazy metali) (Douchkov i wsp. 2002. *Pl Soil* v. 241: 115-119)
- z obniżoną ekspresją (używając konstruktów RNAi) genów kodujących białka odpowiedzialne za transport transbłonowy jonów Zn i Cd
  - NtZIP4
  - NtZIP5
- z genem reporterowym GUS pod kontrolą promotorów genów kodujących białka odpowiedzialne za transport transbłonowy jonów Zn
  - NtZIP4B,
  - NtZIP5B,
  - NtZIP1-like,
  - NtZIP11,
  - NtMTP2
- **NOWOŚĆ:** Z ekspresją konstruktu CaMV35S::GCaMP3.  
GCaMP3 jest połączeniem modułu kalmodulinowego (CaM) który odpowiada za detekcję wapnia i fal wapniowych z eGFP i kinazą lekkołańcuchowej miozyny (M13). Białko to w sposób odwracalny sygnalizuje obecność wapnia i pozwala na śledzenie w czasie rzeczywistym sygnałów wapniowych w tkankach korzeni i liści (deFalco et al. 2017). Rośliny takie są używane do badania sygnalingu wapniowego

Stosowane układy doświadczalne z wykorzystaniem roślin transgenicznych i typu dzikiego dotyczą zarówno badań podstawowych (poznanie mechanizmów leżących u podłoża zjawiska homeostazy krzyżowej oraz tolerancji roślin na jony metali) jak i aplikacyjnych (biotechnologia roślin - modyfikacja składu mineralnego).

### Stosowane metody:

Zależnie od aktualnie rozwiązywanego problemu, prace prowadzone są z zastosowaniem różnorodnych metod - na poziomie molekularnym, komórkowym i organizmu, *w tym między innymi:*

- klonowanie genów homeostazy metali tytoniu, badania nad ich funkcją w roślinie
- analiza poziomu ekspresji genów metodą Real-Time PCR oraz analizy transformantów z ekspresją wybranego białka reporterowego pod promotorem badanego genu,
- analiza funkcji genów poprzez wyciszanie (RNAi; CRISP/Cas9);
- ocena lokalizacji białek kodowanych przez badane geny (m.in. metodą ekspresji przejściowej białka fuzyjnego z GFP),
- identyfikacja substratów (metali) przenoszonych przez sklonowane transportery (badania z wykorzystaniem ekspresyjnych systemów drożdżowych)
- analizy biochemiczne z użyciem HPLC (np. związki tiolowe, aminokwasy),
- badanie poziomu metali w tkankach:
  - spektrometria absorpcji atomowej,
  - metody mikroskopii elektronowej z absorpcją/rospraszaniem rentgenowskiego
  - fluorescencja rentgenowska (plany projektu w ramach Synchrotronu Solaris)
  - ablacji laserowa połączona ze spektrometrią mas plazmy indukcyjnie sprzężonej
- metody oparte na badaniach izolowanych protoplastów i wakuol,
- transformacja roślin,
- metody cytologiczne (mikroskopia świetlna z konfokalną i elektronowa),
- metody fizjologii roślin (np. analizy aktywności enzymów, poziomu metabolitów z zastosowaniem m.in spektrofotometru),
- doświadczenia oparte na hodowlach roślin hydroponicznych i doniczkowych.
- Doświadczenia z obserwacją wzrostu roślin w czasie rzeczywistym - obrazowanie (raspberry PI), platformy mikrofluidowe, przezroczysta ziemia...

### *Prace dyplomowe: licencjackie i magisterskie*

#### **DLA kierunków: biologia, biotechnologia, ochrona środowiska**

Ze względu na zróżnicowanie tematów i stosowanych metod, prace licencjackie i magisterskie, które zawsze są częścią aktualnie prowadzonych badań, mogą wykonywać studenci wszystkich specjalności. Charakter pracy, tematyka, metodologia są dostosowane z jednej strony do zainteresowań i potrzeb studenta, zaś z drugiej do aktualnie prowadzonych badań. Prace licencjackie mogą mieć charakter zarówno teoretyczny jak i eksperymentalny.

### **AKTUALNOŚCI - 2023**

#### **Informacje dla chętnych do wykonywania prac dyplomowych:**

**Prace licencjackie i magisterskie są częścią badań wykonywanych w ramach prowadzonych projektów badawczych (lista aktualnych projektów na dole), przy czym prace licencjackie mogą być teoretyczne lub doświadczalne.**

Osoby zainteresowane wykonywaniem pracy w Zakładzie Molekularnych Podstaw Homeostazy Metali proszone są o kontakt z jedną z osób wymienionych poniżej

prof. dr hab. Maria Antosiewicz : email: [d.antosiewicz@uw.edu.pl](mailto:d.antosiewicz@uw.edu.pl)

dr hab. Anna Barabasz: email: [a.barabasz@uw.edu.pl](mailto:a.barabasz@uw.edu.pl),

dr Oskar Siemianowski: email: [o.siemianowski@uw.edu.pl](mailto:o.siemianowski@uw.edu.pl)

tel. wewn. 42-105, pokój 105 blok C, I piętro

Prace dyplomowe będą koncentrowały się na identyfikacji mechanizmów regulacji transportu cynku, żelaza i kadmu z korzenia do pędu (molekularnych, biochemicznych, fizjologicznych) w powiązaniu z procesami pobierania oraz regulacji dystrybucji tych pierwiastków w organach, tkankach i komórkach.

Ważnym elementem badań jest poznanie wspólnych mechanizmów regulacji pobierania, akumulacji i tolerancji na metale (Cd-Zn-Fe) (mechanizmów tzw. homeostazy krzyżowej - "cross-homeostasis" ) dla tych trzech elementów. Procesy te odpowiadają m.in. za obserwowaną u roślin wysoką lub niską zdolność do akumulacji toksycznych metali balastowych w obecności niskiego lub wysokiego zaopatrzenia w pierwiastki pokarmowe. Zatem znajomość mechanizmów molekularnych dostarcza narzędzi do regulacji tych procesów - dla potrzeb biotechnologii. Prowadzone prace mają także na celu poznanie mechanizmów generowania fenotypu roślin transformowanych - udziale w tym procesie specyficznej regulacji ekspresji genów endogennych rośliny-gospodarza.

Badania będą obejmowały różne aspekty regulacji gospodarki metalami w roślinie przy zastosowaniu wcześniej wymienionych metod (biologii molekularnej, fizjologii, biochemii, cytologii, histochemii).

W planie są także prace z zastosowaniem techniki "re-grafting" roślin tytoniu o różnym tle genetycznym (typu dzikiego oraz transformantów) w celu identyfikacji sygnałów korzeń-pęd ważnych dla regulacji mechanizmów odpowiedzi na Zn/Fe/Cd oraz badania mechanizmów odpowiadających z rozwój systemu korzeniowego w różnych warunkach mineralnych środowiska

Badania prowadzone są na tytoniu, typie dzikim oraz roślinach transformowanych różnymi genami biorącymi udział w transporcie transbłonowym jonów metali oraz w procesach kompleksowania metali a także pozwalających śledzić sygnały wapniowe (więcej informacji o transformantach powyżej, przy opisie tematyki grupy badawczej)

Aspekt aplikacyjny to zastosowanie genetycznych modyfikacji roślin w biotechnologii dla celów regulacji akumulacji metali w wybranych częściach roślin. Jednym z aspektów praktycznych jest generowanie roślin dla potrzeb fitoremediacji (usuwania skażeń z gleby i wody przy pomocy roślin)

**W ramach prac licencjackich (oraz w wersji rozszerzonej prac magisterskich) możliwe jest rozpoczęcie w 2023/2024 roku realizacji następujących tematów:**

**Prace licencjackie (teoretyczne):**

1. Mechanizmy odpowiedzialne za poziom akumulacji toksycznych metali balastowych (np Cd, Pb, Hg) oraz mikroelementów w organach roślin.
2. Przenośniki transbłonowe kadmu i mikroelementów.
3. Stosowanie białek reporterowych w analizie ekspresji tkankowo- i komórkowo-specyficznej.

4. Czy wegetarianie są bardziej narażeni na rozwój chorób indukowanych obecnością Cd ?
5. Dlaczego nie wszystkie rośliny są zdolne do akumulacji wysokich stężeń Cd, Zn czy Fe ?
6. Modyfikacje genetyczne dla poprawy składu mineralnego rośliny (biofortyfikacja).
7. Modyfikacje metabolizmu ściany komórkowej warunkujące tolerancję na Zn/Cd.
8. Fitoremediacja –postępy w rozwoju technologii.
9. Procesy sygnałowe w ścianie komórkowej w odpowiedzi na Zn/Cd.
10. Wybrane zagadnienia z metod stosowanych w doświadczeniach (z zakresu biochemii i biologii molekularnej).
11. Jak rośliny wykrywają stężenie metali w glebie – receptory, transportery transreceptory...

#### **12. Inne tematy do wyboru z zakresu prowadzonych badań**

#### **Prace eksperymentalne (prace licencjackie i magisterskie w wersji rozszerzonej):**

1. Ekspresja tkankowo-specyficzna wybranych genów kodujących transportery metali metodą oceny ekspresji białka reporterowego GUS.
2. Technika przeszczepów (re-grafting) w badaniu roli korzenia w akumulacji Cd i Zn w pędzie.
3. Molekularne mechanizmy różnicujące pojedyncze komórki w tkance pod względem akumulacji metali.
4. Hormesis – czyli „podstępne” stymulujące działanie niskich dawek Cd na procesy życiowe.
5. Przydatność różnych gatunków tytoniu do fitoremediacji gleb zanieczyszczonych Cd;
6. Rola genów ZIP w pobieraniu i akumulacji Cd i homeostazie krzyżowej z mikroelementami;
7. Ocena przydatności różnych gatunków tytoniu dla celów fitoremediacji.
8. Mechanizmy odpowiedzialne za ruch (wzrost) korzeni w kierunku dostępnego Zn/Fe (Zn-tropizm lub Fe-tropizm)
9. Homeostaza Zn w warunkach nierównomiernego dostępu tego mikroelementu w pożywce – badania z wykorzystaniem przezroczystej ziemi.
10. Wpływ Fe na redystrybucję Zn z korzeni do pędów w warunkach deficytu Zn

#### **11. Inne tematy do wyboru z zakresu prowadzonych badań**

#### ***Przykłady wykonanych prac licencjackich:***

Paweł Mikulski „*Badanie regulacji ekspresji AhHMA4 w transgenicznym pomidorze w warunkach zmiennego stężenia cynku w pożywce*”

Izabela Szczupakowska "Rośliny transgeniczne w fitoremediacji"

Karolina Baran "Ocena przydatności transformacji tytoniu (*Nicotiana tabacum*) genem *StHISAG* dla zwiększenia tolerancji na nikiel i jego akumulacji"

Anna Sakławska " *Analiza segregacji transgenu w pokoleniu F1 roślin pomidora z ekspresją AtMRP7*".

Kamila Panuś „*Kadm - problem współczesnego świata*”

Gabriela Pavlova „*Analiza transgenicznych roślin tytoniu wyrażających konstrukt RNAi-NtZIP4*”

Magdalena Pypka „*Analiza ekspresji genu reporterowego DsRed pod kontrolą promotorów genów NtZIP4B oraz NtZIP5B*”

### **Przykłady wykonanych prac magisterskich:**

- Marcin Draniak "Rola stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w podłożu w regulacji reakcji na ołów kontrolnej i zmutowanej linii pomidora (*Lycopersicon esculentum*).
- Sylwia Wojas "Zależność stopnia toksyczności jonów kadmu i ołowiu od składu pożywki dla *Nicotiana tabacum* var. *Burley LA21* z nadekspresją *LCT1*"
- Maciej Kazimierski "Rola genów *AtPCS1* i *CePCS1* w tolerancji roślin na jony ołowiu"
- Oskar Siemianowski „Charakterystyka modyfikowanego genetycznie tytoniu pod względem przydatności do oczyszczania gleb z metali ciężkich”
- Ewa Trojanowska "Wpływ transformacji genem *AtECA3* na akumulację i dystrybucję cynku i manganu w roślinach tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.)".
- Aleksandra Weremczuk „Poszukiwanie wspólnych ścieżek regulacji homeostazy krzyżowej (ang. *Cross-homeostasis*) Zn-Fe-Cd w roślinach pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.)”
- Karolina Myślińska „Tkankowo-specyficzna ekspresja genu *NtZIP1-like* w tytoniu w warunkach różnego stężenia Zn w pożywce”;
- Aleksander Celejowski „Akumulacja cynku i kadmu w roślinach *Nicotiana tabacum* odm. *Xanthi* oraz ekspresja wybranych genów w blaszkach liściowych”;
- Diana Davydenko „Regulacja ekspresja genów kodujących transportery Zn, w systemie korzeniowym rosnącym w środowisku z niejednorodnym dostępem do Zn”

### **Prace doktorskie:**

#### **Prace doktorskie w trakcie wykonywania:**

- (1) mgr Katarzyna Kozak: " Rola *NtZIP11* i *NtNramp3* w akumulacji Zn w liściach tytoniu " Zakończzone studia doktoranckie. Obrona w 2023 roku.  
Opublikowanych dziewięć prac naukowych.
- (2) mgr Małgorzata Palusińska: " Rola genu *NtZIP5* w regulacji translokacji Zn i Cd z korzenia do pędu roślin tytoniu (*Nicotiana tabacum*)" VI rok studiów doktoranckich. Obrona w 2023 roku.  
Opublikowanych siedem prac naukowych.
- (3) mgr Karolina Maślińska: " Rola genu *NtZIP4* z tytoniu w regulacji homeostazy krzyżowej Zn/Cd” IV rok studiów doktoranckich  
Opublikowane trzy prace naukowe.
- (4) Nina Adamek-Siwirykow: „Mechanizmy redystrybucji Zn w warunkach deficytu cynku w podłożu”. III rok studiów doktoranckich  
Opublikowana jedna praca naukowa
- (5) Magdalena Pypka „Badanie mechanizmów odpowiedzialnych za modyfikacje kierunku wzrostu korzeni tytoniu w sytuacji heterologicznej dystrybucji, osobno Zn i Fe w środowisku” I rok studiów doktoranckich  
Pierwsza publikacja w przygotowaniu.



### **Prace doktorskie ostatnio zakończone:**

(1) mgr Katarzyna Tracz: " Rola nikotianaminy w utrzymaniu homeostazy jonów metali w roślinie"  
*Obrona:* czerwiec 2020 r. Recenzje z wyróżnieniem

- Odbyty staż w University of Bayreuth w ramach STSM - COST Action 0905.
- Opublikowane dwie prace naukowe
- Otrzymane stypendium (z dotacji podmiotowej) dla najlepszych doktorantów na rok 2012/2013 oraz 2013/2014

(2) mgr Aleksandra Weremczuk: " Mechanizm formowania się nekroz z komórek akumulujących Zn w liściach tytoniu z uwzględnieniem roli apoplastu w tym procesie"

*Obrona:* maj 2019 r. Recenzje z wyróżnieniem

- Udział w "School of Plant metallomics" w University of Copenhagen.
  - Opublikowane cztery prace naukowe,
  - Otrzymany grant NCN – PRELUDIUM, dla młodego naukowca (kierownik projektu): „Rola receptorów WAKs (Wall-Associated Kinases) w percepcji zależnego od stopnia estryfikacji pektyn sygnału o poziomie Zn w apoplaście”.
- Otrzymany grant ETIUDA (kierownik projektu):

### **Publikacje:**

- Kozak Katarzyna, Antosiewicz Danuta Maria. 2023. Tobacco as an efficient metal accumulator. *Biometals*, 36: 351-370.
- Kozak K, Papierniak-Wygladala A, Palusińska M, Barabasz A and Antosiewicz DM. 2022. Regulation and function of metal uptake transporter NtNRAMP3 in tobacco. *Frontiers in Plant Science*, 13; 867967.
- Maślińska-Gromadka K, Barabasz A, Palusińska M, Kozak K and Antosiewicz DM. 2021. Suppression of NtZIP4A/B changes Zn and Cd root-to-shoot translocation in a Zn/Cd status-dependent manner. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (10): 5355.
- Lind, K.R., Siemianowski, O., Yuan, B., Sizmur, T., VanEvery, H., Banerjee, S. and Cademartiri, L., 2021. Evidence for root adaptation to a spatially discontinuous water availability in the absence of external water potential gradients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118 (1)
- Papierniak-Wygladala A, Kozak K, Barabasz A, Palusińska M, Całka M, Maślińska K and Antosiewicz DM. 2020. Identification and characterization of a tobacco metal tolerance protein, NtMTP2. *Metallomics*, 12; 2049-2064.
- Weremczuk A, Papierniak A, Kozak K, Willats WGT and Antosiewicz DM. 2020. Contribution of NtZIP1-like, NtZIP11 and a WAK-pectin based mechanism to the formation of Zn-related lesions in tobacco leaves. *Environmental and Experimental Botany*. 176: 104074.
- Palusińska M, Barabasz A, Kozak K, Papierniak A, Maślińska K and Antosiewicz DM. 2020. Zn/Cd status-dependent accumulation of Zn and Cd in root parts in tobacco is accompanied by specific expression of ZIP genes. *BMC Plant Biology*. 20: 37.
- Barabasz A, Palusińska M, Papierniak A, Kendziorek M, Kozak K, Williams LE and Antosiewicz DM. 2019. Functional analysis of NtZIP4B and Zn status-dependent expression pattern of tobacco ZIP genes. *Frontiers in Plant Science* 9: 198.

- Kozak K, Papierniak A, Barabasz A, Kendziorek M, Palusińska M, Williams LE and Antosiewicz DM. 2019. NtZIP11, a new Zn transporter specifically upregulated in tobacco leaves by toxic Zn level. *Environmental and Experimental Botany*, 157: 69-78
- Ma, L., Shi, Y., Siemianowski, O., Yuan, B., Egner, T.K., Mirnezami, S.V., Lind, K.R., Ganapathysubramanian, B., Venditti, V. and Cademartiri, L., 2019. Hydrogel-based transparent soils for root phenotyping in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(22), pp.11063-11068
- Papierniak A, Kozak K, Kendziorek M, Barabasz A, Palusińska M, Tiuryn J, Paterczyk B, Williams LE, Antosiewicz D.M. 2018. Contribution of NtZIP1-Like to the regulation of Zn homeostasis. *Frontiers in Plant Science* 9: 185.
- Weremczuk A, Ruszczyńska A, Bulska E and Antosiewicz DM. 2017. NO-dependent programmed cell death is involved in the formation of Zn-related lesions in tobacco leaves”, *Metallomics*, 9: 924-935.
- Barabasz A, Klimecka M, Kendziorek M, Weremczuk A, Ruszczyńska A, Bulska E and Antosiewicz D.M. 2016. The ratio of Zn to 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 (21): 6201-6214.
- Kendziorek M, Klimecka M, Barabasz A, Borg S, Rudzka J, Szczęsny P and Antosiewicz DM. 2016. Engineering high Zn in tomato shoots through expression of *AtHMA4* involves tissue-specific modification of endogenous genes. *BMC Genomics*, 17:625, DOI 10.1186/s12864-016-2990-x (open access).
- Weremczuk A, Barabasz A, Ruszczyńska A, Bulska E and Antosiewicz D.M. 2016. Determination the usefulness of *AhHMA4p1::AhHMA4* expression in biofortification strategies. *Water, Air and Soil Pollution*, 227 (186): 1-18.
- Brama K, Tracz K, Antosiewicz DM, Pawlak K. 2015. Analiza kompleksów nikotianaminy z wybranymi metalami za pomocą HILIC ESI MS/MS. *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, tom XXXV : 245-254.
- Kendziorek M, Barabasz A, Rudzka J, Tracz K, Mills RF, Williams LE and Antosiewicz DM. 2014. Approach to engineer tomato by expression of *AtHMA4* to enhance Zn in the aerial parts. *Journal of Plant Physiology*, 171(15):1413-1422.
- Antosiewicz DM, Barabasz A, Siemianowski O. 2014. Phenotypic and molecular consequences of overexpression of metal-homeostasis genes. *Frontiers in Plant Science*, 5: art 80. Doi: 10.3389/fpls.2014.00080.
- Siemianowski O, Barabasz A, Kendziorek M, Ruszczyńska A, Bulska E, Williams LE and Antosiewicz DM. 2014. *AtHMA4* expression in tobacco reduces Cd accumulation due to the induction of the apoplastic barrier. *Journal of Experimental Botany*, 65 1125-1139
- Barabasz A, Wilkowska A, Tracz K, Ruszczyńska A, Bulska E, Mills RF, Williams LE and Antosiewicz DM. 2013. Expression of HvHMA2 in tobacco modifies Zn-Fe-Cd homeostasis. *Journal of Plant Physiology*, 170: 1176-1186.
- Siemianowski O, Barabasz A, Weremczuk A, Ruszczyńska A, Bulska E, Williams LE and Antosiewicz DM. 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.
- Barabasz A; Wilkowska A; Ruszczyńska A; Bulska E; Hanikenne M; Czarny M; Krämer U and Antosiewicz DM. 2012. Metal response of transgenic tomato plants expressing P1B-ATPase. *Physiologia Plantarum*, 145: 315-331.
- Barabasz A, Mills RF, Trojanowska E, Williams LE and Antosiewicz DM. 2011. Expression of *AtECA3* in tobacco modifies its responses to manganese, zinc and calcium. *Environmental and Experimental Botany*, 72: 202-209.
- Siemianowski O, Mills RF, Williams LE, Antosiewicz DM. 2011. Expression of the P<sub>1B</sub>-type ATPase *AtHMA4* in tobacco modifies Zn and Cd root to shoot partitioning and metal tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 9: 64-74.

- Barabasz A, Krämer U, Hanikenne M, Rudzka J, and Antosiewicz DM. 2010. Metal accumulation in tobacco expressing *Arabidopsis halleri* metal hyperaccumulation gene depends on external supply. *Journal of Experimental Botany*, 61 : 3057-3067.
- Wojas S, Ruszczyńska A, Bulska E, Clemens S and Antosiewicz DM. 2010. The role of subcellular distribution of cadmium and phytochelatins in the generation of distinct phenotypes of AtPCS1- and CePCS-expressing tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 167: 981-988.
- Wojas S, Clemens S, Skłodowska A, and Antosiewicz DM. 2010. Arsenic response of AtPCS1- and CePCS- expressing plants - effects of external As(V) concentration on As-accumulation pattern and NPT metabolism. *Journal of Plant Physiology*, 167: 169-175.
- Zabłudowska E, Kowalska J, Jedynak Ł, Wojas S, Skłodowska A and Antosiewicz DM. 2009. Search for a plant phytoremediation - what can we learn from field and hydroponic studies? *Chemosphere*, 77: 301-307.
- Verkleij JAC, Golan-Goldhirsh A, Antosiewicz DM, Schwitzguébel J-P and Schröder P. 2009. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts, *Environmental and Experimental Botany*, 67: 10-22 .
- Wojas S, Hennig J, Plaza S, Geisler M, Siemianowski O, Skłodowska A, Ruszczyńska A, Bulska E and Antosiewicz DM. 2009. Ectopic expression of Arabidopsis ABC transporter MRP7 modifies cadmium root-to-shoot transport and accumulation. *Environmental Pollution*, 157: 2781-2789
- Wojas S, Clemens S, Hennig J, Skłodowska A, Kopera E, Schat H, Bal W, and Antosiewicz DM, 2008.: Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of *AtPCS1* and *CePCS* genes on plant response to cadmium. *Journal of Experimental Botany*, v.59: 2205-2219.
- A. Barabasz, S. Wojas, E. Dybek and D. M. Antosiewicz. 2008. Przydatność roślin zmodyfikowanych genetycznie dla celów fitoekstrakcji i fitoewaporacji. *Biotechnologia*, 2: 68-83.
- Antosiewicz DM, Escude-Duran C, Wierzbowska E, Skłodowska A, 2008. Indigenous plant species with the potential for the phytoremediation of arsenic and metals contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 193: 197-210.
- Antosiewicz DM, A.Sirko, P.Sowiński. 2008. Trace elements transport in plants. In: (ed) M.N.V.Prasad, "Trace elements: nutritional benefits, environmental contamination and health implications". J.Wiley & Sons, New Jersey USA. pp.413-448
- Wojas S, Ruszczyńska A, Bulska E, Wojciechowski M and Antosiewicz DM. 2007. Ca<sup>2+</sup>-dependent plant response to Pb<sup>2+</sup> is regulated by *LCT1*. *Environmental Pollution*, 147: 584-592.
- Antosiewicz DM, 2005. Study of Ca-dependent Pb-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance, *Environmental Pollution*, 134: 23-34.
- Antosiewicz DM, Hennig J. 2004. Overexpression of LCT1 in tobacco enhances the protective action of calcium against cadmium toxicity, *Environmental Pollution* 129: 237-245
- Antosiewicz DM and Wierzbicka M, 1999. Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy, *J. Microscopy*, 195:139--146. (1999).
- Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schachtman DP. and Schroeder JI. 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 95: 12043-12048.
- Antosiewicz DM, Purugganan MM, Polisensky DH, and Braam J. 1997. Cellular localization of *Arabidopsis* XET-related proteins during development and after wind stimulation, *Plant Physiol.*115: 1319-1328.
- Braam J, Sistrunk ML, Polisensky DH, Xu W, Purugganan MM, Antosiewicz DM, Campbell P, Johnson K. 1997. Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the *Arabidopsis* TCH genes. *Planta*, 203: 35-41.

- Antosiewicz DM, Polisensky DH. and Braam J. 1995. Cellular localization of the Ca<sup>+2</sup>-binding TCH3 protein of *Arabidopsis*, *Plant Journal*, 8:623-636.
- Antosiewicz DM. 1995. The relationship between constitutional and inducible Pb-tolerance and tolerance to mineral deficits in *Biscutella laevigata* and *Silene inflata*, *Environmental and Experimental Botany*, v. 35:55-69.
- Sistrunk ML, Antosiewicz DM, Purugganan M, and Braam J. 1994. *Arabidopsis* TCH3 encodes a novel Ca<sup>+2</sup>-binding protein and shows environmentally induced and tissue-specific regulation, *Plant Cell*, v.6:1553-1565.

## **Finansowanie badań:**

### **Aktualnie:**

#### **1. Projekt NCN SONATA: Badanie mechanizmów odpowiedzialnych za modyfikacje kierunku wzrostu korzeni tytoniu w sytuacji heterologicznej dystrybucji, osobno Zn i Fe w środowisku [2021-2025]**

##### ***Cel prowadzonych badań / hipoteza badawcza***

Rośliny prowadzą osiadły tryb życia i w celu przetrwania kierują swój wzrost zgodnie z sygnałami płynącymi ze środowiska (np. światło, grawitacja, woda, składniki odżywcze). Zjawisko „ruchów” roślin w kierunku stymulanta nazywa się tropizmem. Rośliny potrafią dostosować swoją reakcję na dane bodźce w sytuacjach, gdy ich potrzeby nie są w pełni zaspokojone.

Celem projektu jest identyfikacja mechanizmów molekularnych i fizjologicznych regulujących ukierunkowany wzrost korzeni zależny od stężenia Zn w podłożu (ang. Zn chemotropizm).

##### ***Metodyka badań***

Badania są prowadzone na modelowej roślinie - tytoniu *Nicotiana tabacum*.

Stosowane metody: (1) analiza architektury korzeni (struktura przestrzenna); (2)

Sekwencjonowanie nowej generacji; (3) identyfikacja kluczowych genów; klonowanie; poznanie funkcji (metodyka zależna od postawionego pytania); (4) wyciszanie wybranych genów; (5) analizy ekspresji genów; (5) poznanie udziału komponentów ściany komórkowej w procesach sygnałowych warunkujących detekcję poziomu Zn i indukcje procesów sygnałowych; (6) analizy struktury ściany komórkowej [Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE SEM); Transmission EM (TEM); Energy Dispersive X-ray MicroAnalysis (EDXMA)]; (7) inne – zależnie od potrzeb.

kierownik badań – dr Oskar Siemianowski

#### **2. Projekt NCN OPUS 18: Mechanizmy redystrybucji cynku z korzeni do pędów w warunkach deficytu cynku, [2020-2024]**

##### ***Cel prowadzonych badań / hipoteza badawcza***

Deficyt Zn w glebie prowadzi do ograniczenia wzrostu roślin, zatem plonowania i zawartości tego mikroelementu w żywności pochodzenia roślinnego. Przyczynia się także do rozwoju wielu chorób u ludzi. Zaplanowane badania mają na celu poznanie mechanizmów regulujących zaopatrzenie części nadziemnych roślin w Zn, szczególnie u roślin rosnących w deficycie tego mikroelementu.

W ramach projektu zostaną wykonane eksperymenty weryfikujące hipotezę o odmiennej roli części korzenia (apikalnej, środkowej i nasadowej) w regulacji dystrybucji pobranego Zn pomiędzy korzeniem i pędem (w tym w procesach akumulacji nadmiaru Zn) oraz w redystrybucji z miejsc magazynowania i przekazywaniu do pędu w trakcie wzrostu na podłożu ubogim w ten mikroelement. Ważnym aspektem prac będzie identyfikacja szeregu genów zaangażowanych w te procesy (głównie kodujące białka transportujące Zn do/z wakuol oraz do/poza komórkę).

##### ***Metodyka badań***

Badania są prowadzone na modelowej roślinie - tytoniu *Nicotiana tabacum*.

Metodyka: (1) określanie stężenia metali w tkankach (mineralizacja, spektrometria absorpcji atomowej); (2) identyfikacja tkankowo-specyficznych miejsc lokalizacji Zn (Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry - LA-ICP-MS); (3) identyfikacja genów zaangażowanych w regulację translokacji Zn z korzenia do pędu (sekwencjonowanie RNAseq; RealTime PCR w czasie rzeczywistym); (4) klonowanie wybranych genów; (5) identyfikacja lokalizacji subkomórkowej białek kodowanych przez wybrane geny oraz tkankowo-specyficznej ekspresji (utworzenie konstruktów fuzyjnych z genem reporterowym GUS oraz analiza wygenerowanych roślin transgenicznnych); (6) wyciszenie wybranych genów i analiza fenotypu mutantów pod kątem zmienionego wzoru translokacji Zn z korzenia do pędu (CRISP/Cas9);  
kierownik badań – dr hab. Anna Barabasz

### **Granty zakończone w ostatnich latach:**

#### **1. Projekt NCN OPUS 8: Molekularne podstawy zmian translokacji Zn do pędu pod wpływem Cd”, [2015-2021]**

##### ***Cel prowadzonych badań / hipoteza badawcza***

Kontrola translokacji metali z korzenia do pędu jest ważna dla przystosowania rośliny do zmiennego składu mineralnego podłoża, gdyż prowadzi do regulacji ilości metalu przenoszonego do fotosyntetycznie czynnych organów. Zaangażowane są w to procesy transportu transbłonowego uczestniczące w pobieraniu metali, ich gromadzeniu i redystrybucji. Wiadomo, że białka transportujące metale nie posiadają pełnej specyficzności substratowej względem konkretnego metalu, lecz charakteryzuje je zdolność wiązania różnych metali z różnym powinowactwem, a efektywność przenoszenia zależy między innymi od ich wzajemnego stężenia oraz od specyfiki molekularnej i biochemicznej gatunku bądź odmiany. W konsekwencji zachodzi wzajemne kompetycyjne oddziaływanie metali na procesy pobierania, transportu i zdolności do ich gromadzenia w tkankach i organach. Niekorzystnym następstwem tych procesów jest zjawisko hamowania translokacji do pędów Zn (mikroelementu) w obecności Cd (metal balastowego) w podłożu, co prowadzi do niedoboru cynku. Odwrotna zależność to intensywne pobieranie Cd np. przez rośliny rosnące na glebach ubogich w składniki mineralne. Podłoże molekularne wzajemnie zależnej regulacji translokacji do pędu Zn i Cd nie jest znane. Ostatnie badania przeprowadzone w mojej grupie badawczej wykazały, iż u tytoniu w obecności Cd (niskiego i wysokiego) zachodzi stymulacja (a nie hamowanie) translokacji Zn do pędu gdy stężenie Zn w pożywce wynosi 0.5  $\mu\text{M}$ , zaś brak tego efektu przy 10  $\mu\text{M}$  Zn. Okazało się także, iż zjawisku temu towarzyszy zróżnicowany poziom ekspresji w korzeniach dwóch genów ZIP (ZRT-IRT-like Protein): *NtZIP1* i *NtZIP4*. Celem projektu jest sklonowanie *NtZIP1* i *NtZIP4* z tytoniu, jego charakterystyka i określenie udziału w procesie przenoszenia do pędu Zn/Cd w warunkach zmiennego wzajemnego stężenia obu tych metali, z uwzględnieniem niepoznanej do tej pory roli części apikalnej i bazalnej korzenia. Przewidziano także określenie roli innych genów homeostazy metali w regulacji tego procesu.

##### ***Metodyka badań***

Materiał doświadczalny to rośliny tytoniu *Nicotiana tabacum*. Przewiduje się zastosowanie następujących metod: (1) Klonowanie *NtZIP1* i *NtZIP4*; (2) Określenie lokalizacji subkomórkowej białek *NtZIP1* i *NtZIP4* oraz rodzaju przenoszonych metali; (3) Analiza ekspresji na poziomie organów, tkanek i komórek (z zastosowaniem techniki RealTime PCR w czasie rzeczywistym oraz z wykorzystaniem białek reporterowych GUS oraz DcRed-express – mikroskopia świetlna i konfokalna) w warunkach zmiennego wzajemnego stężenia Cd i Zn w pożywce; powiązanie z efektywnością translokacji Zn i Cd do pędu; (4) Wyciszenie genów *NtZIP1* i *NtZIP4* i określenie konsekwencji molekularnych i fizjologicznych dla badanych procesów; Część badań będzie wykonywana na Uniwersytecie Southampton (W. Brytania).

kierownik badań – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

## **2. Projekt NCN HARMONIA 6: Molekularne mechanizmy gromadzenia cynku w „komórkach akumulujących” mezofilu, [2015-2021]**

### ***Cel prowadzonych badań / hipoteza badawcza***

Mechanizmy tolerancji na Zn na poziomie molekularnym pozostają stosunkowo słabo poznane pomimo intensywnie prowadzonych na świecie badań. Jednym z głównych wyznaczników poziomu tolerancji rośliny na Zn jest zdolność do gromadzenia wysokich stężeń tego metalu w liściach bez objawów toksyczności. Badania przeprowadzone ostatnio wskazują, iż zróżnicowanie funkcjonalne pojedynczych komórek mezofilu pod względem ich zdolności do gromadzenia Zn jest jednym z mechanizmów umożliwiających akumulowanie dużych ilości tylko w niektórych komórkach, co w warunkach ekspozycji rośliny na jego wysokie stężenia przyczynia się do prawidłowego funkcjonowania pozostałych komórek (nieakumulujących) – zatem także tkanki jako całości, oraz rośliny. Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za zróżnicowanie funkcjonalne tych komórek pozostają nieznane, podobnie jak sygnały inicjujące załadunek Zn. W oparciu o przeprowadzone poprzednio badania wysunięto hipotezę, zgodnie z którą apoplast mógłby być miejscem percepcji tzw. „statusu Zn” w roślinie i miejscem, w którym jest generowany sygnał o jego wysokim stężeniu inicjujący gromadzenie Zn tylko w pewnych występujących obok siebie komórkach mezofilu gromadzących Zn. Komórki te z czasem degenerują tworząc obszary nekrotyczne, jednak zakumulowany Zn jest w nich zatrzymywany dzięki obecności silnie z lignifikowanych ścian komórkowych. Celem proponowanych badań jest weryfikacja hipotezy zgodnie z którą podwyższone stężenie Zn w podłożu (zatem i w apoplacie) przekraczające pewną wartość progową, indukuje specyficzne mechanizmy molekularne różnicujące podobne do siebie komórki mezofilu pod względem ich zdolności do akumulacji wysokich stężeń Zn: na występujące w grupach „komórki akumulujące Zn” oraz na sąsiadujące komórki nieakumulujące.

### ***Metodyka badań***

Materiał doświadczalny to rośliny tytoniu *Nicotiana tabacum*. Przewiduje się zastosowanie następujących metod:

- (i) identyfikacja do dalszych analiz „genów kluczowych” dla gromadzenia Zn w specjalnych grupach komórek mezofilu (analiza bioinformatyczna bazy danych genomu tytoniu mająca na celu otrzymanie sekwencji genów transportu metali z pięciu głównych rodzin transporterów: HMA, Nramp, ZIP, CAX, CDF/MTP; (ii) w oparciu o RealTime identyfikacja genów o zróżnicowanej ekspresji w liściach roślin poddanych działaniu wysokiego stężenia Zn w porównaniu do roślin kontrolnych; wybór do dalszych testów trzech genów; (iii) klonowanie wybranych genów, określenie specyfiki substratowej (rodzaju przenoszonych metali) w testach funkcjonalnych z zastosowaniem mutantów drożdży z dysfunkcją transportu różnych metali, określenie lokalizacji subkomórkowej kodowanych białek; (iv) analiza wzoru ekspresji wybranych genów na przekrojach przez liście, korelacja z wzorem akumulacji Zn (badania ekspresji białka reporterowego GUS pod promotorem badanych genów oraz lokalizacji Zn fluoroforem Zinpyr1); (v) ko-lokalizacja na tych samych przekrojach poprzecznych *in vivo* wzoru ekspresji białka reporterowego DsRed pod promotorem badanych genów z lokalizacją wysokich stężeń Zn (detekcja obecności i stężenia Zn fluoroforem Zinpyr1).

kierownik badań – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

## **3. Projekt dla młodego naukowca PRELUDIUM 9:” Rola receptorów WAKs (Wall-Associated Kinases) w percepcji zależnego od stopnia estryfikacji pektyn sygnału o poziomie Zn w apoplacie.”, [2016-2019];**

kierownik badań – mgr Aleksandra Weremczuk (doktorant);

opiekun naukowy – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz.

## **4. Projekt ETIUDA 5:” Mechanizm formowania się nekroz z "komórek akumulujących Zn" w liściach tytoniu z uwzględnieniem roli apoplastu w tym procesie.”, [2017-2018];**

kierownik badań – mgr Aleksandra Weremczuk (doktorant);

opiekun naukowy – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz.

**5. Projekt MNiSW międzynarodowy niewspółfinansowany:** "*Molekularne mechanizmy indukcji akumulacji cynku oraz redukcji akumulacji kadmu w roślinach - badania na rzecz poprawy składu mineralnego*" [2011-2016];

kierownik badań – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

**6. European Union Cost Action FA0905** (European Cooperation in the field of Scientific and Technological research): "*Mineral-improved crop production for healthy food and feed*" [2010-2014].

kierownik badań – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

**7. Projekt dla młodego naukowca PRELUDIUM :**"*Modelowe badanie wpływu transgeny na homeostazę metali w roślinie*",

kierownik badań – mgr Oskar Siemianowski (doktorant);

opiekun naukowy – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz. [2011-2013].

**8. Projekt 6 Programu Ramowego Unii Europejskiej:** PHIME „*Public health impact of long-term, low level mixed element exposure in susceptible population strata*”

strona internetowa: <http://www.phime.org/> [2006-2011].

Projekt międzynarodowy – 37 partnerów (instytucji);

kierownik badań – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

**9. Projekt promotorski** na wykonanie pracy doktorskiej mgr. Sylwii Wojas: "*Akumulacja kadmu i fitochelatyn w wakuolach roślin tytoniu z nadekspresją genów syntazy fitochelatyn AtPCS1 i CePCS*" [2009-2010].

kierownik badań – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

**10. European Union Cost Action 859** (European Cooperation in the field of Scientific and Technological research): "*Phytotechnologies to promote sustainable land use management and food safety*" [2005-2009].

kierownik badań – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

**11. Projekt zamawiany:** „*Utylizacja odpadów przemysłu mineralnego z zastosowaniem metod biotechnologicznych oraz stworzenie banku mikroorganizmów potencjalnie użytecznych w biometalurgii*" [2005-2008].

realizacja części badań prowadzonych na roślinach – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

**12. Projekt badawczy 5PR Unii Europejskiej METALLOPHYTES** „*An integrated approach towards removal of toxic metals from contaminated soil*” (Projekt międzynarodowy, 9 partnerów/instytucji). [2003-2004].

kierownik badań – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz

**13. Projekt badawczy własny KBN:** „*Rola wapnia w pobieraniu i akumulacji ołowiu przez rośliny*”; [1998-2001].

kierownik badań – prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz