

# AUTOREFERAT

**Dr Magdalena Migocka**

Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin  
Wydział Nauk Biologicznych  
Uniwersytet Wrocławski



Wrocław 2015

1. Imię i nazwisko

Magdalena Krystyna Migocka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- Magister biologii, specjalność Botanika – 26 czerwca 2002 roku – Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski; pracę magisterską pt. „Regulacja transportu azotanów przez błony tonoplastowe” wykonywałam pod kierunkiem pani Prof. dr hab. Grażyny Kłobus w Zakładzie Fizjologii Roślin.
- Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii rozwoju – 20 grudnia 2007 roku - Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski; pracę doktorską pt. „Rola plazmolemy w detoksykacji komórek roślinnych podczas stresu wywołanego obecnością metali ciężkich w środowisku” wykonywałam pod kierunkiem pani Prof. dr hab. Grażyny Kłobus w Zakładzie Fizjologii Roślin.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

- od 01.01.2009 do chwili obecnej – adiunkt w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin Instytutu Biologii Eksperymentalnej na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego
- od 01.01.2008 do 31.12.2008 – asystent w Zakładzie Genetyki Instytutu Genetyki i Mikrobiologii na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego
- od 1.10.2007 do 30.06.2011 – nauczyciel akademicki na kierunkach Kosmetologia i Ratownictwo medyczne w Niepublicznej Wyższej Szkole Medycznej we Wrocławiu; prowadzenie wykładów i seminariów w zakresie biochemii, opieka nad pracami licencjackimi

4. 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. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

**Molekularna charakterystyka transporterów błonowych związanych z detoksykacją komórek ogórka z nadmiaru metali ciężkich.**

b) (autor/autorzy, rok wydania, tytuł/tytuły publikacji, nazwa wydawnictwa, 5-letni wskaźnik Impact Factor oraz punktacja punktacja MNiSW według komunikatu obowiązującego w roku wydania pracy)

- **Migocka M**, Papierniak A, Kosieradzka A, Posyniak E, Maciaszczyk-Dziubinska E, Biskup R, Garbiec A, Marchewka T (2015) Cucumber Metal Transport Protein CsMTP9 is a plasma membrane H<sup>+</sup>-coupled antiporter involved in the Mn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> efflux from root cells. The Plant Journal, DOI: 10.1111/tpj.13056

**IF (5-letni): 6.96**

**Liczba punktów MNiSW (2014): 45\***

- **Migocka M** (2015) Copper-transporting ATPases: The evolutionary conserved machineries for balancing copper in living systems. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life 67(10):737-45

**IF (5-letni): 3.37**

**Liczba punktów MNiSW (2014): 30\***

- **Migocka M**, Posyniak E, Maciaszczyk-Dziubińska E, Papierniak A, Kosieradzka A (2015) Functional and Biochemical Characterization of Cucumber Genes Encoding two Copper ATPases CsHMA5.1 and CsHMA5.2. Journal of Biological Chemistry, 290(25):15717-29

**IF (5-letni): 4.69**

**Liczba punktów MNiSW (2014): 35\***

- **Migocka M**, Kosieradzka A, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Posyniak E, Garbiec A, Filleur S (2015) Two metal-tolerance proteins, MTP1 and MTP4, are involved in Zn homeostasis and Cd sequestration in cucumber cells. Journal of Experimental Botany 66(3): 1001-1015

**IF (5-letni): 6.312**

**Liczba punktów MNiSW (2014): 45\***

- **Migocka M**, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Posyniak E, Kosieradzka A (2015) Molecular and biochemical properties of two P1B2 -ATPases, CsHMA3 and CsHMA4, from cucumber. Plant and Cell Environment 38: 1127-1141

**IF (5-letni): 6.64**

**Liczba punktów MNiSW (2014): 45\***

- **Migocka M**, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Poździk P, Posyniak E, Garbiec A, Filleur S (2014) Cucumber metal transport protein MTP8 confers increased tolerance to manganese when expressed in yeast and Arabidopsis thaliana. Journal of Experimental Botany 65(18):5367-84  
**IF (5-letni): 6.312**  
**Liczba punktów MNiSW (2014): 45**
- **Migocka M**, Papierniak A, Kosatka E, Kłobus G (2011) Comparative study of the active cadmium efflux systems operating at the plasma membrane and tonoplast of cucumber root cells. Journal of Experimental Botany 62(14):4903-16  
**IF (5-letni): 6.312**  
**Liczba punktów MNiSW (2011): 32**

\*dla prac opublikowanych w 2015 roku przyjęto liczbę punktów MNiSW z roku 2014

Sumaryczny Impact Factor monotematycznego cyklu publikacji: **40,596**

Sumaryczna liczba punktów MNiSW dla monotematycznego cyklu wybranych publikacji: **277 pkt**

- c) oświadczenia współautorów o udziale własnym w przygotowaniu prac stanowiących szczególne osiągnięcia naukowe w załączniku 6
- d) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

### *1. Istniejący stan wiedzy.*

Według danych podawanych przez statystykę publiczną blisko 2,7 % gleb w Polsce to obszary zdegradowane przemysłowo o niskiej wartości rolniczej [1]. Zdegradowane gleby występują głównie na południu Polski w okolicach dużych zakładów przemysłowych. Większość zdegradowanych gleb cechuje się znaczną koncentracją metali ciężkich, których nieustającym źródłem są przede wszystkim: przemysł wydobywczy, metalurgiczny i papierniczy, ścieki i odpady przemysłowe i komunalne a także nasilona komunikacja samochodowa. Wzrastające zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi obserwuje się także na obszarach rolniczych. Akumulacja metali w glebach uprawnych jest efektem intensyfikacji produkcji rolnej polegającej na wprowadzaniu do środowiska znacznych ilości nawozów organicznych, nieorganicznych i pestycydów, będących źródłem m.in. metali ciężkich.

Monitoring chemizmu obszarów użytkowanych wykazał II stopień zanieczyszczenia gleb ołowiem (ok. 3% badanych gleb) i cynkiem (ok. 1,5% badanych gleb) [1]. Ponadto stwierdzono I stopień zanieczyszczenia gleb kadmem (ok. 10% gleb) i niklem (ok. 3% gleb) [1]. Postępujące zanieczyszczenie metalami ciężkimi obserwuje się także na terenach rolniczych innych krajów europejskich, takich jak Bułgaria (19 360 ha obszarów rolnych) czy Francja (800 000 terenów), a w całej zachodniej Europie nawet na 1 200 000 terenach rolniczych [2]. Z uwagi na bardzo niekorzystny wpływ nadmiaru metali na mikroorganizmy glebowe, rośliny uprawne, i pośrednio zdrowie zwierząt i ludzi, niezmiernie ważne stało się opracowanie wydajnych technologii oczyszczania (remediacji) gleb zdegradowanych przemysłowo i rolniczo z nagromadzonych metali. Stosowanie wielu fizycznych i chemicznych metod remediacji zanieczyszczonych gleb jest bardzo kosztowne, w związku z czym obecnie ogromne zainteresowanie budzą znacznie tańsze i bardziej ekologiczne biologiczne metody oczyszczania gleb za pomocą mikroorganizmów (bioremediacja) i roślin (fitoremediacja). Fitoremediacja polega na wykorzystaniu roślin, naturalnie występujących lub genetycznie modyfikowanych do oczyszczania gleb, wód lub osadów z różnego rodzaju zanieczyszczeń organicznych lub nieorganicznych, w tym metali ciężkich. Rośliny pobierają metale ciężkie z gleby, wody i osadów i, w zależności od gatunku, magazynują je w korzeniach i/lub organach nadziemnych. Proces ten, zwany fitoekstrakcją jest stosunkowo niedrogi i przyjazny środowisku, ale jednocześnie bardzo długotrwały. Wydajność fitoekstrakcji zależy przede wszystkim od tolerancji tkanek roślinnych na podwyższone stężenia metali ciężkich w glebie ale także od przyrostu biomasy roślin akumulujących metale. Naturalnie występujące w przyrodzie hyperakumulatory, *Silene vulgaris*, *Thlaspi caerulescens*, *Solanum nigrum* czy *Arabidopsis halleri* to jednoroczne rośliny z małym przyrostem biomasy, które nie nadają się do efektywnej ekstrakcji metali z zanieczyszczonych gleb. Rośliny przydatne w fitoremediacji powinny charakteryzować się rozwiniętym systemem korzeniowym, szybkim wzrostem, produkcją znacznej ilości biomasy oraz akumulacją i tolerancją wysokich stężeń metali ciężkich w swoich tkankach. Obecnie żaden z naturalnie występujących hyperakumulatorów nie spełnia wszystkich wymienionych wymagań. Jednak zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw naturalnej fitoremediacji pozwoli na uzyskanie odpowiednich odmian roślin transgenicznych doskonale nadających się do procesu stosunkowo mało kosztownej ekstrakcji metali ciężkich z terenów zanieczyszczonych. Porównanie mechanizmów detoksykacji metali u roślin tolerancyjnych na metale i roślin wrażliwych zwróciło uwagę na geny, które mogą być użyteczne w projektowaniu rośliny transgenicznej skutecznej w fitoremediacji. Geny te należą do multigenowych rodzin, kodujących specyficzne białka transportujące metale przez błony komórkowe lub białka uczestniczące w chelatowaniu metali w obrębie komórki i występują we wszystkich dotąd zsekwencjonowanych genomach roślinnych. Wśród nich szczególną

nadzieję wiąże się z białkami należącymi do dwóch rodzin transporterów metali ciężkich: P<sub>1B</sub>-ATPazami (zwanymi także ATPazami metali ciężkich HMA, ang. Heavy Metal ATPases) oraz transporterami CDF (ang. Cation Diffusion Facilitator; u roślin określanymi jako białka tolerancji na metale MTP, ang. Metal Tolerance Proteins).

Pierwsza grupa białek to podrodzina dużej rodziny białek zwanych P-ATPazami, które występują powszechnie w komórkach archeonów, bakterii i eukariontów, gdzie wykorzystują ATP do transportu jonów i lipidów [3, 4]. Są to białka zintegrowane z błonami biologicznymi za pośrednictwem domeny transbłonowej, która składa się z 6-8  $\alpha$ -helis i zawiera miejsca determinujące specyficzność substratową. Wszystkie P-ATPazy posiadają charakterystyczne domeny funkcjonalne w pętlach cytoplazmatycznych: domenę wiążącą ATP (domena N), domenę podlegającą fosforylacji (domena P) i domenę katalityczną (domena A) [5]. P<sub>1B</sub>-ATPazy wyróżniają się wśród pozostałych P-ATPaz specyficznością wobec jonów metali ciężkich. W związku z transportowanymi substratami, w sekwencji tych białek obecne są charakterystyczne motywy i domeny zaangażowane w wiązanie kationów metali, takie jak motyw cysteina/seryna-prolina-cysteina/histydyna/seryna (C/S-P-C/H/S) w helisie 6, czy domeny bogate w cysteiny lub histydyny na końcach aminowym i karboksylowym [6]. Jako typowe P-ATPazy, P<sub>1B</sub>-ATPazy transportują metale przez błony wykorzystując ATP jako źródło energii. Ten kilku-etapowy proces obejmuje wiązanie kationu metalu do specyficznego miejsca wiązania znajdującego się w końcach aminowym lub karboksylowym białka (ang. metal binding site), przeniesienie związanego jonu do motywu wiążącego w domenie transbłonowej i uwolnienie jonu po drugiej stronie błony sprzężone z wiązaniem i hydrolizą ATP [7]. Kluczowe etapy podczas całego cyklu katalitycznego to przejściowa fosforylacja konserwatywnego asparagianu w motywie DKTG domeny P przez ATP, która zachodzi po związaniu jonu metalu z białkiem, i następująca po niej defosforylacja aminokwasu po uwolnieniu jonu metalu z miejsca wiążącego w domenie transbłonowej [7]. Nieliczne badania biochemiczne pojedynczych P<sub>1B</sub>-ATPaz bakteryjnych, ludzkich i roślinnych sugerują, że są to białka o wysokim powinowactwie do transportowanych jonów metali (w zakresie stężeń 0.5 - 2.5  $\mu$ M) i wyraźnie wskazują, że obecność jonu transportowanego metalu jest niezbędna lub kluczowa do indukcji hydrolizy ATP katalizowanej przez P<sub>1B</sub>-ATPazy [10-14]. Nadal brakuje jednak danych na temat biochemicznych i kinetycznych właściwości znakomitej większości P<sub>1B</sub>-ATPaz zidentyfikowanych w organizmach żywych. Natomiast znacznie więcej wiadomo o fizjologicznych funkcjach tych białek w komórkach i tkankach różnych organizmów. Pierwsze scharakteryzowane funkcjonalnie P<sub>1B</sub>-ATPazy to białka najprostszych jednokomórkowych organizmów, takich jak archeony, bakterie i drożdże oraz homologiczne białka u ludzi. Badania nad tymi białkami wykazały, że rodzina P<sub>1B</sub>-ATPaz uczestniczy zarówno w procesach pobierania jonów metali do komórki i ich kierowania do docelowych organelli i białek, jak i w detoksykacji komórek, poprzez wydzielanie nadmiaru metali na zewnątrz błony

komórkowej. I tak, wykazano, że fizjologiczna funkcja P<sub>1B</sub>-ATPazy ZnTA *Escherichia coli* i CadA *Staphylococcus aureus* jest związana z detoksykacją komórek bakterii z nadmiaru Zn<sup>2+</sup> (ZnTA) oraz Cd<sup>2+</sup> i Pb<sup>2+</sup> (ZnTA, CadA) [15,16]. Obydwie ATPazy katalizują wydzielanie metali na zewnątrz komórek bakterii [9,10]. Podobną funkcję pełnią białka CopA i CopB zidentyfikowane u archeona *Archaeoglobus fulgidus* oraz CopA *E. coli*, które uczestniczą w usuwaniu Cu<sup>+</sup> i Ag<sup>+</sup> z komórek [17]. Z kolei dwie homologiczne P<sub>1B</sub>-ATPazy CopA i CopB *Enterococcus hirae*, odpowiadają za transport Cu<sup>+</sup> i Ag<sup>+</sup> w przeciwnych kierunkach: do wnętrza (CopA) lub na zewnątrz (CopB) komórek bakterii [18]. Oprócz CopA *E. hirae*, także inne prokariotyczne P<sub>1B</sub>-ATPazy dostarczają miedź do komórek lub organelli docelowych, gdzie następuje wbudowanie tego metalu w kuproproteiny - białka zależne od miedzi. W komórkach patogennych bakterii *Pseudomonas syringa*, endosymbiontów *Rhizobium leguminosarum* oraz fotosyntetyzujących cyjanobakterii *Synechocystis* PCC 6803 and *Synechococcus* PCC 7942, ATPazy typu P<sub>1B</sub> odpowiadają za pobieranie i dostarczenie miedzi do białek docelowych zaangażowanych w oddychanie i fotosyntezę (oksydaza cytochromu c, plastocjanina) [19-21]. Funkcję zaopatrywania organelli w miedź pełnią także P<sub>1B</sub>-ATPazy zidentyfikowane w komórkach drożdży (Ccc2p) i ludzi (ATP7A i ATP7B). Zarówno Ccc2p jak i ATP7A i ATP7B transportują miedź do pęcherzyków sekrecyjnych aparatu Golgiego, w których metal wbudowywany jest do kuproproteiny niezbędnych do funkcjonowania komórki: glikoproteiny Fet3p zaangażowanej w pobieranie żelaza (Ccc2p), lub enzymów zależnych od miedzi, takich jak β-hydroksylaza dopaminy, tyrozynaza, oksydaza lizylowa itd. (ATP7A i ATP7B) [22-25]. Jednak w warunkach toksycznego stężenia miedzi w komórce, ATP7A i ATP7B są transportowane w okolice błony komórkowej i uczestniczą w usuwaniu nadmiaru jonów metalu na zewnątrz komórki [26, 27].

Dotychczasowe badania na homologicznymi białkami roślin wskazują, że roślinne P<sub>1B</sub>-ATPazy również mają kluczowe znaczenie dla utrzymania komórkowej homeostazy metali ciężkich. Jednakże, w porównaniu z innymi organizmami u roślin ilość genów kodujących te białka jest wielokrotniona. W genomach modelowych roślin *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa* zidentyfikowano odpowiednio, 8 (*AtHMA1-AtHMA8*) i 9 (*OsHMA1-OsHMA9*) sekwencji kodujących P<sub>1B</sub>-ATPazy. Analizy filogenetyczne wykazały, że wszystkie roślinne P<sub>1B</sub>-ATPazy klasyfikują się w obrębie trzech odrębnych klas filogenetycznych: klasy P<sub>1B1</sub> (*AtHMA5*, *AtHMA6*, *AtHMA7* i *AtHMA8*), zawierającej białka transportujące jednowartościowe jony Cu<sup>+</sup> i Ag<sup>+</sup>; klasy P<sub>1B2</sub> (*AtHMA2*, *AtHMA3* i *AtHMA4*), obejmującej transportery dwuwartościowych jonów Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> lub Pb<sup>2+</sup>; oraz klasy P<sub>1B4</sub>, której białka występują tylko u roślin i bakterii i wykazują szerokie powinowactwo do różnych metali (Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) [28]. Najlepiej dotąd scharakteryzowane roślinne P<sub>1B</sub>-ATPazy to białka *A. thaliana*, które są bardzo zróżnicowane pod względem lokalizacji tkankowej, subkomórkowej i specyficzności substratowej. *AtHMA1*

lokalizuje się w chloroplastach i uczestniczy w detoksykacji tych organelli z nadmiaru cynku oraz w zaopatrywaniu stromy w miedź [29, 30]. AtHMA3 występuje w błonie wakuolarnej komórek liści niektórych ekotypów *A. thaliana* i determinuje poziom akumulacji  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  w liściach, uczestnicząc w sekwestracji tych metali w wakuolach [31, 32]. AtHMA2 i AtHMA4 lokalizują się w plazmolemie komórek tkanek otaczających naczynia w korzeniach [33, 34]. Obydwa białka odpowiadają za radialny transport  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  z komórek otaczających naczynia do naczyń, uczestnicząc w załadunku cynku i kadmu do ksylemu i dalszego transportu tych metali do nadziemnych części rośliny [35]. Białko AtHMA5 uczestniczy w detoksykacji korzeni z nadmiaru miedzi, ale brak danych na temat lokalizacji subkomórkowej tego białka nie pozwala na precyzyjne określenie jego funkcji w komórkach *A. thaliana* [36]. Jak dotąd nie zlokalizowano także roślinnej  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPazy AtHMA7, ale badania na mutantach *A. thaliana* pozbawionych tego białka i drożdżach, sugerują, że jest ono niezbędne w odpowiedzi roślin na etylen, ponieważ prawdopodobnie dostarcza miedź do syntezy funkcjonalnych receptorów tego hormonu [37, 38]. Ostatnie dwie  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPazy *A. thaliana*, AtHMA6 i AtHMA8, transportują miedź do stromy i światła tylakoidów w chloroplastach dla chloroplastowych białek zależnych od miedzi: dysmutazy ponadtlenkowej Cu/Zn-SOD i plastocyaniny [39]. Badania nad homologicznymi białkami roślinnych hyperakumulatorów metali ciężkich wykazały, że  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPazy mogą mieć kluczowe znaczenie dla hyperakumulacji  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  oraz hipertolerancji roślin na obydwie metale. Konstytutywna, wysoka ekspresja genów kodujących białko HMA4 u *Arabidopsis halleri* i *Noccaea caerulescens* (*Thlaspi caerulescens*), umożliwia wydajną translokację  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  z korzeni do pędu i zwiększoną akumulację tych jonów w nadziemnych częściach roślin [40-43]. Oprócz HMA4, także HMA3 uczestniczy w hyperakumulacji  $\text{Cd}^{2+}$  w częściach nadziemnych *N. caerulescens* i hipertolerancji roślin na  $\text{Cd}^{2+}$  poprzez zwiększoną sekwestrację tego jonu w wakuolach komórek liści [44]. Ze względu na udział  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPaz w akumulacji metali ciężkich i jednoczesnej detoksykacji komórek roślinnych z ich nadmiaru, białka tej rodziny można wykorzystać planując modyfikacje roślin dla celów remediacji środowisk zanieczyszczonych metalami. Nadal brakuje jednak istotnych danych na temat liczby, organizacji i funkcji  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPaz u wielu roślin, a także eksperymentalnych dowodów potwierdzających specyficzność substratową oraz kinetyczne i biochemiczne właściwości roślinnych  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPaz. W związku z tym nadal nie mamy pełnej wiedzy o właściwościach i funkcjach tej rodziny u roślin.

Druga rodzina białek, która może znaleźć zastosowanie w fitoremediacji to transportery błonowe z rodziny CDF, które podobnie jak  $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPazy są bardzo szeroko rozpowszechnione w świecie organizmów żywych. Wszystkie scharakteryzowane dotąd białka tej rodziny to transportery dwuwartościowych kationów metali o promieniu jonowym od



72 ( $Zn^{2+}$ ) do 97 ( $Cd^{2+}$ ) pm [45]. Większość scharakteryzowanych dotąd białek tej rodziny działa na zasadzie antyporterów  $Me^{2+}/H^+(K^+)$  [46-49], które transportują metale takie jak  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , lub  $Mn^{2+}$  z cytoplazmy na zewnątrz komórki lub do kompartmentów wewnątrzkomórkowych [45, 50-55]. Eksperymentalna analiza topologii białka YiiP *E. coli* wykazała, że większość transporterów CDF zawiera w swej strukturze 6 segmentów transbłonowych (TMs) o strukturze  $\alpha$  helisy, oraz aminowe i karboksylowe końce po stronie cytoplazmy [50-56]. Niektóre transportery CDF wykazują jednak nieco odmienny typ struktury drugorzędowej: drożdżowe białko Msc2 i ludzkie białko ZnT5 mogą zawierać w swoich strukturach odpowiednio 12 lub 15 helis transbłonowych [57,58]. Z kolei białka CDF transportujące mangan posiadają prawdopodobnie 4-5 segmentów TM [52]. Sekwencja sygnaturowa, charakterystyczna dla całej rodziny białek CDF znajduje się w regionie *N*-końcowym, obejmującym helisę I (TMI) i helisę II (TMII) oraz pętlę cytoplazmatyczną między tymi helisami, natomiast na końcu karboksylowym często występuje domena, której funkcja może być związana z transportem kationów (ang. *cation efflux domain*) [59]. Najbardziej konserwatywne aminokwasy występują w obrębie helis transbłonowych I, II, V i VI, które prawdopodobnie zaangażowane są w przenoszenie jonów metali [60]. Wiele białek CDF posiada w swojej strukturze region bogaty w histydyny, który znajduje się między helisami TMIV i TMV, lub w obrębie aminowego lub karboksylowego końca białek. Wydaje się, że funkcjonuje on jako domena wiążąca specyficznie jony metali, takie jak  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , i/lub  $Cd^{2+}$ , ponieważ nie stwierdzono obecności takiego regionu w manganowych transporterach CDF [59]. Coraz liczniejsze badania wskazują, że białka CDF mogą funkcjonować jako homo- lub heterooligomery. Kompleksy takie zidentyfikowano zarówno w komórkach organizmów prokariotycznych (białko YiiP u *E. coli*), jak i eukariotycznych (PtdMTP1 u *Populus trichocarpa*  $\times$  *deltoides*, ZnT5 i ZnT6 u człowieka) [61-63].

W komórkach bakterii i drożdży białka CDF uczestniczą przede wszystkim w detoksykacji komórek z nadmiaru metali. Dwa białka CDF zidentyfikowane w błonie komórkowej *E. coli*, katalizują wydzielanie  $Zn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$  (białko ZitB) lub  $Fe^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  (białko FieF/YiiP) na zewnątrz komórek bakterii (46, 47). Homologiczne białka CzcD, FieF i DmeF warunkują oporność bakterii *Wautersia metallidurans* CH34 (*Ralstonia metallidurans*) na toksyczne stężenia  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ , usuwając nadmiar jonów tych metali na zewnątrz komórek [50, 54]. W przeciwieństwie do bakterii, udział białek CDF w detoksykacji drożdży *S. cerevisiae* wiąże się z wewnątrzkomórkową akumulacją metali ciężkich. Dwa blisko spokrewnione białka CDF Zrc1p i Cot1p lokalizują się w błonie wakuolarnej komórek drożdży, gdzie katalizują transport  $Zn^{2+}$  i  $Co^{2+}$  z cytoplazmy do wnętrza wakuoli [64-66]. Pozostałe scharakteryzowane białka CDF drożdży lokalizują się w błonach retikulum endoplazmatycznego (ScMcs2) i mitochondriów (MMT1 i MMT2) i odpowiadają za utrzymanie prawidłowej homeostazy odpowiednio, cynku i żelaza w obydwu

kompartymencie [67, 68]. Wszystkie scharakteryzowane dotychczas białka CDF ssaków transportują jony  $Zn^{2+}$ , stąd określa się je jako transportery ZnT (w aktualnej nomenklaturze SLC30). Większość z nich występuje w błonach kompartmentów wewnątrzkomórkowych i bierze udział w dostarczaniu Zn do organelli takich jak aparat Golgiego (ZnT6, ZnT7, ZnT10), endosomy i lizosomy (ZnT2, ZnT4), pęcherzyki szlaku wydzielniczego (ZnT2 i ZnT4), pęcherzyki synaptyczne (ZnT3) czy pęcherzyki wydzielnicze zawierające insulinę w komórkach beta trzustki (ZnT5, ZnT8) [69-76]. Natomiast plazmolemy transporter ZnT1 lokalizuje się w błonie komórkowej i uczestniczy w detoksykacji komórek ssaków z nadmiaru cynku poprzez eksport nadmiaru Zn z komórki [77, 78].

W porównaniu z białkami CDF organizmów prokariotycznych, drożdży i ssaków, rodzina homologicznych transporterów u roślin jest stosunkowo słabiej scharakteryzowana. U roślin białka tej rodziny określane są jako transportery MTP. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano geny kodujące 12 białek MTP: AtMTP1-AtMTP12. Kompleksowa analiza sekwencji transporterów CDF pochodzących z różnorodnych gatunków bakterii, grzybów, roślin i ssaków wykazała, że wśród wszystkich białek tej rodziny wyróżniają się trzy główne grupy filogenetyczne, które nazwano Zn-CDF, Fe/Zn-CDF i Mn-CDF na podstawie przypuszczalnego lub potwierdzonego substratu-metalu transportowanego przez analizowane białka [59]. Białka *A. thaliana* znalazły się zarówno w grupie transporterów cynkowych (Zn-CDF: AtMTP1-AtMTP4, AtMTP5 i AtMTP12), jak i w grupach transporterów manganowych (Mn-CDF: AtMTP8-AtMTP11) i żelazowo-cynkowych (Fe/Zn-CDF: AtMTP6) [59]. Transporter AtMTP7 nie został zaklasyfikowany do żadnej z wyróżnionych grup; razem z nielicznymi białkami CDF innych organizmów znalazł się pomiędzy dwoma grupami Mn-CDF i Fe/Zn-CDF. Dalsze analizy filogenetyczne obejmujące już tylko roślinne białka MTP pokazały jednak, że AtMTP7 przynależy do grupy transporterów Fe/Zn-CDF a trzy wyróżnione wcześniej grupy roślinnych białek MTP dzielą się dodatkowo na 7 podgrup, które nazwano zgodnie z nomenklaturą transporterów MTP *A. thaliana*, występujących w każdej podgrupie [79]. I tak, grupa białek Zn-CDF obejmuje podgrupy G1 (AtMTP1-AtMTP4), G5 (AtMTP5) i G12 (AtMTP12); grupa białek Mn-CDF obejmuje podgrupy G8 (AtMTP8) i G9 (AtMTP9-AtMTP11), natomiast grupa białek Fe/Zn-CDF obejmuje podgrupy G6 (AtMTP6) i G7 (AtMTP7) [79]. Mimo iż analizy filogenetyczne sugerują specyficzność substratową roślinnych białek MTP, do tej pory scharakteryzowano funkcję i potwierdzono specyficzność tylko trzech białek rzodkiewnika: transporterów cynku AtMTP1 [80] i AtMTP3 [81], zlokalizowanych w błonie wakuolarnej oraz transportera manganu MTP11 zlokalizowanego w pęcherzykach Golgiego i kompartmentach pre-wakuolarnych [82, 83]. Dane o funkcji transporterów MTP u innych roślin są bardzo nieliczne i przede wszystkim dotyczą homologów białka AtMTP1. Wiadomo zatem, że roślinne białka MTP1 mogą różnić się lokalizacją subkomórkową u różnych gatunków roślin. I tak, białka PtdMTP1 z hybrydy topoli

*Populus trichocarpa* x *Populus deltoid*), HvMTP1 z *Hordeum vulgare* i AhMTP1 z *Arabidopsis halleri* lokalizują się w błonach wakuolarnych, podczas gdy trzy ortologi tych białek (BjCET2, BjCET3 i BjCET4) z *Brassica juncea* występują w błonie komórkowej [61, 84-87]. Co więcej, podobne białka u ryżu (OsMTP1) i hyperakumulatora metali *Thlaspi goesingense* (TgMTP1) zlokalizowano zarówno w błonie komórkowej jak i wakuolarnej [88-90]. Mimo, że wszystkie białka MTP1 klasyfikują się do grupy Zn-CDF, coraz liczniejsze badania sugerują, że ich specyficzność substratowa często nie ogranicza się do jednego transportowanego metalu. O ile transportery PtdMTP1, AtMTP1 i AhMTP1 są wysoce specyficzne wobec jonów cynku, białko OsMTP1 wykazuje zdolność do transportu jonów  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ , białko HvMTP1 transportuje jony  $Zn^{2+}$  i  $Co^{2+}$ , białka BjCET2, BjCET3 i BjCET4 transportują jony  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ , a dwa warianty białka TgMTP1 transportują jony  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i  $Ni^{2+}$  [51, 61, 84-88]. Dotychczasowe wyniki badań wyraźnie wskazują, że nie można przewidywać funkcji nowo zidentyfikowanych genów kodujących transportery metali ciężkich u roślin tylko na podstawie informacji pochodzących z badań na roślinach modelowych. Oprócz białek typu MTP1, stosunkowo dobrze scharakteryzowano białka MTP8 i MTP11 należące do grupy Mn-CDF. Obydwa białka cechują się wysoką specyficznością wobec jonów manganu i odpowiadają za detoksykację cytoplazmy z nadmiaru tego metalu. Białka MTP8 lokalizują się w błonach wakuolarnych (OsMTP8.1 ryżu lub ShMTP8 hyperakumulatora manganu *Stylosanthes hamata*) lub błonach aparatu Golgiego (HvMTP8.1 i HvMTP8.2 jęczmienia), uczestnicząc odpowiednio, w akumulacji manganu w wakuoli lub dostarczaniu manganu do enzymów systemu Golgiego lub pęcherzyków szlaku wydzielniczego [52, 91, 92]. Natomiast białko MTP11 *A. thaliana* występuje w pęcherzykach Golgiego i kompartmentach pre-wakuolarnych i prawdopodobnie uczestniczy w usuwaniu nadmiaru manganu z cytoplazmy na drodze egzocytozy [82, 83]. U roślinnych hyperakumulatorów metali ciężkich geny kodujące białka MTP1 i MTP8 ulegają konstytutywnie wysokiej ekspresji i często występują w kilku kopiach (*MTP1*). *A. halleri* posiada pięć paralogów transportera MTP1, AhMTP1-A1, -A2, -B, -C, i -D, natomiast u *T. goesingense*, zidentyfikowano trzy paralogi tego białka: TgMTP1a–TgMTP1c [85, 89]. Zatem podobnie jak  $P_{1B}$ -ATPazy, białka MTP także mają istotne znaczenie dla zwiększonej akumulacji metali przez roślinne hyperakumulatory i hipertolerancji tych roślin na toksyczne jony. Jednak aby w pełni wykorzystać białka tej rodziny do modyfikacji roślin dla celów fitoremediacji, należy najpierw uzyskać informacje o funkcji, lokalizacji i właściwościach biochemicznych pozostałych, niezbadanych do tej pory białek MTP. Co więcej, ze względu na różnice w specyficzności i lokalizacji homologicznych białek MTP u różnych gatunków roślin, konieczne jest dokładne określenie specyficzności i lokalizacji subkomórkowej dotąd nie zbadanych białek MTP. Te informacje mogą mieć szczególne znaczenie podczas rozważania wykorzystania konkretnych białek transporterowych w procesie fitoekstrakcji metali z zakażonych gleb.

Postępujące sekwencjonowanie całych genomów roślinnych umożliwia rozwój badań nad genami kodującymi białka odpowiedzialne za transport metali u roślin, które dotąd nie były przedmiotem badań i pozwala uzyskać pełniejszy obraz fizjologicznej funkcji rodzin transporterów. Ogórek (*Cucumis sativus* L.) jest jedną z najbardziej popularnych roślin jadalnych na świecie i siódmą rośliną, której genom został zsekwencjonowany. Biochemiczne, fizjologiczne i cytogenetyczne analizy tej rośliny trwają od wielu lat, natomiast badania genetyczne, obejmujące identyfikację genów oraz funkcjonalną charakterystykę i lokalizację subkomórkową ich białkowych produktów toczą się powoli i dopóki sekwencja genomowa tej rośliny pozostawała nieznana, funkcja znakomitej większości genów ogórka była niewyjaśniona. W Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin opracowano szereg metod umożliwiających badania kinetyczne i biochemiczne transporterów błon plazmolemowych i tonoplastowych izolowanych z ogórka oraz bardzo dobrze scharakteryzowano aktywności i regulację enzymów markerowych tych błon, pomp protonowych plazmolemy ( $H^+$ -ATPazy) i tonoplastu (V-ATPazy i PPazy), odpowiadających za generację gradientu elektrochemicznego niezbędnego do wtórnego transportu metali przez błony. Dostępność tych metod, a od niedawna także nieograniczona dostępność do genomu ogórka, umożliwiła nam jednocześnie badania nad aktywnymi systemami transportującymi metale przez błony komórek ogórka oraz identyfikację białek odpowiedzialnych za te aktywności.

Moja praca nad identyfikacją aktywnych transporterów metali w komórkach ogórka rozpoczęła się w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Skupiłam się wtedy na kinetycznej charakterystyce aktywnego transportu metali ciężkich w błonie komórkowej (plazmolemie) komórek korzeni ogórka, poszukując systemów odpowiedzialnych za detoksykację tych komórek z nadmiaru metali. Nie wiadomo było wówczas, czy plazmolema komórek roślinnych może aktywnie uczestniczyć w wydzielaniu metali ciężkich z komórki. Dostępne badania i opracowania sugerowały, że to błona tonoplastowa zawiera systemy aktywnie transportujące metale z cytoplazmy do wakuoli, i że to wakuola jest głównym magazynem toksycznych jonów metali w komórkach roślinnych [93-95]. W efekcie badań przeprowadzonych do pracy doktorskiej wykazałam, że w błonach plazmolemowych korzeni ogórka funkcjonują aktywne transportery dwuwartościowych jonów metali ciężkich  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ , które działając na zasadzie antyportu  $H^+/Me^{2+}$ , usuwają te jony poza komórkę, z cytoplazmy do apoplastu [96,97]. Systemy te charakteryzują się stosunkowo niskim powinowactwem do transportowanych jonów metali (wykazują  $K_m$  od 0.1 mM do 7.5 mM w zależności od rodzaju jonu) i są wyraźnie stymulowane (o 30%-100%) w odpowiedzi na podwyższone stężenia metali w środowisku zewnętrznym, co wskazuje na ich istotne znaczenie w detoksykacji komórek korzeni ogórka z nadmiaru dwuwartościowych kationów metali [96,97]. Otrzymane wyniki były pierwszym dowodem na obecność w komórkach roślinnych plazmolemowych antyporterów  $H^+/Me^{2+}$  o nieznanym pochodzeniu, których

aktywność jest regulowana przez metale. Stały się one podstawą do przygotowania dwóch prac oryginalnych, opublikowanych w czasopismach *Plant Science* [96] i *Physiologia Plantarum* [97]. Niedługo potem, razem z panią Profesor Grażyną Kłobus i ówczesną doktorantką pani Profesor, panią magister Anną Papierniak przeprowadziłyśmy podobne analizy kinetyki wtórnego transportu metali w błonach tonoplastowych izolowanych z korzeni ogórka. W efekcie tych analiz potwierdziłyśmy wcześniejsze doniesienia [93-95] o aktywności zależnego od gradientu protonów antyportu  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  w błonach wakuolarnych komórek roślinnych, odpowiedzialnego za sekwestrację tych metali w wakuolach. Co ciekawe, tonoplastowe antyporterki metali wykazują 10-100-krotnie wyższe powinowactwo do transportowanych jonów ( $K_m$  od 0.01 mM do 0.08 mM, w zależności od rodzaju jonu) niż analogiczne systemy w plazmolemie, co sugeruje, że są one aktywowane w pierwszej kolejności w trakcie wzrastającego stężenia metali w cytoplazmie komórek korzeni. Wykazałyśmy także, że aktywność tonoplastowych antyporterów jonów metali jest pozytywnie regulowana w obecności metali balastowych i nadmiaru metali korzystnych w podłożu, a więc ma istotne znaczenie dla utrzymania wewnątrzkomórkowej równowagi jonowej w warunkach stresu metali ciężkich. Otrzymane wyniki pozwoliły nam jednoznacznie stwierdzić, że zarówno w błonach plazmolemowych jak i tonoplastowych komórek korzeni ogórka funkcjonują aktywne systemy usuwające kationy metali dwuwartościowych z cytoplazmy na drodze antyportu  $\text{H}^+/\text{Me}^{2+}$  i znacząco poszerzyły wiedzę na temat kinetyki i regulacji tych systemów.

## *II. Identyfikacja, charakterystyka i porównanie zależnych od ATP systemów transportu $\text{Cd}^{2+}$ w plazmolemie i tonoplaście komórek korzeni ogórka.*

Po obronie pracy doktorskiej, kontynuowałam badania nad transporterami metali u ogórka, skupiając się na identyfikacji i charakterystyce pierwotnego, czyli zależnego od ATP, transportu metali przez błony plazmolemowe i tonoplastowe komórek ogórka oraz porównaniem efektywności wtórnych i pierwotnych systemów transportujących jony metali w obydwu błonach. Badania prowadziłam przy wsparciu pani Profesor Grażyny Kłobus, pani magister Anny Papierniak, oraz studentki, a obecnie pani magister Eweliny Kosatki, która realizowała wówczas pod moją opieką pracę magisterską. Wykorzystując różnicę w oddziaływaniu specyficznego inhibitora P-ATPazy ortowanadanu sodu na pompy protonowe ( $\text{H}^+$ -ATPazy) i pompy metali ciężkich ( $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPazy) oraz substancje zapobiegające powstaniu gradientu elektrochemicznego w poprzek błony (gramicydyna,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) wykazałyśmy, że w komórkach korzeni ogórka funkcjonują aktywne pompy, które używają ATP jako źródła energii do usuwania jonów kadmu z cytoplazmy przez plazmolemę (do ściany komórkowej) i tonoplast (do wakuoli) [98]. Do tej pory obecność podobnych systemów pokazano tylko w

błonach tonoplastowych komórek roślinnych [99, 100]. Aktywność plazmolemowych i tonoplastowych ATPaz ogórka znacznie wzrastała w obecności kadmu w środowisku, co wskazuje na to, że mogą one pełnić istotną funkcję w detoksykacji komórek korzeni z kadmu, i że są regulowane przez kadm na poziomie transkrypcji kodujących je genów lub na poziomie potranslacyjnym [98]. Przeprowadzone przez nas analizy potwierdziły również obecność antyportu  $H^+/Cd^{2+}$  w błonach plazmolemowych i tonoplastowych komórek ogórka [98]. Porównanie kinetyki obydwu systemów transportujących kadm, zależnego od ATP (ATPazy) i zależnego od gradientu protonów (antyportery) wykazało, że ATPazy cechują się wyższym powinowactwem do kadmu ( $K_m \sim 2.5 \mu M$  dla ATPazy plazmolemowej,  $K_m \sim 6.6 \mu M$  dla ATPazy tonoplastowej) niż antyportery  $H^+/Cd^{2+}$  ( $K_m \sim 1 \text{ mM}$  dla plazmolemowego antyportera;  $K_m \sim 25 \mu M$  dla tonoplastowego antyportera), oraz że systemy tonoplastowe są bardziej efektywne w usuwaniu kadmu z cytoplazmy niż systemy plazmolemowe [98]. Ze względu na swoją toksyczność, metale ciężkie raczej nie występują w cytoplazmie w formie jonowej, ponieważ są bardzo szybko wiązane przez cytoplazmatyczne metalotioneiny, aminokwasy czy fitochelatyny, zawierające grupy hydroksylowe (-OH), karboksylowe (-COOH), oksymowe (=NOH), iminowe (=NH) i tiolowe (-SH) [101,102]. Zatem przypuszcza się, że to nie wolne jony metali ale kompleksy tych jonów są substratami dla białek transportujących metale ciężkie [101-103]. Aby przybliżyć naturę substratu dla plazmolemowych i tonoplastowych ATPaz transportujących kadm, analizowałyśmy aktywność tych systemów w obecności czynników zawierających grupy tiolowe (cysteina, DTT, GSH) i pierścień imidazolowy (histydyna). Badanie wykazało, że tylko czynniki zawierające grupy tiolowe istotnie stymulowały aktywność transportu kadmu zależnego od ATP w obydwu błonach komórek ogórka [98]. Co ciekawe, pozytywny efekt glutationu był eliminowany w obecności 0.1 mM ortowanadanu (stężenia inhibitorowego dla większości P-ATPaz i transporterów ABC), natomiast pozytywny efekt cysteiny i DTT był znoszony dopiero pod wpływem 1 mM ortowanadanu (stężenia inhibitorowego dla mniej wrażliwych  $P_{1B}$ -ATPaz) [98]. Dotychczasowe badania na bakteriach i drożdżach wykazały, że aktywność  $P_{1B}$ -ATPaz zależy od milimolarnych stężeń cysteiny, a białka ABC wykazują zdolność do transportu koniugatów glutationowo-kadmowych (GSH-Cd) [8,10,104-106]. Otrzymane przez nas wyniki wskazują zatem, że w błonach tonoplastowych i plazmolemowych komórek korzeni ogórka funkcjonują co najmniej trzy niezależne systemy transportujące aktywnie kadm: system transportu wtórnego - antyportu  $H^+/Cd^{2+}$  oraz dwa systemy zależne od ATP ( $P_{1B}$ -ATPazy i białka ABC), oraz sugerują, że głównym substratem białek zależnych od ATP jest kadm związany z grupami tiolowymi czynników, które chelatują jony tego metalu w komórkach [98]. Przeprowadzone badania po raz pierwszy pokazały, że w plazmolemie komórek roślinnych funkcjonuje transport  $Cd^{2+}$  zależny od ATP i porównały efektywność aktywnych plazmolemowych i tonoplastowych systemów transportujących kadm w

komórkach roślinnych [98]. Stały się one podstawą do przygotowania pracy oryginalnej, rozpoczynającej cykl monotematycznych publikacji:

- **Migocka M**, Papierniak A, Kosatka E, Kłobus G (2011) Comparative study of the active cadmium efflux systems operating at the plasma membrane and tonoplast of cucumber root cells. *Journal of Experimental Botany* 62(14):4903-16 [98]

Badania kinetyczne transportu metali w komórkach ogórka wyraźnie wskazywały, że zarówno w plazmolemie jak i w tonoplaście komórek korzeni występują białka katalizujące transport metali, zależny od energii pochodzącej z rozkładu ATP lub gradientu elektrochemicznego, które mogą stanowić ważny element mechanizmu detoksykacji komórek z nadmiaru metali. Kolejnym celem moich badań była identyfikacja i molekularna charakterystyka tych białek. Na podstawie wcześniejszych doniesień sugerujących, że dominującą rolę eksporterów metali z cytoplazmy komórek roślinnych mogą pełnić białka z rodzin MTP (antyportery metali) i HMA (ATP-zależne transportery metali), rozpoczęłam badania mające na celu molekularną charakterystykę genów kodujących te dwie rodziny białek u ogórka. Do współpracy, oprócz pani magister (obecnie doktor) Anny Papierniak i swoich magistrantów (Eweliny Posyniak, Anny Kosieradzkiej, Piotra Poździka, Tadeusza Marchewki i Roberta Biskupa) zaprosiłam pracowników Wydziału Nauk Biologicznych UWr, posiadających doświadczenie w stosowaniu metod, które umożliwiły charakterystykę molekularną białek ogórka: panią doktor Ewę Maciaszczyk-Dziubińską z Zakładu Genetyki i Fizjologii Komórki UWr, specjalizującą się w badaniu transportu metali i metaloidów w komórkach drożdży, oraz pana doktora Arnolda Garbca z Zakładu Biologii Rozwoju Zwierząt UWr, doświadczonego w obsłudze mikroskopu konfokalnego. Część badań (transformacje protoplastów i roślin *A. thaliana*) wykonałam także przy pomocy pani doktor Sophie Filleur (w CNRS, Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, Gif-sur-Yvette, Francja), podczas stażu finansowanego z programu Kapitał ludzki (projekt realizowany przez Uniwersytet Wrocławski pt. „Rozwój potencjału i oferty edukacyjnej Uniwersytetu Wrocławskiego szansą zwiększenia konkurencyjności Uczelni”).

### *III. Molekularna charakterystyka białek MTP ogórka*

Badania nad identyfikacją i charakterystyką białek MTP ogórka prowadziłam w ramach projektów badawczych finansowanych przez MNiSW (projekt nr IP2010 026470 pt. „Lokalizacja i funkcja transporterów metali ciężkich z rodziny CDF (MTP) u ogórka”) oraz Uniwersytet Wrocławski (projekt nr 2194/W/IBR/09 pt. „Charakterystyka pierwszego wtórnego transportera metali ciężkich z rodziny CDF u ogórka”). Genomy ogórków chińskiego (odmiana Chinese Long, linia 9930) i północnoeuropejskiego (odmiana

Borszczagowski, linia 10) zostały zsekwencjonowane [107,108] i zamieszczone w ogólnodostępnej bazie GenBank [109] w formie kontigów. Pełna sekwencja genomu ogórka Chinese long jest dostępna pod nr akcesji ACHR01000000, natomiast pełną sekwencję genomu ogórka Borszczagowski udostępniono pod numerem akcesji ACYN01000000. Wykorzystując algorytm BlastN [110], narzędzie bazy NCBI do znajdowania homologicznych genów, oraz sekwencje kodujące genów *AtMTP1-AtMTP12* *A. thaliana* jako sekwencje matrycowe, wyselekcjonowaliśmy kontigi z DNA obydwu ogórków zawierające homologi genów *MTP*. Następnie za pomocą programów FGENESH [111] i GeneMark [112] wyodrębniliśmy z każdego wyselekcjonowanego kontigu pełne sekwencje genów ogórkowych kodujących białka *MTP*. W efekcie przeprowadzonych analiz zebraliśmy sekwencje kodujące 11 genów *MTP* ogórka Chinese long (dwie kopie genu *CsMTP1*, dwie kopie genu *CsMTP4*, *CsMTP5*, *CsMTP6*, *CsMTP7*, *CsMTP8*, *CsMTP9*, *CsMTP11* i *CsMTP12*) i 9 genów *MTP* ogórka Borszczagowski (*CsMTP1*, *CsMTP4*, *CsMTP5*, *CsMTP6*, *CsMTP7*, *CsMTP8*, *CsMTP9*, *CsMTP11* i *CsMTP12*) [113]. Nazwy poszczególnym genom *MTP* ogórka nadawaliśmy, biorąc pod uwagę stopień podobieństwa białek kodowanych przez te geny do białek *AtMTP1-AtMTP12*. Analiza zebranych sekwencji wykazała, że różnice w genomach obydwu odmian ogórka wiążą się nie tylko z ilością kopii genów *MTP1* i *MTP4*, ale także z długością sekwencji niektórych genów *MTP*: sekwencje kodujące genów *CsMTP7* i *CsMTP11* są dłuższe o odpowiednio, 66 nukleotydów i 9 nukleotydów u ogórka odmiany Borszczagowski, natomiast sekwencja genu *CsMTP12* jest dłuższa o 6 nukleotydów u ogórka chińskiego. Mimo tych różnic, na podstawie otrzymanych wyników stwierdziliśmy, że obydwa genomy kodują potencjalnie 9 białek *MTP* [113]. Analiza filogenetyczna sekwencji białek *MTP* ogórka przewidzianych na podstawie zebranych sekwencji kodujących genów *CsMTP1-CsMTP12* oraz homologicznych białek u innych roślin (dwuliściennych: *A. thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera* i jednoliściennych: *O. sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Brachypodium distachyon*) wykazała, że białka *CsMTP1*, *CsMTP4*, *CsMTP5* i *CsMTP12* klasyfikują się do grupy Zn-CDF, białka *CsMTP6* i *CsMTP7* klasyfikują się do grupy Zn/Fe-CDF a białka *CsMTP8-CsMTP11* przynależą do grupy Mn-CDF [113]. Przeprowadzona analiza potwierdziła także, że trzy główne grupy roślinnych białek *MTP* dzielą się na 7 mniejszych podgrup, z których każda zawiera białka ogórka: podgrupy G1 (z białkami *CsMTP1* i *CsMTP4*), G5 (z białkiem *CsMTP5*) i G12 (z białkiem *CsMTP12*) w grupie transporterów cynkowych; podgrupy G6 (z białkiem *CsMTP6*) i G7 (z białkiem *CsMTP7*) w grupie transporterów cynkowo-żelazowych oraz podgrupy G8 (z białkiem *CsMTP8*) i G9 (z białkami *CsMTP9* i *CsMTP11*) w grupie transporterów manganowych [113].



Ponieważ do tej pory identyfikację i badania kinetyczne antyporterów transportujących metale prowadziliśmy na korzeniach ogórka, najbardziej interesowały nas te geny *CsMTP*, które ulegały ekspresji w korzeniach. Co więcej, badania kinetyczne transportu metali w komórkach korzeni wykazały, że  $Cd^{2+}$  i  $Pb^{2+}$  a także podwyższone stężenia metali korzystnych  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  stymulują aktywność antyportu jonów tych metali zarówno w plazmolemie jak i w tonoplaście. W związku z tym, wśród wszystkich genów *CsMTP* ulegających ekspresji w korzeniach najbardziej interesowały nas geny, których ekspresja znacznie wzrastała w odpowiedzi na podwyższone stężenia metali ciężkich w środowisku. Mając do dyspozycji wszystkie sekwencje kodujące, zaprojektowaliśmy specyficzne startery do badania ekspresji genów *CsMTP* w różnych organach ogórka oraz w warunkach stresu metali ciężkich (nadmiar metali, deficyt cynku, deficyt manganu). Najbardziej interesujące wyniki uzyskaliśmy dla genów kodujących białka *CsMTP1*, *CsMTP4*, *CsMTP8* i *CsMTP9*, homologiczne do białek, które u innych roślin są multispecyficzne lub specyficzne dla cynku (wakuolarny/plazmolemowy MTP1), specyficzne dla manganu (wakuolarny MTP8) albo do tej pory jeszcze nie zbadane (MTP4 i MTP9). Analiza aktywności transkrypcyjnej tych genów w różnych organach ogórka wykazała, że *CsMTP8* i *CsMTP9* ulegają ekspresji tylko w korzeniach, natomiast *CsMTP1* i *CsMTP4* ulegają ekspresji we wszystkich organach wegetatywnych [113-115]. Dodatkowo, transkrypt genu *CsMTP1* wykryto także w elementach generatywnych kwiatów, słupkach i pręcikach [114]. Wszystkie cztery geny były aktywne transkrypcyjnie w korzeniach, zatem ich białkowe produkty mogły katalizować antyport jonów metali zmierzony w błonach plazmolemowych i tonoplastowych izolowanych z korzeni. Co więcej, poziom ekspresji genów *CsMTP1*, *CsMTP4*, *CsMTP8* i *CsMTP9* w korzeniach istotnie zależał od stężenia metali w środowisku. Najniższą ekspresję genów *CsMTP1* i *CsMTP4* obserwowano w warunkach deficytu cynku (odpowiednio, 3-krotnie lub 14-krotnie niższą niż w kontroli), najwyższą w warunkach nadmiaru cynku (odpowiednio, o 25% lub 40% wyższą niż w kontroli) [114]. Z kolei ekspresja genów *CsMTP8* i *CsMTP9* w korzeniach ogórków była regulowana przez mangan, a w przypadku *CsMTP9* także przez kadm. W porównaniu z kontrolą (optymalne stężenie Mn w pożywkach), poziom mRNA genów *CsMTP8* i *CsMTP9* był odpowiednio dwukrotnie i trzykrotnie niższy w warunkach deficytu manganu lub 2,5-3-krotnie wyższy w obecności toksycznego stężenia tego metalu w pożywkach [113,115]. Ekspresja *CsMTP9*, była również istotnie zwiększona (2.5-krotnie) pod wpływem kadmu [115]. Otrzymane wyniki sugerowały, że geny *CsMTP1*, *CsMTP4*, *CsMTP8* i *CsMTP9* kodują białka zaangażowane w odpowiedź ogórków na stres wynikający z obecności  $Cd^{2+}$  lub nadmiaru/niedoboru metali korzystnych,  $Zn^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  w środowisku. Aby wyjaśnić dokładniej rolę tych białek w homeostazie metali w korzeniach, w dalszym etapie pracy analizowaliśmy lokalizację subkomórkową i specyficzność substratową transporterów *CsMTP1*, *CsMTP4*, *CsMTP8* i *CsMTP9*.

Specyficzność substratową białek ogórka badaliśmy w szczepach mutantów drożdży *S. cerevisiae* z delecją genów kodujących endogenne transportery jonów metali ciężkich:

- w szczepie  $\Delta zrc1$  o zwiększonej wrażliwości na Zn, z delecją genu kodującego wakuolarny transporter jonów  $Zn^{2+}$  Zrc1p [66];
- w szczepie  $\Delta cot1$  o zwiększonej wrażliwości na Co, z delecją genu kodującego wakuolarny transporter jonów  $Co^{2+}$  Cot1p [64];
- w szczepie  $\Delta pmr1$  o zwiększonej wrażliwości na Mn, z delecją genu kodującego transporter jonów  $Mn^{2+}$  Pmr1p w aparacie Golgiego [116];
- w szczepie K667 ( $\Delta cnb1\Delta vcx1\Delta pmc1$ ) o zwiększonej wrażliwości na  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , i  $Cd^{2+}$ , z potrójną delecją genów kodujących regulatorową podjednostkę kalcyneuryny Cnb1p, wakuolarny antyporter  $Ca^{2+}/Mn^{2+}/Cd^{2+}$  VCX1 oraz wakuolarną pompę transportującą  $Ca^{2+}$  PMC1 [117,118];

Pełne sekwencje genów kodujących białka CsMTP1, CsMTP4, CsMTP8 i CsMTP9 ligowaliśmy do drożdżowych wektorów ekspresyjnych (pUG35 i pUG36 - wektory kilkukopijne umożliwiające fuzję badanego genu z genem białka zielonej fluorescencji GFP odpowiednio, na końcu 3' lub 5' badanego genu; pDEST52 – wektor multikopijny, umożliwiający wysoki poziom ekspresji badanych genów w fuzji z epitopami 6xHis i V5) i wprowadzono do drożdży. Efektywność ekspresji genów ogórka w drożdżach sprawdzano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (obserwując fluorescencję białka GFP dołączonego do białek ogórka w komórkach transformantów) oraz wykorzystując przeciwciała skierowane przeciw białku GFP lub epitopowi V5 w analizie Western blot białek izolowanych z transformantów. Obserwacje fluorescencji białka GFP dołączonego do białek ogórka pozwoliły ustalić lokalizację subkomórkową białek CsMTP1, CsMTP4, CsMTP8 i CsMTP9 w komórkach transformantów drożdżowych. W przypadku białek fuzyjnych CsMTP1-GFP, CsMTP4-GFP i CsMTP8-GFP sygnał zielonej fluorescencji białka GFP kolokalizował z błonami organelli wewnątrzkomórkowych (endomembranami) drożdży, natomiast fluorescencję białka fuzyjnego CsMTP9-GFP obserwowano w błonie komórkowej grzybów [113-115]. Analizy Western blot białek błonowych izolowanych z transformantów potwierdziły, że CsMTP9-GFP wiąże się z frakcją błony komórkowej, natomiast CsMTP1-GFP, CsMTP4-GFP i CsMTP8-GFP lokalizują się w błonach wakuolarnych drożdży [113-115]. Analizy fenotypowe transformantów drożdży na podłożach wzbogaconych w  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  lub  $Ni^{2+}$  wykazały, że białka ogórka komplementują fenotyp delecji niektórych genów transporterów metali, a więc uczestniczą w transporcie jonów tych metali w komórkach drożdży. Szczepy K667 i  $\Delta zrc1$  z ekspresją genów *CsMTP1* i *CsMTP4* odzyskiwały zdolność do wzrostu w obecności, odpowiednio  $Cd^{2+}$  i podwyższonych stężeń  $Zn^{2+}$ , co w połączeniu z lokalizacją produktów białkowych tych genów w błonie wakuolarniej komórek drożdży sugerowało udział obydwu białek ogórka w transporcie  $Cd^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  do

wakuoli [114]. Z kolei ekspresja genów *CsMTP8* i *CsMTP9* w drożdżach komplementowała fenotyp delecji drożdżowych genów związanych z opornością na Mn, *VCX1* w szczepie K667 i *PMR1* w szczepie  $\Delta pmr1$  [113, 115]. Ponadto szczep K667 z ekspresją genu *CsMTP9* cechował się zwiększoną odpornością na  $Cd^{2+}$  [115]. Otrzymane wyniki sugerowały, że wakuolarnie białko *CsMTP8* jest wysoce selektywne dla jonów  $Mn^{2+}$  i prawdopodobnie uczestniczy w sekwestracji jonów tego metalu w wakuoli; natomiast plazmolemowe białko *CsMTP9* wykazuje zdolność do transportu jonów  $Mn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$ , i może odpowiadać za wydzielanie jonów obydwu metali z komórek drożdży [113, 115]. Analizy akumulacji metali w komórkach drożdży wykazały, że ekspresja genów *CsMTP1* lub *CsMTP4* w szczepach  $\Delta zrc1$  i K667 powodowała zwiększoną akumulację odpowiednio,  $Zn^{2+}$  (około 2-krotnie w porównaniu z kontrolą) i  $Cd^{2+}$  (w przybliżeniu o 30-50% w porównaniu z kontrolą) w komórkach transformantów [114]. Podobnie aktywność białka *CsMTP8* w drożdżach K667 przejawiała się zwiększoną akumulacją  $Mn^{2+}$  (około 2-krotnie w porównaniu z kontrolą) w komórkach tego szczepu [113]. Zatem otrzymane wyniki potwierdziły hipotezę o udziale białek *CsMTP1*, *CsMTP4* i *CsMTP8* w sekwestracji  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  w komórkach drożdży. W przeciwieństwie do *CsMTP1*, *CsMTP4* i *CsMTP8*, aktywność białka *CsMTP9* w szczepie K667 istotnie wpływała na obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów  $Cd^{2+}$  (prawie 2-krotnie w porównaniu z kontrolą) i  $Mn^{2+}$  (prawie 3-krotnie w porównaniu z kontrolą), powodując zwiększone wydzielanie obydwu metali z komórek drożdży [115]. Analizy kinetyki transportu metali przez błony izolowane z komórek transformantów ostatecznie dowiodły, że *CsMTP1*, *CsMTP4* i *CsMTP8* transportują odpowiednio,  $Cd^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  oraz  $Mn^{2+}$  przez błony wakuolarnie, natomiast *CsMTP9* katalizuje transport  $Cd^{2+}$  i  $Mn^{2+}$  przez błony plazmolemowe komórek drożdży, oraz że wszystkie badane białka działają na zasadzie antyportu  $H^+/Me^{2+}$  i wykazują zdolność do tworzenia homodimerów w błonach [113-115]. Co więcej, wykazaliśmy że ortologi *CsMTP1* i *CsMTP4* (grupa Zn-CDF) oraz *CsMTP8* i *CsMTP9* (grupa Mn-CDF) różnią się powinowactwem do transportowanych metali, mimo podobnej budowy strukturalnej. Białko *CsMTP1* cechuje się 2-krotnie większym powinowactwem do  $Cd^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  niż białko *CsMTP4*, przy czym obydwie białka wykazują 5-krotnie większe powinowactwo do jonów  $Zn^{2+}$  niż do jonów  $Cd^{2+}$  [114]. Wydaje się zatem, że głównym fizjologicznym substratem dla białek *CsMTP1* i *CsMTP4* są jony cynku, i że funkcja tych białek jest aktywowana w zależności od aktualnego poziomu cynku w komórkach. Z kolei wakuolarnie białko *CsMTP8* wykazuje 4-krotnie wyższe powinowactwo do  $Mn^{2+}$  niż jego plazmolemowy ortolog *CsMTP9*, który charakteryzuje się wyższym powinowactwem do  $Cd^{2+}$  niż do  $Mn^{2+}$  [113,115]. Podobnie jak w przypadku *CsMTP1* i *CsMTP4*, można przypuszczać, że aktywność *CsMTP8* i *CsMTP9* jest regulowana w zależności od wewnątrzkomórkowego statusu  $Mn^{2+}$  aby zapewnić w pierwszej kolejności sekwestrację i ewentualny zapas  $Mn^{2+}$  w wakuoli (*CsMTP8*) a w drugiej - transport tego metalu poza komórkę (*CsMTP9*).

W celu potwierdzenia lokalizacji i regulacji przez metale natywnych białek MTP w ogórku zsyntetyzowano komercyjnie przeciwciała reagujące ze specyficznymi peptydami w obrębie końców aminowych lub karboksylowych białek CsMTP1, CsMTP4 i CsMTP9. Immunolokalizacja białek we frakcjach błonowych izolowanych z korzeni ogórka potwierdziła, że białka CsMTP1 i CsMTP4 lokalizują się we frakcjach wzbogaconych w błony tonoplastowe, natomiast białko CsMTP9 występuje we frakcjach wzbogaconych w plazmolemę [114,115]. Następnie analizowano zmiany poziomu badanych białek w błonach izolowanych z korzeni w odpowiedzi na stres metali ciężkich. Mimo, iż poziom transkryptów genów *CsMTP1* i *CsMTP4* wzrastał tylko nieznacznie w obecności podwyższonego stężenia cynku (o 25% lub 40% w porównaniu z kontrolą), w tych samych warunkach poziom tonoplastowych białek kodowanych przez te geny wzrastał 4-krotnie [114]. Można zatem przypuszczać, że cynk reguluje aktywność białek CsMTP1 i CsMTP4 na drodze po-transkrypcyjnej lub po-translacyjnej, np. wpływając na syntezę białek lub na ich stabilność w błonie wakuolarnej. W przypadku CsMTP9, zmiany ekspresji genu kodującego to białko ściśle korelowały ze zmianami poziomu białka w plazmolemie: poziom CsMTP9 znacznie wzrastał po wpływie  $Cd^{2+}$  i toksycznego stężenia  $Mn^{2+}$ , ale był istotnie zredukowany w warunkach deficytu  $Mn^{2+}$  w podłożu [115]. Zwiększenie ilości białek CsMTP1, CsMTP4 i CsMTP9 odpowiednio w tonoplaście i w plazmolemie komórek korzeni w odpowiedzi na stres metali ciężkich potwierdza ich udział w detoksykacji tych komórek z nadmiaru metali (usuwaniu metali do wakuoli i apoplastu). Co więcej, tkankowa lokalizacja białka CsMTP9 w korzeniach ogórka wykazała, że transporter znajduje się prawie wyłącznie w plazmolemie endodermy, i że jego lokalizacja jest spolaryzowana: występuje tylko w tej części błony, która bezpośrednio przylega do perycyklu [115]. Można zatem przypuszczać, że CsMTP9 odpowiada za kierunkowy transport Mn z endodermy do perycyklu i tkanek przewodzących, uczestnicząc w dalekim transporcie metalu z korzeni do części nadziemnych rośliny. Otrzymane wyniki są pierwszym dowodem na spolaryzowaną lokalizację białka z rodziny MTP w tkankach roślinnych.

Lokalizację, a w przypadku CsMTP8 i CsMTP9 także funkcję białek MTP ogórka ostatecznie potwierdziliśmy wykorzystując protoplasty i rośliny *A. thaliana* jako heterologiczny system ekspresyjny. Pełne sekwencje kodujące białka CsMTP1, CsMTP4, CsMTP8 lub CsMTP9 wprowadziliśmy do wektorów wykorzystywanych do ekspresji genów roślinnych w protoplastach i roślinach (pMDC83 i pMDC43 - wektory umożliwiające fuzję badanego genu z genem białka zielonej fluorescencji GFP odpowiednio, na końcu 3' lub 5' badanego genu). Konstrukty wektorowe wprowadziliśmy następnie do protoplastów izolowanych z zawiesziny komórek *A. thaliana*. Obserwacje mikroskopowe transformowanych protoplastów potwierdziły lokalizację tonoplastową białek CsMTP1, CsMTP4, CsMTP8 i plazmolemową białka CsMTP9 [113-115]. Dodatkowo, konstrukty niosące geny *CsMTP8* i *CsMTP9*

wprowadziliśmy do roślin *A. thaliana* metodą „floral-dip” wykorzystując *Agrobacterium tumefaciens* do infekcji. Analiza fenotypu i składu mineralnego transformowanych linii homozygotycznych na podłożach wzbogaconych w metale ciężkie potwierdziła udział białek ogórka w sekwestracji nadmiaru  $Mn^{2+}$  w komórkach korzeni (CsMTP8) oraz usuwaniu  $Cd^{2+}$  i nadmiaru  $Mn^{2+}$  z korzeni do części nadziemnych roślin (CsMTP9) [113,115]. Wszystkie wyniki dotyczące lokalizacji i funkcji białek CsMTP1, CsMTP4, CsMTP8 i CsMTP9 opublikowaliśmy w formie trzech prac oryginalnych, załączonych do monotematycznego cyklu publikacji:

- **Migocka M**, Papierniak A, Kosieradzka A, Posyniak E, Maciaszczyk-Dziubińska E, Biskup R, Garbiec A, Marchewka T (2015) Cucumber Metal Transport Protein CsMTP9 is a plasma membrane  $H^+$ -coupled antiporter involved in the  $Mn^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  efflux from root cells. *The Plant Journal*, DOI: 10.1111/tpj.13056 [115]
- **Migocka M**, Kosieradzka A, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Posyniak E, Garbiec A, Filleur S (2015) Two metal-tolerance proteins, MTP1 and MTP4, are involved in Zn homeostasis and Cd sequestration in cucumber cells. *Journal of Experimental Botany* 66(3): 1001-1015 [114]
- **Migocka M**, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Poździk P, Posyniak E, Garbiec A, Filleur S (2014) Cucumber metal transport protein MTP8 confers increased tolerance to manganese when expressed in yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 65(18):5367-84 [113]

Reasumując, dotychczasowa charakterystyka molekularna białek MTP ogórka pozwoliła zidentyfikować białka, których funkcja polega na aktywnym, zależnym od gradientu elektrochemicznego usuwaniu  $Cd^{2+}$  oraz nadmiaru  $Mn^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  do wakuoli i ściany komórkowej, a zatem wiąże się z detoksykacją komórek ogórka z jonów tych metali. Możemy zatem stwierdzić, że białka CsMTP1, CsMTP4, CsMTP8 i CsMTP9 mogą odpowiadać za plazmolemowy antyport  $H^+/Cd^{2+}$  i  $H^+/Mn^{2+}$  (CsMTP9) oraz tonoplastowy antyport  $H^+/Mn^{2+}$  (CsMTP8),  $H^+/Cd^{2+}$  i  $H^+/Zn^{2+}$  (CsMTP1 i CsMTP4), które zidentyfikowaliśmy wcześniej w błonach izolowanych z korzeni ogórka [96-98 i dane niepublikowane].

#### *IV. Molekularna charakterystyka białek HMA ogórka.*

Badania nad identyfikacją i charakterystyką białek HMA ogórka prowadziłam w ramach projektów badawczych finansowanych przez MNiSW (projekt nr IP2011 035871 pt. „Selekcja i molekularna charakterystyka transporterów z rodziny  $P_{1B}$ -ATPaz, związanych z detoksykacją komórek ogórka z nadmiaru metali ciężkich”) oraz Uniwersytet Wrocławski (projekt nr 1227/M/IBR/11 pt. „Znaczenie i funkcja białka CsHMA5A w komórkach ogórka”) we współpracy z panią doktor Ewą Maciaszczyk-Dziubińską, panią doktor Anną Papierniak i

moimi magistrantkami, Ewelina Posyniak i Anną Kosieradzką. Geny kodujące białka HMA ogórka wyszukiwałyśmy w bazie GenBank [109], analogicznie jak geny *MTP*: wykorzystując dostępny na stronie internetowej NCBI algorytm bioinformatyczny BlastN przeszukiwałyśmy kontigi zawierające DNA ogórka używając jako sekwencji matrycowych cDNA genów *AtHMA1-AtHMA8* *A. thaliana*. Sekwencje kodujące białka generowałyśmy przy pomocy programów FGENESH [111] i GeneMark [112]. Analizy wykazały, że w genomie ogórka występują pojedyncze homologi następujących genów *AtHMA1*, *AtHMA3*, *AtHMA4*, *AtHMA6*, *AtHMA7* i *AtHMA8* a także dwa homologi genu *AtHMA5* [119]. Zatem rodzina genów *HMA* u ogórka jest nieco inaczej zorganizowana niż rodzina genów *AtHMA*: liczba genów kodujących białka z grupy transporterów  $Zn^{2+}/Cd^{2+}/Pb^{2+}$  ( $P_{1B2}$ -ATPazy HMA2-HMA4) jest zredukowana do dwóch, natomiast liczba genów kodujących ATPazy miedziowe ( $P_{1B1}$ -ATPazy HMA5-HMA8) jest wielokrotniona do pięciu. Bazując na stopniu homologii między białkami kodowanymi przez geny ogórka i rzodkiewnika oraz analizie filogenetycznej białek HMA ogórka i innych gatunków roślin, nazwałyśmy i przyporządkowałyśmy  $P_{1B}$ -ATPazy ogórka do następujących podgrup:  $P_{1B1}$ -ATPaz obejmujących białka CsHMA5A, CsHMA5B, CsHMA6, CsHMA7 i CsHMA8;  $P_{1B2}$ -ATPaz obejmujących białka CsHMA3 i CsHMA4 oraz  $P_{1B4}$ -ATPaz z jednym białkiem CsHMA1 [119]. W trakcie dalszej pracy nad białkami CsHMA5 zmieniłyśmy nazwy białek CsHMA5A i CsHMA5B na odpowiednio, CsHMA5.1 i CsHMA5.2, dostosowując je do powszechnie obowiązującej nomenklatury roślinnych izoform białek HMA [120]. Wszystkie zidentyfikowane białka HMA posiadały cechy właściwe rodzinie  $P_{1B}$ -ATPaz: strukturę białek błonowych z 8 potencjalnymi helisami transbłonowymi oraz locus HP i specyficzne motywy CPC/SPC, GDGXNDXP, TGD/GEGINDAP, DEFGEXXSK, CXXC/CCXXE czy ciągi reszt histydynowych, związane z transportem jonów metali [119,120]. Bazując na dotychczasowych wynikach badań nad białkami HMA u innych roślin założyliśmy, że cztery spośród ośmiu zidentyfikowanych  $P_{1B}$ -ATPaz ogórka mogą być potencjalnie zaangażowane w detoksykację komórek tej rośliny z nadmiaru metali ciężkich: homologi ATPaz związanych z usuwaniem jonów cynku, kadmu i ołowiu z komórek roślinnych - CsHMA3 i CsHMA4, oraz homologi ATPazy HMA5 związanej z detoksykacją korzeni rzodkiewnika i ryżu z nadmiaru miedzi - CsHMA5.1 i CsHMA5.2. Otrzymane wyniki analiz *in silico* wykorzystaliśmy do skonstruowania starterów specyficznych dla wybranych genów *CsHMA*, które posłużyły do ustalenia profilu ekspresji organowej tych genów w ogórku oraz analizy poziomu ich transkryptów w warunkach nadmiaru lub deficytu metali ciężkich w środowisku. Transkrypcję genów *CsHMA3*, *CsHMA4*, *CsHMA5.1* i *CsHMA5.2* analizowaliśmy w organach wegetatywnych (korzenie, hipokotyle, liścienie, liście, owoce, okwiaty męskie i żeńskie) i generatywnych (pręciki i słupki kwiatowe) ogórków. Wszystkie badane geny ulegały ekspresji na znacznym poziomie w korzeniach, a więc mogły kodować białka zaangażowane w detoksykację korzeni z nadmiaru jonów toksycznych metali

[119,120]. Poziom transkryptów genów *CsHMA3*, *CsHMA4* i *CsHMA5.1* był bardzo niski (*CsHMA4*) lub prawie niewykrywalny (*CsHMA3* i *CsHMA5.1*) w hipokotylu, liścieniach i liściach, co sugerowało, że w młodych siewkach ogórka są to białka pełniące funkcje specyficznie związane z korzeniami [119,120]. Natomiast ekspresja genu *CsHMA5.2* była najwyższa w hipokotylach, ogonkach liściowych i korzeniach, ale także wyraźnie wykrywalna w liścieniach i liściach, wskazując na udział produktu białkowego tego genu w funkcjonowaniu wszystkich organów młodych siewek ogórków [120]. Dwa z badanych genów, *CsHMA4* i *CsHMA5.2* ulegały także bardzo wysokiej ekspresji we wszystkich elementach kwiatów i w owocu, co może świadczyć o istotnej funkcji białek *CsHMA4* i *CsHMA5.2* w rozwoju i funkcji tych organów, oraz zaopatrywaniu zarodków i nasion w metale korzystne [119,120]. Poza *CsHMA4* i *CsHMA5.2*, także gen *CsHMA3* ulegał bardzo wysokiej ekspresji w owocach, sugerującej udział jego białkowego produktu w zaopatrywaniu nasion i zarodków w metale korzystne [119]. Analiza ekspresji genów ogórka w korzeniach w warunkach stresu metali ciężkich wykazała, że poziom transkryptów trzech badanych genów znacznie (kilkukrotnie) wzrasta w obecności  $Pb^{2+}$  i toksycznych stężeń  $Zn^{2+}$  (*CsHMA3* i *CsHMA4*),  $Cd^{2+}$  (*CsHMA3*) oraz toksycznych stężeń  $Cu^{2+}$  (*CsHMA5.2*) [119,120]. Co więcej, ekspresja dwóch badanych genów była znacznie zredukowana w warunkach deficytu metali korzystnych: cynku (*CsHMA4*) i miedzi (*CsHMA5.2*) [119,120]. Nie stwierdziliśmy natomiast żadnych zmian w ekspresji genu *CsHMA5.1* pod wpływem stresu metali ciężkich [120]. Otrzymane wyniki wyraźnie sugerowały, że białka *CsHMA3*, *CsHMA4* i *CsHMA5.2* mogą uczestniczyć w odpowiedzi roślin ogórka na stres wywołany obecnością  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  lub nadmiaru  $Cu^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  w środowisku. Aby ustalić lokalizację subkomórkową badanych białek w korzeniach ogórka, zamplikowaliśmy pełne sekwencje kodujące białka *CsHMA3*, *CsHMA4*, *CsHMA5.1* i *CsHMA5.2* (w celu potwierdzenia ich zgodności z sekwencjami dostępnymi w bazie GenBank) i na podstawie sekwencji aminokwasowych białek kodowanych przez te geny, wybraliśmy krótkie fragmenty peptydów specyficznych w obrębie każdego białka, które zostały użyte do komercyjnej syntezy specyficznych przeciwciał. Immunolokalizacja białek ogórka we frakcjach błonowych izolowanych z komórek korzeni wykazała, że  $P_{1B}$ -ATPazy *CsHMA3*, *CsHMA5.1* i *CsHMA5.2* lokalizują się we frakcjach wzbogaconych w błony tonoplastowe, natomiast białko *CsHMA4* kolokalizuje z frakcjami wzbogaconymi w błony plazmolemowe [119,120]. Zsyntetyzowane przeciwciała wykorzystaliśmy następnie do określenia poziomu badanych białek w warunkach stresu metali ciężkich. Uzyskane wyniki z analiz Western blot w pełni korelowały z wcześniejszymi wynikami z analiz ekspresji genów *CsHMA3*, *CsHMA4*, *CsHMA5.1* i *CsHMA5.2* w tych samych warunkach. Mianowicie poziom dwóch tonoplastowych białek ogórka, *CsHMA3* i *CsHMA5.2* był znacznie podwyższony po wpływie odpowiednio,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ , nadmiaru  $Zn^{2+}$  oraz nadmiaru  $Cu^{2+}$ , natomiast poziom plazmolemowego białka *CsHMA4* zwiększał się pod

wpływem  $Pb^{2+}$  i nadmiaru  $Zn^{2+}$  [119,120]. Z kolei deficyt  $Zn^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  w podłożu powodował istotną redukcję, odpowiednio białka CsHMA4 w błonach plazmolemowych i białka CsHMA5.2 w błonach tonoplastowych izolowanych z korzeni ogórków [119,120]. Tak więc zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących badane białka, wynikające z działania  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  oraz  $Cu^{2+}$  przekładają się na zmiany ilościowe białek a zatem, prawdopodobnie na zmiany aktywności transportu metali przez błony tonoplastowe i plazmolemowe. Jednakże dla ustalenia fizjologicznej funkcji białek CsHMA3, CsHMA4, CsHMA5.1 i CsHMA5.2 kluczowe było określenie specyficzności substratowej tych transporterów. Badania mające wyjaśnić, które z kationów metali ciężkich są substratami białek CsHMA prowadziłyśmy analogicznie jak w przypadku białek CsMTP, z wykorzystaniem drożdży jako heterologicznych systemów ekspresji genów ogórka. Pełne sekwencje kodujące białka ogórka ligowałyśmy albo do wektora pUG35-GFP (CsHMA5.1 i CsHMA5.2), umożliwiającego syntezę białek ogórka w fuzji z białkiem GFP na końcu karboksylowym, albo do wektora pYES-DEST52, umożliwiającego syntezę badanych białek w fuzji z epitopami 6xHis i V5 na końcu karboksylowym (CsHMA3 i CsHMA4). Ekspresję genów ogórka w drożdżach sprawdzaliśmy wykorzystując przeciwciała skierowane do białek ogórka, białka GFP lub epitopu V5, oraz za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (w przypadku białek CsHMA5.1-GFP i CsHMA5.2-GFP). Obserwacje mikroskopowe drożdży z ekspresją genów CsHMA5.1 i CsHMA5.2 wykazały, że podobnie jak w komórkach korzeni ogórka, białka CsHMA5.1 i CsHMA5.2 także u drożdży lokalizują się w błonie wakuolarnej [120]. Otrzymane wyniki potwierdziłyśmy w analizach Western blot z użyciem frakcji wzbogaconych w błony komórkowe lub wakuolarne, izolowanych z transformantów drożdżowych z ekspresją genów ogórka. Wykazałyśmy, że białko CsHMA4 jest związane z frakcją plazmolemową komórek drożdży, natomiast białka CsHMA3, CsHMA5.1 i CsHMA5.2 występują we frakcji wzbogaconej w błony wakuolarne [119,120]. Następnie analizowałyśmy efekty ekspresji genów ogórka na fenotyp mutantów drożdży o zwiększonej wrażliwości na różne metale ciężkie. W trakcie badania, oprócz opisanych wcześniej szczepów o zwiększonej wrażliwości na jony  $Co^{2+}$  ( $\Delta cot1$ ),  $Zn^{2+}$  ( $\Delta zrc1$ ) i  $Mn^{2+}$  ( $\Delta pmr1$ ) wykorzystaliśmy szczepy mutantów o zwiększonej wrażliwości na  $Cu^{2+/+}$  (szczep  $\Delta ace1$  z delecją genu kodującego czynnik transkrypcyjny Ace1 aktywujący geny odpowiedzi na stres oksydacyjny [121,122]) i  $Cd^{2+}$  (szczep  $\Delta ycf1$  z delecją genu kodującego zależną od ATP wakuolarną pompę Ycf1 z rodziny ABC, transportującą koniugaty Cd-GSH do wakuoli drożdży [104]). Transformanty drożdżowe hodowałyśmy na podłożach wzbogaconych w różne metale. Badanie wykazało, że drożdże z ekspresją genu białka CsHMA3 są bardziej odporne na  $Cd^{2+}$  i  $Pb^{2+}$ , drożdże z ekspresją genu białka CsHMA4 są bardziej odporne na  $Cd^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , natomiast drożdże z ekspresją genów białka CsHMA5.1 lub CsHMA5.2 są bardziej odporne na  $Cu^{2+/+}$  i  $Ag^+$  [119,120]. Pomiar akumulacji metali w komórkach drożdży z ekspresją genów ogórka



pozwoili wyjaŝniÄ mechanizm opornoŝci zwiÄzanej z białkami kodowanymi przez te geny. Mianowicie drożdże z ekspresją genów kodujÄcych białka wakuolarne ogórka akumulowały do 1,5-2-razy wiÄcej  $Pb^{2+}$  i  $Cd^{2+}$  (CsHMA3) lub  $Cu^{2+/+}$  (CsHMA5.1 i CsHMA5.2) w komórkach niŝ drożdże transformowane pustymi wektorami [119,120]. Zatem zwiÄkszona tolerancja szczepów z ekspresją genów kodujÄcych transportery CsHMA3, CsHMA5.1 i CsHMA5.2 na  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  i  $Cu^{2+/+}$  wynikała ze zwiÄkszonej sekwestracji jonów tych metali w wakuolach drożdży, katalizowanej przez białka ogórka. Z drugiej strony drożdże z ekspresją genu kodujÄcego plazmolemowe białko CsHMA4 akumulowały nawet 1,5-2-krotnie mniej  $Cd^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  w komórkach, w porównaniu ze szczepami transformowanymi pustym wektorem, co wyraŝnie wskazywało na udział białka ogórka w usuwaniu metali z komórek drożdży [119].

Ostatecznie aktywnoŝÄ hydrolityczną i transportową białek CsHMA3, CsHMA4, CsHMA5.1 i CsHMA5.2 potwierdziłyŝmy analizujÄc kinetykÄ transportu jonów metali i hydrolizÄ ATP w błonach zawierajÄcych białka ogórka, wyizolowanych z transformantów drożdżowych. Wykazałyŝmy, ŝe hydroliza ATP przez ATPazy CsHMA5.1 i CsHMA5.2 zachodzi tylko w obecnoŝci jednowartoŝciowych jonów  $Cu^+$  i  $Ag^+$ , oraz ŝe jest znacznie (około 2-krotnie) stymulowana przez cysteinÄ [120]. Juŝ wcześniejsze badania nad homologicznymi białkami u bakterii i *A. thaliana* wykazały, ŝe  $P_{1B1}$ -ATPazy mogÄ transportowaÄ nie tylko  $Cu^+$  ale takŝe  $Ag^+$ , ze wzglÄdu na fizyczne podobieŝstwo obydwu jonów do siebie (ładunek, promieŝ jonowy) [17]. W przeciwieŝstwie do CsHMA5.1 i CsHMA5.2, aktywnoŝÄ hydrolityczna  $P_{1B2}$ -ATPaz CsHMA3 i CsHMA4 wymagała obecnoŝci dwuwartoŝciowych jonów  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  i  $Pb^{2+}$  ale równieŝ była stymulowana w obecnoŝci cysteiny [119]. Jak wcześnieŝ wspomniano, cysteina stymuluje takŝe aktywnoŝÄ homologicznych białek bakteryjnych i roŝlinnych prawdopodobnie dlatego, ŝe tworzy kompleksy z wolnymi jonami metali bÄdÄce właŝciwymi substratami dla białek transporterowych [10,123]. Maksymalną aktywnoŝÄ ATPaz ogórka obserwowaliśmy w obecnoŝci 5  $\mu M$  ( $Cu^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) i 10  $\mu M$  ( $Ag^+$ ) stÄŝeŝ metali, natomiast wyŝsze stÄŝenia metali znacznie obniŝały poziom hydrolizy ATP przez białka [120]. Wydaje siÄ zatem, ŝe nawet metale bÄdÄce substratami białek transporterowych w duŝych stÄŝeniach mogÄ działaÄ destrukcyjnie na reszty aminokwasowe budujÄce białka transporterów.

Analiza kinetyki transportu miedzi przez błony wakuolarne zawierajÄce białka CsHMA5 potwierdziła, ŝe obydwie białka ogórka transportujÄ jony  $Cu^+$  wykorzystujÄc do tego procesu energiÄ pochodzÄcÄ z rozkładu ATP, jednak cechujÄ siÄ odmiennym powinowactwem do jonu tego metalu. Mianowicie białko CsHMA5.1 wykazuje 2-krotnie niŝsze powinowactwo ( $K_m \sim 0.94 \mu M$ ) do jonów  $Cu^+$  niŝ białko CsHMA5.2 ( $K_m \sim 0.48 \mu M$ ) [120]. BiorÄc pod uwagÄ różnicÄ w ekspresji genów kodujÄcych obydwie białka u ogórka (tylko białko CsHMA5.2 jest pozytywnie lub negatywnie regulowane dostÄpnoŝciÄ miedzi) oraz ich biochemiczne właŝciwoŝci przypuszczamy, ŝe funkcja transportera CsHMA5.2 w komórkach różnych

organów ogórka wiąże się z detoksykacją tych komórek z nadmiaru miedzi poprzez aktywną intensywną sekwestrację metalu w wakuolach. Na podstawie otrzymanych wyników zakładamy także, że białko CsHMA5.1 uczestniczy w konstytutywnej regulacji homeostazy miedzi w komórkach korzeni ogórka, niezależnej od dostępności metalu w środowisku może nie mieć istotnego znaczenia dla roślin w warunkach zanieczyszczenia środowiska miedzią. Analizy kinetyki transportu metali przez błony zawierające białka CsHMA3 lub CsHMA4 potwierdziły, że CsHMA3 funkcjonuje jako ATPaza transportująca jony  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  przez błony wakuolarnie, natomiast CsHMA4 wykorzystuje ATP do eksportu jonów  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  przez błony plazmolemowe [119]. Obydwa białka cechują się wysokim powinowactwem do transportowanych jonów, które w przypadku CsHMA3 jest podobne dla  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  ( $K_m \sim 1 \mu\text{M}$ ) a w przypadku CsHMA4 zróżnicowane – 3-krotnie wyższe dla  $\text{Zn}^{2+}$  ( $K_m \sim 0.66 \mu\text{M}$ ) niż dla  $\text{Cd}^{2+}$  ( $K_m \sim 2 \mu\text{M}$ ) [111]. Biorąc pod uwagę lokalizację białek CsHMA3 i CsHMA4, rodzaj metali transportowanych przez te ATPazy oraz pozytywną regulację aktywności tych białek przez transportowane metale stwierdziłyśmy, że funkcja obydwu białek ogórka wiąże się z detoksykacją komórek korzeni z  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  i nadmiaru  $\text{Zn}^{2+}$  oraz, w przypadku CsHMA4 z dalekim transportem cynku do części nadziemnych rośliny. Wysoki poziom ekspresji genu *CsHMA4* w kwiatach i owocach sugeruje także, że ATPaza CsHMA4 może uczestniczyć w zaopatrywaniu tych organów oraz produkowanych przez nie nasion i zarodków w cynk.

Identyfikacja substratów dla białek CsHMA3 ( $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$ ) i CsHMA4 ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) za pomocą heterologicznych systemów drożdżowych wyraźnie wskazuje, że obydwie białka mogą odpowiadać za zależny od ATP transport  $\text{Cd}^{2+}$  zmierzony wcześniej w błonach plazmolemowych i tonoplastowych izolowanych z korzeni ogórka [98]. Z kolei identyfikacja fizjologicznego substratu dla białek CsHMA5.1 i CsHMA5.2 ( $\text{Cu}^+$ ) sugerowała, że w błonach tonoplastowych komórek korzeni ogórka funkcjonuje zależny od ATP transport  $\text{Cu}^+$  skierowany do wakuoli. Do tej pory nie analizowano takiej aktywności w tonoplaście komórek roślinnych. W dalszym etapie badań przeprowadziłyśmy zatem pomiary transportu miedzi w błonach tonoplastowych izolowanych z korzeni ogórków w obecności ATP, substancji zapobiegającej generacji gradientu elektrochemicznego w poprzek błony (bafilomycyny, inhibitora tonoplastowej V-ATPazy) oraz specyficznego inhibitora P-ATPaz, ortowanadanu sodu. Przeprowadzone analizy dostarczyły pierwszych dowodów na obecność w błonach wakuolarnych komórek roślinnych systemów transportujących miedź, które energię do transportu metalu czerpią z rozkładu ATP i są wrażliwe na inhibitor P-ATPaz [120]. Jednocześnie wykazałyśmy, że zależny od ATP wakuolarny transport miedzi jest 4-krotnie wyższy w obecności toksycznych stężeń miedzi i 5-krotnie niższy w warunkach deficytu tego metalu w podłożu [120]. Otrzymane wyniki w pełni korelują ze wzrostem i spadkiem poziomu białka CsHMA5.2 pod wpływem, odpowiednio nadmiaru i deficytu miedzi w podłożu [120].

Na podstawie przeprowadzonych dotychczas badań możemy stwierdzić, że w komórkach korzeni ogórka P<sub>1B2</sub>-ATPazy CsHMA3 i CsHMA4 odpowiadają za transport odpowiednio, Pb<sup>2+</sup> i Cd<sup>2+</sup> oraz Zn<sup>2+</sup> i Cd<sup>2+</sup> przez błony tonoplastowe do wakuoli i plazmolemowe do apoplastu, natomiast P<sub>1B1</sub>-ATPazy CsHMA5.1 i CsHMA5.2 katalizują transport miedzi do wakuoli, oraz że zwiększona aktywność białek CsHMA3, CsHMA4 i CsHMA5.2 w warunkach stresu metali ciężkich może stanowić ważny mechanizm ochronny przeciwdziałający akumulacji Cd<sup>2+</sup> i Pb<sup>2+</sup> oraz toksycznych stężeń Cu<sup>+</sup> i Zn<sup>2+</sup> w cytoplazmie komórek korzeni. Wyniki dotyczące molekularnej charakterystyki białek CsHMA3, CsHMA4, CsHMA5.1 i CsHMA5.2 ogórka opublikowano w formie dwóch prac oryginalnych, a część z nich wykorzystano podczas przygotowania pracy przeglądowej podsumowującej dotychczasową wiedzę na temat struktury i funkcji ATPaz miedziowych (P<sub>1B1</sub>-ATPaz) w komórkach organizmów żywych [124]. Wszystkie trzy prace załączono do cyklu monotematycznych publikacji:

- **Migocka M** (2015) Copper-transporting ATPases: The evolutionary conserved machineries for balancing copper in living systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 67(10): 737–745 [124]
- **Migocka M**, Posyniak E, Maciaszczyk-Dziubińska E, Papierniak A, Kosieradzka A (2015) Functional and Biochemical Characterization of Cucumber Genes Encoding two Copper ATPases CsHMA5.1 and CsHMA5.2. *Journal of Biological Chemistry*, 290(25):15717-29 [120]
- **Migocka M**, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Posyniak E, Kosieradzka A (2015) Molecular and biochemical properties of two P1B2 -ATPases, CsHMA3 and CsHMA4, from cucumber. *Plant and Cell Environment* 38: 1127-1141 [119]

#### V. *Najważniejsze efekty i osiągnięcia przeprowadzonych badań*

Badania kinetyczne transportu metali w błonach plazmolemowych i tonoplastowych komórka ogórka a także molekularna charakterystyka białek z rodzin HMA i MTP ogórka znacznie poszerzyły wiedzę o lokalizacji, funkcji i regulacji transporterów metali u roślin. Efekty tych badań i ich najważniejsze osiągnięcia można w skrócie ująć w następujących wnioskach:

- Wykazaliśmy, że w plazmolemie i wakuoli korzeni roślin funkcjonują aktywne białka błonowe, które wykorzystując siłę protonomotoryczną (gradient elektrochemiczny generowany przez pompy protonowe) lub ATP jako źródło energii transportują kationy metali ciężkich do wakuoli lub do ściany komórkowej i tym samym uczestniczą w utrzymaniu wewnątrzkomórkowej homeostazy jonowej. Nasze badania dostarczyły pierwszych dowodów kinetycznych na obecność aktywnego transportu

metali w błonie komórkowej i na potencjalny udział tej błony w detoksykacji komórek roślinnych z nadmiaru jonów metali. Pokazaliśmy także, że systemy transportu pierwotnego (zależnego od ATP) wykazują wyższe powinowactwo do jonów metali niż systemy transportu wtórnego (antyportu) i transportują jony metali w kompleksach, prawdopodobnie z grupami tiolowymi aminokwasów i/lub białek chaperonowych. Wykorzystując dostępność sekwencji genomu ogórka, heterologiczne systemy ekspresyjne oraz rozmaite metody biologii molekularnej wykazaliśmy, że wśród aktywnych eksporterów metali w plazmolemie znajduje się P<sub>1B2</sub>-ATPaza CsHMA4 transportująca Cd<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup>, oraz antyporter CsMTP9, katalizujący transport Cd<sup>2+</sup> i Mn<sup>2+</sup>, natomiast wśród tonoplastowych transporterów metali ciężkich znajdują się P<sub>1B1</sub>-ATPazy CsHMA5.1 i CsHMA5.2 transportujące Cu<sup>+</sup>, P<sub>1B2</sub>-ATPaza CsHMA3, transportująca Cd<sup>2+</sup> i Pb<sup>2+</sup>, antyportery CsMTP1 i CsMTP4 transportujące Cd<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup>, oraz antyporter CsMTP8 specyficzny wobec jonów Mn<sup>2+</sup>.

- Zidentyfikowaliśmy rodzinę genów *MTP* u ogórka i sklasyfikowaliśmy 9 białek kodowanych przez te geny do trzech grup filogenetycznych, obejmujących białka o różnej specyficzności substratowej: Zn-CDF (CsMTP1, CsMTP4, CsMTP5, CsMTP12), Zn/Fe-CDF (CsMTP6 i CsMTP7), oraz Mn-CDF (CsMTP8-CsMTP11). Wykazaliśmy, że białka CsMTP1 i CsMTP4 z grupy transporterów cynkowych, oprócz jonów Zn<sup>2+</sup> transportują także jony Cd<sup>2+</sup>. Podobnie białko CsMTP9 z grupy transporterów manganowych oprócz jonów Mn<sup>2+</sup> transportuje jony Cd<sup>2+</sup>. W efekcie, po raz pierwszy scharakteryzowaliśmy dwa dotąd nie zbadane roślinne białka MTP: MTP4 i MTP9, i pokazaliśmy, że transportery z grupy Mn-CDF (MTP9) mogą cechować się szeroką specyficznością substratową (do tej pory uważano że są one wysoce selektywne dla jonów Mn<sup>2+</sup>). Nasze badania dostarczyły także pierwszych dowodów na lokalizację białek MTP z grupy Mn-CDF w błonie komórkowej (MTP9). Po raz pierwszy pokazaliśmy także, że roślinne białka MTP mogą lokalizować się w komórkach w sposób spolaryzowany i w ten sposób determinować kierunek transportu metali w tkankach roślinnych (MTP9).
- Zidentyfikowaliśmy rodzinę genów *HMA* ogórka i sklasyfikowaliśmy 8 białek kodowanych przez te geny do trzech grup filogenetycznych: P<sub>1B1</sub>-ATPaz (CsHMA5.1, CsHMA5.2, CsHMA6, CsHMA7, CsHMA8), P<sub>1B2</sub>-ATPaz (CsHMA3 i CsHMA4) oraz P<sub>1B4</sub>-ATPaz (CsHMA1). Wykazaliśmy, że w komórkach ogórka białka CsHMA5.1 i CsHMA5.2 lokalizują się w błonie wakuolarnej i transportują jednowartościową miedź do wakuoli, białko CsHMA3 lokalizuje się w błonie wakuolarnej i transportuje jony Cd<sup>2+</sup> i Pb<sup>2+</sup> do wakuoli, natomiast białko CsHMA4 lokalizuje się w błonie komórkowej i odpowiada za eksport jonów Zn<sup>2+</sup> i Cd<sup>2+</sup> do apoplastu. Pokazaliśmy także, że wszystkie badane białka HMA ogórka wykazują zdolność do hydrolizy ATP tylko w

obecności jonów transportowanych metali. Nasze badania dostarczyły pierwszych dowodów na lokalizację roślinnych P<sub>1B1</sub>-ATPaz (HMA5) w błonach wakuolarnych (do tej pory białka tej klasy lokalizowano w błonach komórkowych i chloroplastowych) i ich udział w sekwestracji jonów Cu<sup>+</sup> w wakuolach. W dodatku po raz pierwszy scharakteryzowaliśmy funkcjonalnie dwie izoformy roślinnego białka HMA (CsHMA5.1 i CsHMA5.2) wykazując, że pełnią one odmienne role w utrzymaniu homeostazy miedzi w komórkach ogórka. Multiplikacje genów kodujących białka HMA opisano także u innych roślin, ale do tej pory nie zbadano i nie porównywano funkcji zidentyfikowanych izoform. Na podstawie naszych badań można wnioskować, że multiplikacje w obrębie rodziny HMA prowadziły do neo-funkcjonalizacji, czyli nabywania nowych funkcji przez nowo powstałe izoformy białek HMA. Jako pierwsi przeprowadziliśmy biochemiczne i kinetyczne analizy roślinnych białek HMA5 (CsHMA5.1 i CsHMA5.2) i HMA4 (CsHMA4). Podobne badania przeprowadzono do tej pory tylko na białkach HMA1, HMA2, HMA6 i HMA8 *A. thaliana* [10,12-14].

- Na podstawie wyników naszych i wcześniejszych badań możemy stwierdzić, że geny kodujące roślinne białka MTP9 i HMA4 mogą być wykorzystane w konstrukcji roślin użytecznych w fitoremediacji gleb zanieczyszczonych Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> czy Mn<sup>2+</sup>, ponieważ białka te uczestniczą w transporcie metali z korzeni do nadziemnych części roślin, a więc ułatwiają ekstrakcję metali z gleby.

#### VI. Planowane badania związane z tematyką transporterów metali ciężkich.

Po zakończeniu projektów Iuventus Plus finansowanych przez MNiSW pozyskałam fundusze na projekt badań nad transporterami MTP5, MTP6 i MTP7 ogórka, których homologi do tej pory nie zostały scharakteryzowane funkcjonalnie u innych roślin (projekt nr 2012/05/D/NZ1/01659 finansowany przez NCN (SONATA) pt. „Znaczenie fizjologiczne transporterów metali ciężkich CsMTP5, CsMTP6 i CsMTP7, reprezentujących trzy odrębne filogenetycznie grupy w rodzinie białek MTP (Metal Transport Proteins) u ogórka”. Wyniki, które otrzymaliśmy do tej pory wskazują, że białka CsMTP6 i CsMTP7 to mitochondrialne transportery Fe<sup>2+</sup>, odpowiedzialne za transport jonów żelaza odpowiednio, z mitochondriów do cytoplazmy i z cytoplazmy do mitochondriów. Część wyników dotycząca białka CsMTP7 została zaprezentowana na Konferencji Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej (PTBER) w Gdańsku (8-11.09.2015). Są to jak dotąd pierwsze dowody na mitochondrialną lokalizację roślinnych białek MTP i na ich udział w transporcie jonów żelaza. W dalszym etapie realizacji projektu planuję badania nad białkiem CsMTP5 (w ramach finansowania z grantu) a po jego ukończeniu aplikowanie o fundusze na badania nad białkami CsMTP11 i CsMTP12. W efekcie realizacji tych badań uzyskamy pełną charakterystykę rodziny białek

MTP ogórka. Poza tym planuję również kontynuację badań nad białkami HMA ogórka: w trakcie amplifikacji sekwencji kodującej genu *CsHMA5.2* udało nam się uzyskać dwa różne transkrypty tego genu (wcześniej scharakteryzowany transkrypt *CsHMA5.2-1*, kodujący białko o długości 926 aminokwasów i drugi transkrypt, *CsHMA5.2-2*, kodujący nieco krótsze białko o długości 813 aminokwasów). Otrzymane wyniki prezentowałyśmy na konferencji PTBER w Łodzi (16-19.09.2013). Zamierzamy określić lokalizację i specyficzność substratową białka kodowanego przez alternatywny transkrypt *CsHMA5.2-2* aby uzyskać więcej informacji o regulacji i funkcji ATPaz typu P<sub>1B1</sub> w komórkach roślin.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

### a) *Badania związane z charakterystyką genów kodujących białka ABCG<sub>PDR</sub> ogórka*

Dotychczasowe badania pokazały, że rodzina transporterów ABC (ang. ATP Binding Cassette) to powszechna, bardzo obszerna i zróżnicowana grupa białek błonowych uczestnicząca w transporcie szerokiej klasy substancji [126]. Strukturalną cechą charakterystyczną tych białek jest obecność dwóch typów domen: domeny NBD (ang. Nucleotide Binding Domain), wiążącej ATP oraz domeny transbłonowej TMD (ang. Trans-Membrane Domain), zlokalizowanej w błonie komórkowej. Transportery ABC o tzw. „pełnej sekwencji” (ang. full-size) posiadają obydwie domeny w dwóch powtórzeniach. Należą tu trzy podrodziny białek: ABCB (znane wcześniej jako MDR, ang. Multidrug Resistance Proteins) o strukturze [TMD-NBD]<sub>2</sub>, ABCC (znane wcześniej jako MRPs, ang. MDR-associated proteins) o strukturze TMD-[TMD-NBD]<sub>2</sub> i ABCG<sub>PDR</sub> (znane wcześniej jako PDR, ang. Pleiotropic Drug Resistance) charakteryzujące się odwróconą strukturą obydwu domen: [NBD-TMD]<sub>2</sub> [127]. Transportery ABCG<sub>PDR</sub> wyróżniają się spośród pozostałych tym, że występują tylko u roślin i grzybów. Zainteresowanie podrodziną ABCG<sub>PDR</sub> u roślin znacznie wzrosło w ostatnich latach, ponieważ coraz więcej badań wskazuje na istotny udział tej grupy białek w reakcjach roślin na rozmaite stropy biotyczne i abiotyczne. Co więcej, wykazano że niektóre białka tej podrodziny mogą transportować hormony związane z reakcją roślin na stropy (kwas abscysynowy) i inne substancje regulatorowe (syntetyczne auksyny, prekursor auksyn, strigolaktony) oraz podlegają transkrypcyjnej regulacji przez fitohormony i regulatory wzrostu [128-134]. W roślinach modelowych *A. thaliana* i *O. sativa* zidentyfikowano odpowiednio, 15 i 23 geny kodujące transportery ABCG<sub>PDR</sub>. Najlepiej i najliczniej scharakteryzowane białka tej podrodziny u roślin to transportery *A. thaliana* (*AtABCG<sub>PDR</sub>*). Postęp w sekwencjonowaniu genomów innych gatunków roślin umożliwia poznanie funkcji homologicznych genów u innych roślin i ich porównawczą analizę z genami *A. thaliana*.

W trakcie badań prowadzonych podczas realizacji pracy doktorskiej zainicjowałam pierwsze badania nad genami *ABCG<sub>PDR</sub>* ogórka, zakładając ich potencjalny udział także w transporcie metali ciężkich. Zidentyfikowałam wówczas fragment genu *ABCG<sub>PDR</sub>*, którego ekspresja znacznie wzrastała w obecności metali ciężkich: Pb i Cd. Badania nad zidentyfikowanym genem kontynuowałam po obronie pracy doktorskiej we współpracy z panią Profesor Grażyną Kłobus i panią doktor Anną Papierniak. W rezultacie, po raz pierwszy zamplifikowałyśmy (metodą RACE-PCR) i zsekwencjonowałyśmy w całości dwa geny kodujące strukturalnie podobne białka *ABCG<sub>PDR</sub>* ogórka (numery akcesji w banku genów: GQ374243 i GQ374244) [127]. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek ogórka i rzodkiewnika sugeruje, że są to homologii transporterów *ABCG36* (*PDR8*) i *ABCG40* (*PDR12*), zaangażowanych w odpowiedź na stres  $Cd^{2+}$  i  $Pb^{2+}$  w środowisku, transport kwasu abscysynowego i sklareolu (przeciwwgrzybiczego terpenoidu) i obronę przed patogenami [132, 136-140]. Zsekwencjonowanie genomu ogórka umożliwiło nam identyfikację pozostałych 14 genów podrodziny *ABCG<sub>PDR</sub>* tej rośliny [135]. Analizy molekularne i transkrypcyjne tej rodziny kontynuowałam we współpracy z moimi ówczesnymi magistrantami: panią Anną Warzybok i panem Adamem Rajszem. Bazując częściowo na podobieństwie zidentyfikowanych sekwencji ogórka i dostępnych sekwencji *A. thaliana*, 16 genów ogórka nazwaliśmy *CsABCG29-CsABCG44* (*CsPDR1-CsPDR16*) [135,141]. Dotychczasowe analizy filogenetyczne białek *ABCG<sub>PDR</sub>* z różnych roślin wyróżniły w obrębie tej podrodziny 5 oddzielnych filogenetycznie kładów (I, II, III, IV, V) [118]. Co ciekawe, wykonana przez nas analiza filogenetyczna roślinnych białek *ABCG<sub>PDR</sub>* z uwzględnieniem 16 białek ogórka sugeruje podział tej podrodziny na 6 odrębnych kładów, wynikający z rozdzielenia kładu III na dwa klady IIIa i IIIb [141].

Analizując profile transkrypcji genów *ABCG<sub>PDR</sub>* w różnych organach wegetatywnych i generatywnych ogórka metodą półilościowego RT-PCR wykazaliśmy, że wszystkie geny z wyjątkiem jednego (*CsABCG38/CsPDR10*) ulegają ekspresji [135,141]. Wśród 15 ekspresjonowanych genów, transkrypty 5 (*CsABCG32*, *CsABCG33*, *CsABCG37*, *CsABCG39*, i *CsABCG41*) były obecne we wszystkich badanych organach ogórka, co sugeruje udział ich białkowych produktów w podstawowych procesach komórkowych [141]. Profile ekspresji organowej pozostałych genów *ABCG<sub>PDR</sub>* ogórka były bardzo zróżnicowane, niezależnie od tego czy kodowane przez nie białka należą do tego samego kładu filogenetycznego [135,141]. Na przykład transkrypcję genu *CsABCG29* obserwowaliśmy głównie w kwiatach i młodych liściach, podczas gdy gen *CsABCG30* ulegał największej ekspresji w korzeniach i kwiatach [141]. Geny kodujące dwa białka należące do tego samego kładu IIIb (*CsABCG31* i *CsABCG35*) ulegały zróżnicowanej ekspresji na wysokim poziomie prawie we wszystkich organach ogórka (*CsABCG35*) albo na niskim poziomie tylko w liściach i kwiatach męskich (*CsABCG31*) [141]. Profile transkrypcji genów kodujących trzy

podobne białka z kladu IV także były odmienne: mRNA genu *CsABCG34* obserwowaliśmy we wszystkich organach z wyjątkiem kwiatów, liścieni i młodych liści, mRNA genu *CsABCG42* obserwowaliśmy przede wszystkim w pręcikach i słupkach kwiatów, natomiast transkrypt genu *CsABCG44* wykryliśmy we wszystkich organach z wyjątkiem pręcików i słupków kwiatowych [141]. Dla odmiany profile transkrypcji genów kodujących białka należące do dwóch różnych kładów I i IIIa (*CsABCG40/CsPDR12* i *CsABCG36/CsPDR8*) były dość podobne: najwyższy poziom mRNA obydwu genów obserwowaliśmy w korzeniach [135]. Reasumując, w wyniku przeprowadzonej analizy wykazaliśmy, że profile ekspresji organowej genów *ABCG<sub>PDR</sub>* ogórka są bardzo zróżnicowane i nie związane z klasyfikacją filogenetyczną białek kodowanych przez te geny. Założyliśmy zatem, że zmultiplikowane geny kodujące te białka zyskały różne funkcje fizjologiczne w trakcie filogenezy.

Kolejnym celem naszej pracy nad genami *ABCG<sub>PDR</sub>* ogórka jest analiza ekspresji tych genów w czasie rzeczywistym (real-time PCR) w warunkach różnych stresów abiotycznych oraz pod wpływem fitohormonów związanych z odpowiedzią roślin na stresy i substancji regulatorowych. Otrzymane wyniki pozwolą nam porównać ekspresję genów ogórka z ekspresją genów *ABCG<sub>PDR</sub>* innych roślin, badaną w podobnych warunkach eksperymentalnych oraz wyselekcjonować te geny *ABCG<sub>PDR</sub>* ogórka, które mogą być związane z reakcją rośliny na warunki stresowe. W celu poprawnej normalizacji wyników analizy ekspresji, w pierwszej kolejności przeprowadziliśmy selekcję genów referencyjnych o największej stabilności ekspresji w stosowanych przez nas warunkach eksperymentalnych (fitohormony i substancje regulatorowe, stres metali ciężkich, stresy solny i osmotyczny, stres oksydacyjny) [142]. Do analizy wybraliśmy geny powszechnie stosowane w biologii molekularnej, kodujące: aktynę (ACT), tubulinę (TUA), cyklofilinę (CYP), ubikwitynę (UBI-1) oraz czynnik elongacyjny EF $\alpha$ , a także nowe geny referencyjne kodujące: podjednostkę kompleksu adaptorowego klatryny (CACS), białkową fosfatazę 2 (PDF2), aktywator białka PPA2 (TIP41), ekspresjonowane białko o nieznannej funkcji (GW881873), białko F-box, helikazę (HEL) i mitotyczne białko (YSL8). Nowe geny wybraliśmy i zidentyfikowaliśmy w genomie ogórka na podstawie danych pochodzących z podobnych analiz przeprowadzonych dla *A. thaliana* [143,144]. Analizę przeprowadziliśmy za pomocą trzech popularnych programów dedykowanych do badania stabilności ekspresji genów referencyjnych: GeNorm [145], NormFinder [146] i BestKeeper [147]. W efekcie wykazaliśmy, że stabilność ekspresji genów referencyjnych w warunkach różnych stresów abiotycznych i pod wpływem substancji regulatorowych jest bardzo zróżnicowana i wyselekcjonowaliśmy cztery geny o największej stabilności ekspresji: *CACS*, *TIP41*, *F-box* i *EF $\alpha$*  jako najlepsze kontrole do normalizacji wyników ekspresji genów *ABCG<sub>PDR</sub>* w zastosowanych warunkach eksperymentalnych [142].

Mając do dyspozycji odpowiednie geny referencyjne, zbadaliśmy wpływ fitohormonów i regulatorów wzrostu (kwas indoliloctowy - IAA, kwas abscysynowy – ABA, kwas



giberelinowy GA<sub>3</sub>, kinetyna, prekursor etylenu ACC, herbicyd 2,4-D, kwas salicylowy – SA, kwas jasmonowy – JA) oraz sklareolidu (analog sklareolu, przeciwgrzybiczego terpenoidu) na ekspresję genów *ABCG<sub>PDR</sub>* w korzeniach ogórków [135,141]. Jednocześnie przeprowadziliśmy analizę sekwencji promotorowych (arbitralnie ustalonych jako 1500 par zasad w kierunku 5' od kodonu start) genów *ABCG<sub>PDR</sub>* po kątem elementów regulatorowych odpowiedzi na hormony i elicytory przeciwgrzybicze [141]. Uzyskane wyniki pozwoliły nam podzielić geny *ABCG<sub>PDR</sub>* na grupy genów regulowanych przez badane substancje: IAA (*CsABCG30*, *CsABCG32*, *CsABCG37*), kinetynę (*CsABCG30*, *CsABCG33*, *CsABCG39*, *CsABCG40*), GA<sub>3</sub> (*CsABCG30*, *CsABCG32*, *CsABCG33*, *CsABCG34*, *CsABCG35*, *CsABCG37*, *CsABCG41*, *CsABCG42*), ABA (*CsABCG30*, *CsABCG36*, *CsABCG37*, *CsABCG39*, *CsABCG40*, *CsABCG42*), JA (*CsABCG29*, *CsABCG30*, *CsABCG32*, *CsABCG33*, *CsABCG34*, *CsABCG35*, *CsABCG36*, *CsABCG39*, *CsABCG40*, *CsABCG41*), SA (*CsABCG29*, *CsABCG32*, *CsABCG33*, *CsABCG34*, *CsABCG35*, *CsABCG36*, *CsABCG40*, *CsABCG44*), 2,4-D (*CsABCG30*, *CsABCG32*, *CsABCG40*), ACC (*CsABCG30*, *CsABCG32*, *CsABCG33*, *CsABCG36*, *CsABCG37*, *CsABCG41*) i sklareolid (*CsABCG35*, *CsABCG36*, *CsABCG37*, *CsABCG39*, *CsABCG40*) [135,141]. Obserwowane zmiany w ekspresji genów *ABCG<sub>PDR</sub>* pod wpływem substancji regulatorowych w znakomitej większości przypadków korelowały z obecnością elementów regulatorowych *cis* zlokalizowanych w promotorach tych genów, związanych z odpowiedzią na poszczególne regulatory [135,141].

Na podstawie otrzymanych danych możemy stwierdzić, że rodzina białek kodowanych przez geny *ABCG<sub>PDR</sub>* ogórka jest kompleksowo regulowana przez fitohormony związane z odpowiedzią rośliny na stres środowiskowy oraz przez substancje regulatorowe zaangażowane w procesy wzrostowe i rozwojowe. Znakomitą część wyników uzyskanych w trakcie dotychczasowej pracy nad charakterystyką genów *ABCG<sub>PDR</sub>* ogórka opublikowaliśmy w formie trzech prac oryginalnych:

- Rajsz A, Warzybok A, **Migocka M** (2015) Genes encoding cucumber full-size ABCG proteins show different responses to plant growth regulators and sclareolide. *Plant Molecular Biology Reporter* DOI: 10.1007/s11105-015-0956-9 [141]
- **Migocka M**, Papierniak A, Warzybok A, Kłobus G (2012) *CsPDR8* and *CsPDR12*, two of the 16 Pleiotropic Drug Resistance genes in cucumber, are transcriptionally regulated by phytohormones and auxin herbicide in roots. *Plant Growth Regulation* 67(2): 171 – 184 [135]
- **Migocka M**, Papierniak A (2011) Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Molecular Breeding* 28(3):343-357 [142]

Obecnie kontynuujemy pracę nad analizą ekspresji genów *CsABCG36* i *CsABCG40* w warunkach różnych stresów abiotycznych (zasolenie, metale ciężkie, stres osmotyczny i oksydacyjny) i immunolokalizacją białek kodowanych przez te geny w komórkach ogórka. Badania uzyskały finansowanie Uniwersytetu Wrocławskiego w postaci grantu nr 2245/W/IBR/09 i grantu nr 2006/M/IBE/12.

b) *Badania związane z charakterystyką transportu azotanów w komórkach ogórka*

W natlenionych glebach strefy umiarkowanej głównym źródłem azotu dla roślin są azotany [148, 149]. Na skutek zmiennych czynników środowiskowych (intensywne opady, niska temperatura, niedotlenienie gleby) dostępność azotanów dla roślin może być istotnie ograniczona, w związku z czym, aby zwiększyć plonowanie roślin gleby uprawne są regularnie intensywnie nawożone [149]. Stosowanie nawozów sztucznych jest kosztowne i może prowadzić do zanieczyszczenia gleb i wód gruntowych azotanami, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia zwierząt i człowieka. Dlatego problemy związane z nieracjonalnym nawożeniem gleb, nadmierną zawartością azotanów w roślinach oraz ich negatywnym wpływem na organizm człowieka stały się w ostatnich latach przedmiotem wielu badań. Ze względów ekonomicznych i ekologicznych, optymalizacja nawożenia azotowego opierająca się na redukcji kosztownych i potencjalnie niebezpiecznych nawozów azotowych przy jednoczesnym zwiększeniu plonowania roślin uprawnych wydaje się najlepszym rozwiązaniem. To trudne zadanie przynajmniej częściowo można zrealizować konstruując nowe, modyfikowane odmiany roślin, cechujące się zwiększoną efektywnością wykorzystania azotu (ang. Nitrogen Use Efficiency, NUE), w tym azotanów dostępnych w glebie. W tym celu konieczne jest pełne poznanie i zrozumienie na poziomie molekularnym procesów związanych z pobieraniem, dystrybucją i akumulacją azotanów w komórkach roślin, połączone z charakterystyką transportu tych jonów przez błony komórkowe. Procesy te polegają w większości na aktywnym transporcie azotanów przez błony plazmolemowe i tonoplastowe, w związku z czym angażują szereg specyficznych białek błonowych pełniących funkcję transporterów azotanowych. Dokładna charakterystyka i poznanie mechanizmów regulacji tych białek oraz kodujących je genów może znacznie wpłynąć na skuteczność modyfikacji genetycznej zastosowanej do zwiększenia efektywności wykorzystania azotanów przez rośliny.

U roślin wyższych zidentyfikowano do tej pory trzy typy transporterów wykazujących specyficzne powinowactwo do jonów  $\text{NO}_3^-$ , które warunkują utrzymanie względnie stałego stężenia azotanów w cytoplazmie. Są to białka należące do rodzin NRT1, NRT2 i CLC [148, 150-153]. Do tej pory poznano bliżej funkcję białek AtNRT1, AtNRT2 i AtCLC rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*. Z powodu braku dostępności do informacji genetycznej,

badania nad transporterami azotanowymi u innych roślin, zwłaszcza gatunków o istotnym znaczeniu dla gospodarki rolnej były dotąd bardzo nieliczne. Nie znano liczby oraz funkcji homologów białek NRT1, NRT2 i CLC w najpowszechniej uprawianych gatunkach roślin, a także mechanizmów regulujących ich aktywność. W latach 2010-2011 we współpracy z panią Prof. dr hab. Grażyną Kłobus pozyskałyśmy środki finansowe z Uniwersytetu Wrocławskiego (grant nr 2357/W/IBR/10) oraz z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant nr N N303 818740) na badania związane z funkcją genów *NRT1* i *CLC* ogórka. Projekty miały na celu analizę ekspresji genów *NRT1* i *CLC* ogórka w warunkach zróżnicowanego żywienia azotanowego oraz molekularną charakterystykę transportu azotanów do wakuoli komórek ogórka, obejmującą identyfikację tych genów i białek z rodziny NRT1 i CLC, które potencjalnie mogłyby funkcjonować jako tonoplastowe antyportery  $H^+/NO_3^-$ . Jako wykonawca obydwu projektów, realizowałam swoje zadania z doktorantką pani Profesor, panią magister Anną Warzybok, pełniąc jednocześnie funkcję promotora pomocniczego pracy doktorskiej pani Warzybok.

Pierwszy etap naszych wspólnych badań obejmował identyfikację i charakterystykę rodziny genów *NRT1* w genomie ogórka oraz analizę ich ekspresji w odpowiedzi na zróżnicowane żywienie azotanowe. Niedawno ukończony projekt sekwencjonowania genomu ogórka (*Cucumis sativus*) i nieograniczony dostęp do wyników tego projektu w bazie internetowej NCBI, umożliwiły nam identyfikację u tej rośliny 13 genów homologicznych do genów *NRT1* *A. thaliana* (*AtNRT1.1-AtNRT1.10*). Bazując na analizie filogenetycznej i stopniu podobieństwa białek kodowanych przez geny *NRT1* ogórka i *A. thaliana*, nowo zidentyfikowane geny ogórka nazwałyśmy: *CsNRT1.1* (homolog genu *AtNRT1.1*), *CsNRT1.2A*, *CsNRT1.2B* i *CsNRT1.2C* (trzy homologi genu *AtNRT1.2*), *CsNRT1.3* (homolog genu *AtNRT1.3*), *CsNRT1.4A* i *CsNRT1.4B* (dwa homologi genu *AtNRT1.4*), *CsNRT1.5A*, *CsNRT1.5B* i *CsNRT1.5C* (trzy homologi genu *AtNRT1.5*), *CsNRT1.8* (homolog genu *AtNRT1.8*), *CsNRT1.9* (homolog genu *AtNRT1.9*) i *CsNRT1.10* (homolog genu *AtNRT1.10*) [154]. Analizując transkrypcję wszystkich zidentyfikowanych genów *NRT1* ogórka w różnych organach rośliny (korzenie, hipokotyle, liścienie, łodygi, liście, ogonki liściowe, wąsy, elementy kwiatów i owoce) metodą półilościowego RT-PCR wykazałyśmy, że każdy z genów ulega ekspresji, a zatem żaden gen *CsNRT1* nie jest pseudogenem [154]. Transkrypty czterech genów *CsNRT1.1*, *CsNRT1.3*, *CsNRT1.5A* and *CsNRT1.8* były obecne we wszystkich badanych organach, co sugeruje udział ich białkowych produktów w podstawowych procesach komórkowych [154]. Ekspresja pozostałych genów była bardziej lub mniej specyficzna dla poszczególnych organów ogórka: geny *CsNRT1.5B* i *CsNRT1.5C* ulegały ekspresji prawie wyłącznie w kwiatach; ekspresję genu *CsNRT1.10* obserwowaliśmy głównie w wąsach i, w mniejszym stopniu, w kwiatach; natomiast transkrypt genu *CsNRT1.9* wykryłyśmy we wszystkich organach z wyjątkiem korzeni roślin [154]. Co ciekawe, wzory

ekspresji organowej zwielokrotnionych homologów genów *CsNRT1.2*, *CsNRT1.4* i *CsNRT1.5* były odmienne, wskazując na neo-funkcjonalizację (nabycie nowej funkcji) izogenów powstałych w wyniku multiplikacji. Na przykład ekspresja genu *CsNRT1.4A* była bardzo wyraźna tylko w ogonkach liściowych i owocach, podczas gdy stosunkowo dużą ilość transkryptu genu *CsNRT1.4B* obserwowaliśmy w ogonkach liściowych, liścieniach, liściach, wąsach, czy w niektórych elementach kwiatów [154]. Z kolei ekspresja genów *CsNRT1.2* była największa w łodydze (*CsNRT1.2A*), liścieniach i liściach starszych roślin (*CsNRT1.2A/B/C*) lub ogonkach liści młodych siewek (*CsNRT1.2C*) [154]. Homologiczny gen u *A. thaliana* koduje białko odpowiedzialne za pobieranie azotanów przez korzenie z podłoża [155, 156]. Zatem można przypuszczać, że białka NRT1.2 ogórka i rzodkiewnika pełnią odmienne funkcje fizjologiczne.

Kolejnym etapem naszych badań była analiza ekspresji genów *CsNRT1* w organach wegetatywnych roślin uprawianych w warunkach zróżnicowanej dostępności do azotanów (brak azotu, niska dostępność azotanów - 0,5mM KNO<sub>3</sub>, wysoka dostępność azotanów - 10mM KNO<sub>3</sub>, zmienna dostępność azotanów) metodą real-time PCR. Na wstępie przeprowadziliśmy analizę stabilności ekspresji 12 genów referencyjnych w tych samych warunkach aby wyselekcjonować najbardziej wiarygodną kontrolę wewnętrzną do normalizacji wyników ekspresji genów *CsNRT1* [157]. Do badania wybrałyśmy najczęściej używane w biologii molekularnej geny referencyjne kodujące: aktynę (ACT), tubulinę (TUA), cyklofilinę (CYP), ubikwitynę (UBI-1) oraz czynnik elongacyjny EF $\alpha$ , a także nowe geny referencyjne kodujące: podjednostkę kompleksu adaptorowego klatryny (CACS), białkową fosfatazę 2 (PDF2), aktywator białka PPA2 (TIP41), ekspresjonowane białko o nieznannej funkcji (GW881873), białko F-box, helikazę (HEL) i mitotyczne białko (YSL8). Homologi wszystkich genów zidentyfikowałyśmy wcześniej w genomie ogórka, bazując na znanych sekwencjach *A. thaliana* [142]. Stabilność ekspresji genów referencyjnych analizowałyśmy za pomocą programów GeNorm [145], NormFinder [146] i BestKeeper [147]. W efekcie wykazałyśmy, że stabilność ekspresji genów referencyjnych w warunkach zmiennej dostępności roślin do azotanów jest bardzo zróżnicowana i wyselekcjonowałyśmy cztery geny o najbardziej stabilnej ekspresji: *CACS*, *TIP41*, *F-box* i *EF $\alpha$*  jako najlepsze kontrole do normalizacji wyników ekspresji genów *CsNRT1* [157].

Analizując zmiany poziomu transkryptów genów *CsNRT1* w organach wegetatywnych w odpowiedzi na zróżnicowane żywienie azotanowe potwierdziłyśmy, że produkty białkowe tych genów mogą pełnić odmienne funkcje fizjologiczne w komórkach ogórka. Na podstawie otrzymanych wyników, wstępnie podzieliłyśmy geny *CsNRT1* na trzy grupy: geny indukowane w warunkach deficytu azotanów (*CsNRT1.1*, *CsNRT1.2C*, *CsNRT1.4A*, *CsNRT1.5A*), geny indukowane w warunkach niskiej dostępności azotanów (*CsNRT1.1*, *CsNRT1.2B*, *CsNRT1.2C*, *CsNRT1.4A*) oraz geny indukowane wysokim stężeniem

azotanów (*CsNRT1.2A*, *CsNRT1.3*, *CsNRT1.4B*, *CsNRT1.5A*, *CsNRT1.8* i *CsNRT1.9*) [154]. Niektóre z genów były odmiennie regulowane przez azotany w zależności od badanego organu. Na przykład ekspresja genu *CsNRT1.1* była znacznie zwiększona w pędach w warunkach deficytu azotanów, lub w młodych liściach w obecności niskiego stężenia tych jonów w środowisku zewnętrznym [154]. Homolog tego genu u *A. thaliana* koduje białko cechujące się podwójnym: niskim i wysokim powinowactwem do azotanów i pełni funkcję receptora stężenia azotanów w środowisku [158, 159]. Odmienna regulacja genu *CsNRT1.1* przez różne stężenia azotanów może sugerować podobną funkcję białka kodowanego przez ten gen u ogórka. Co ciekawe, ekspresja izogenów tego samego genu (*CsNRT1.2A/B/C*, *CsNRT14A/B*) była bardzo różnie regulowana przez azotany, co potwierdziło nasze wcześniejsze przypuszczenia o odmiennej funkcji fizjologicznej białek kodowanych przez zmultiplikowane geny *NRT1* ogórka [154].

W trakcie realizacji pracy wykonaliśmy przegląd dotychczasowej wiedzy o roślinnych białkach NRT1 [160]. Zebrane informacje oraz wyniki otrzymane w części eksperymentalnej pracy opublikowaliśmy w formie jednej pracy przeglądowej i dwóch prac oryginalnych:

- Warzybok A, **Migocka M** (2012) Udział białek NRT1 w transporcie azotanów u roślin. *Postępy biochemii* 58(1): 61-68 [160]
- **Migocka M**, Warzybok A, Kłobus G (2013) The genomic organization and transcriptional pattern of genes encoding nitrate transporters 1 (NRT1) in cucumber. *Plant and Soil* 364(1): 245-260 [154]
- Warzybok A, **Migocka M** (2013) Reliable reference genes for normalization of gene expression in cucumber grown under different nitrogen nutrition. *PLoS ONE* 8(9): e72887. doi:10.1371/journal.pone.0072887 [157]

Kolejnym etapem naszych badań była kinetyczna charakterystyka aktywnego transportu azotanów do wakuoli komórek ogórka. Badania prowadzone na roślinach *A. thaliana* wykazały, że dwa białka należące do rodziny CLC (CLCa i CLCb) występują w błonie tonoplastowej i wykazują aktywność antyportera  $H^+/NO_3^-$ , odpowiadając za aktywną akumulację azotanów w wakuolach [152, 153]. *Arabidopsis* posiada 7 białek CLC, z których oprócz CLCa i CLCb, także CLCc i CLCg lokalizują się w błonie wakuolarniej. W genomie ogórka występuje 6 genów kodujących białka CLC, w tym trzy geny kodujące białka tonoplastowe: CLCa, CLCc i CLCg [161]. Wcześniejsze badania przeprowadzone w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin z wykorzystaniem pH-zależnej sondy oranżu akrydyny wykazały aktywność antyportu  $H^+/NO_3^-$  w błonach tonoplastowych izolowanych z korzeni ogórka [162]. Badania, które przeprowadziłyśmy za pomocą pH-zależnych sond oranżu akrydyny i chinakryny oraz HPLC (wysokosprawnej chromatografii cieczowej) potwierdziły obecność antyportu  $H^+/NO_3^-$  w błonach wakuolarnych korzeni ogórka a także

wykazały, że aktywność antyportu jest regulowana przez poziom azotanów w środowisku zewnętrznym [161]. Stosunkowo niską aktywność antyportu  $H^+/NO_3^-$  obserwowaliśmy w warunkach deficytu azotanów w środowisku, co sugeruje że obecność azotanów nie jest konieczna do syntezy białek odpowiedzialnych za aktywną akumulację tych jonów w wakuolach [161]. Jednakże aktywność antyportu  $H^+/NO_3^-$  znacznie wzrastała przy stałej obecności azotanów w podłożu, wskazując na stymulujący wpływ azotanów na aktywność białek odpowiedzialnych za transport tych jonów do wakuoli [161]. Najwyższą aktywność antyportu  $H^+/NO_3^-$  obserwowaliśmy w błonach tonoplastowych izolowanych z roślin, które przez większość czasu rosły bez azotanów w podłożu i były przenoszone na podłoża z azotanami dopiero na 24 godziny przez izolację błon (rośliny indukowane azotanami) [161]. Co ciekawe frakcja cytozolowa otrzymana z korzeni takich roślin znacznie stymulowała antyport  $H^+/NO_3^-$  w błonach izolowanych z roślin uprawianych stale w obecności azotanów [161]. Podobny, choć mniej znaczący efekt powodowała tylko frakcja cytozolowa uzyskana z roślin uprawianych stale w obecności azotanów [161]. Założyliśmy, że azotany indukują w cytozolu syntezę czynnika, który potranslacyjnie pozytywnie wpływa na aktywność tonoplastowego antyportu  $H^+/NO_3^-$  [161]. W kolejnych badaniach wykazałyśmy, że pozytywny efekt frakcji cytozolowej na aktywny transport azotanów do wakuoli był zniesiony w obecności EGTA oraz inhibitora kinaz białkowych staurosporyny, podczas gdy inhibitory fosfataz, kwas okadaikowy i kantarydyna, nieznacznie wzmacniały działanie frakcji [161]. W związku z tym, zakładamy że stymulacja antyportu  $H^+/NO_3^-$  w korzeniach ogórka w odpowiedzi na obecność azotanów może zachodzić na drodze fosforylacji antyportera przez kinazy zależne od wapnia i wrażliwe na staurosporynę. Dodatkowo, w trakcie naszych badań pokazaliśmy, że ekspresja wszystkich genów kodujących tonoplastowe transportery CLC u ogórka, *CLCa*, *CICb* i *CLCg* istotnie wzrastała w obecności azotanów, co sugeruje że aktywność antyportu  $H^+/NO_3^-$  jest regulowana przez azotany także na poziomie transkrypcji [161].

Wykonane badania po raz pierwszy pokazały regulację przez fosforylację systemu transportującego azotany do wakuoli komórek roślinnych; otrzymane wyniki opublikowałyśmy w formie jednej pracy oryginalnej:

- **Migocka M**, Warzybok A, Papierniak A, Kłobus G (2013)  $NO_3^-/H^+$  antiport in the tonoplast of cucumber root cells is stimulated by nitrate supply: evidence for a reversible nitrate-induced phosphorylation of vacuolar  $NO_3^-/H^+$  antiport. PLoS ONE 8(9): e73972. doi:10.1371/journal.pone.0073972 [161]

Obecnie finalizujemy badania obejmujące molekularną charakterystykę białek CsNRT1.2A-C i CsNRT1.4A-B ogórka. Analizy funkcjonalne tych białek prowadziłyśmy z wykorzystaniem drożdży *Hansenula polymorpha*, które posiadają naturalną zdolność pobierania i asymilacji

azotanów, dzięki czemu mogą wykorzystywać te jony jako jedyne źródło azotu. Wykorzystując mutanty delecyjne drożdży, pozbawione endogennego transportera azotanów oraz protoplasty izolowane z komórek i liści *A. thaliana*, wykazałyśmy że białka CsNRT1.2A-C i CsNRT1.4A-B są zlokalizowane w błonie komórkowej i odpowiadają za pobieranie azotanów do komórek. Część otrzymanych wyników zaprezentowaliśmy na dwóch konferencjach naukowych: na Kongresie FESBP we Freiburgu (29.07-3.08.2012) i na 6-tej konferencji PTBER w Łodzi (16-19.09.2013).

c) *Badania związane z charakterystyką i regulacją transportu metaloidów arsenu i antymonu w komórkach drożdży*

Związki arsenu i antymonu w nadmiarze mogą powodować toksyczne efekty w komórkach żywych organizmów. Niektóre organizacje międzynarodowe (Agencja Ochrony Środowiska, Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakim) zaliczają je do grupy związków kancerogennych [163,164]. Powszechna, czasem nadmierna obecność arsenu w środowisku wynika z przyczyn naturalnych (wybuchy wulkanów, aktywność mikroorganizmów) lub częściej, z antropogenicznych (spalanie węgla, wydobywanie surowców mineralnych, produkcja akumulatorów, nawożenie gleb, przemysł hutniczy i metalurgiczny), w wyniku czego największa koncentracja tego pierwiastka w glebie i powietrzu występuje w rejonach przemysłu metalurgicznego i chemicznego oraz w dużych aglomeracjach miejskich. Antymon jest dużo mniej rozpowszechniony w środowisku niż arsen, ale jego poziom w powietrzu, glebie i wodzie może się zwiększać do toksycznych stężeń w miejscach spalania materiałów opałowych i śmieci, działania zakładów metalurgicznych lub wydobywania materiałów kopalnianych. W związku z obecnością obydwu metaloidów, ale przede wszystkim arsenu w środowisku, w toku ewolucji organizmy żywe wykształciły mechanizmy obronne służące detoksykacji komórek z jonów arsenu i antymonu. Toksyczne właściwości obydwu metaloidów wykorzystuje się w leczeniu chorób nowotworowych, tropikalnych i pasożytniczych, dlatego dokładne poznanie molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za transport związków arsenu i antymonu w komórkach jest niezwykle ważne dla zwiększenia skuteczności terapeutycznej leków zawierających te związki.

Badania prowadzone w ostatnich latach z wykorzystaniem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* doprowadziły do identyfikacji białek bezpośrednio zaangażowanych w komórkowy transport arsenu i antymonu i tym samym, przyczyniły się do lepszego zrozumienia mechanizmów wrażliwości i oporności komórek na arsen i antymon. Zespół prof. Roberta Wysockiego z Zakładu Genetyki i Fizjologii Komórki Uniwersytetu Wrocławskiego od kilku lat zajmuje się molekularną i funkcjonalną charakterystyką dwóch białek związanych z transportem jonów  $As^{3+}$  i  $Sb^{3+}$  w komórkach drożdży: akwaporyny Fps1p, transportującej

arsen i antymon do komórek i transportera Acr3p drożdży, odpowiadającego za zewnątrzkomórkowe wydzielanie arsenu [165,166]. Po obronie pracy doktorskiej rozpoczęłam współpracę z panem Profesorem Wysockim i panią doktor Ewą Maciaszczyk-Dziubińską, która polegała na określeniu mechanizmów oraz kinetyki transportu metaloidów przez białka Fps1p i Acr3p a także identyfikacji aminokwasów kluczowych dla funkcji białka Acr3p. Analizując funkcję akwaporyny Fps1p u drożdży po raz pierwszy wykazaliśmy, że białko to uczestniczy nie tylko w pobieraniu ale także w wydzielaniu arsenu na zewnątrz komórek, wspomagając tym samym transporter Acr3p w detoksykacji drożdży w warunkach stresu arsenowego [167]. Taka zdolność dwukierunkowego transportu arsenu przez akwaporyny sugeruje, że u organizmów nie posiadających homologów drożdżowego eksportera arsenu Acr3p to akwaporyny mogą determinować oporność na arsen. Analizując szczegółowo funkcję białka Acr3p wykazaliśmy, że jest ono zlokalizowane w błonie komórkowej i potwierdziliśmy, że odpowiada za usuwanie zarówno arsenu jak i antymonu z komórek drożdży [168]. Co więcej, wykazaliśmy że stres arsenu i antymonu pozytywnie wpływa na ekspresję genu kodującego Acr3p, nie wpływając jednocześnie na lokalizację subkomórkową i stopień degradacji tego białka [168]. Otrzymane wyniki sugerują, że aktywność białka Acr3p drożdży jest regulowana przez metaloidy tylko na poziomie transkrypcji, i że zwiększa się w odpowiedzi na nadmiar arsenu i antymonu w komórkach. Nasze kolejne badania z użyciem frakcji błon komórkowych o wysokiej czystości izolowanych z komórek drożdży po raz pierwszy pokazały, że transporter Acr3p funkcjonuje na zasadzie antyportera  $H^+/As^{3+}$  i  $H^+/Sb^{3+}$  [169] podobnie jak jego funkcjonalny homolog ArsB u *E. coli* [170]. Źródłem protonów dla tego systemu jest gradient elektrochemiczny (siła protonomotoryczna) generowany przez pompę protonową, ATPazę Pma1 zlokalizowaną w błonie komórkowej [169]. Analizując kinetykę transportu jonów arsenu i antymonu przez Acr3p wykazaliśmy, że transporter cechuje się podobnym niskim powinowactwem do obydwu metaloidów ( $K_m \sim 1$  mM), aczkolwiek transportuje jony  $As^{3+}$  z trzykrotnie większą szybkością niż jony  $Sb^{3+}$  [169]. Otrzymane przez nas wyniki mogą tłumaczyć dlaczego aktywność białka Acr3p determinuje większą oporność drożdży na związki arsenu niż na związki antymonu. Dotychczasowe badania nad homologami Acr3p u innych organizmów sugerowały, że konserwatywna cysteina w transbłonowej helisie 4 (TM4) i kwas glutaminowy w transbłonowej helisie 9 (TM9) białka mogą być pełnić kluczową rolę w jego aktywności transporterowej. W celu identyfikacji aminokwasów kluczowych dla aktywności drożdżowego białka Acr3p w kolejnym etapie badań przeprowadziliśmy ukierunkowaną mutagenezę genu kodującego to białko u *S. cerevisiae*, prowadzącą do zamiany najbardziej konserwatywnych reszt aminokwasowych na alaninę, lub reszty aminokwasowe o podobnych właściwościach fizykochemicznych, a następnie analizowaliśmy lokalizację i aktywność zmutowanych wersji białka w komórkach i błonach plazmatycznych odpowiednich mutantów delecyjnych drożdży



[171,172]. Otrzymane wyniki pozwoliły nam wyselekcjonować reszty aminokwasowe, które są niezbędne do prawidłowego transportu arsenu przez białko Acr3p, takie jak: cysteina 151 (Cys151), cysteina 192 (Cys192), fenyloalanina 266 (Phe266), seryna 349 (Ser349), fenyloalanina 352 (F352), kwas glutaminowy 353 (Glu353) i kwas glutaminowy 380 (Glu380); reszty aminokwasowe warunkujące prawidłowe fałdowanie i lokalizację białka w błonie komórkowej: cysteina 90 (Cys90), arginina 150 (Arg150), tryptofan 158 (Trp158), cysteina 169 (Cys169), arginina 230 (Arg230), tyrozyna 290 (Tyr290), cysteina 316 (Cys316), cysteina 318 (Cys318), cysteina 333 (Cys333), cysteina 344 (Cys344), fenyloalanina 345 (Phe345) i asparagina 351 (Asn351); oraz reszty aminokwasowe, które nie mają znacznego wpływu na lokalizację i aktywność transportera: seryna 74 (Ser74), asparagina 117 (Asn117), tryptofan 130 (Trp130), asparagina 176 (Asn176), cysteina 283 (Cys283) i fenyloalanina 291 (Phe291) [171,172]. Bazując na wynikach mutagenezy, przewidywanej topologii transportera Acr3p i dostępnych danych o wtórnych transporterach  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  należących do tej samej nadrodziny, zaproponowaliśmy model antyportu  $\text{As}^{3+}/\text{H}^+$  przez transporter arsenowy drożdży, w którym związanie  $\text{As}^{3+}$  do Cys151 w helisie TM4 i  $\text{H}^+$  do aminokwasów Glu353 w helisie TM9 lub Glu380 w helisie TM10 powoduje takie zmiany konformacyjne w helisach TM4 i TM9 oraz przesunięcia helis TM3-5 i TM8-10, które pozwalają na wymianę  $\text{As}^{3+}/\text{H}^+$  [172]. Obecnie prowadzimy badania, które mają na celu eksperymentalne ustalenie topologii błonowej transportera Acr3p.

Kolejny nurt badań prowadzonych w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki związany z opornością drożdży na metaloidy skupia się wokół identyfikacji i poznania mechanizmów działania czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w regulację transkrypcji genów w odpowiedzi na stres arsenu i antymonu. Badania te prowadzone są w ścisłej współpracy z zespołem Profesora Markusa Tamasa z Zakładu Chemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu w Göteborgu (Szwecja). Mój udział w tych badaniach dotyczył projektu związanego z funkcjonalną charakterystyką czynnika transkrypcyjnego Kiyap8 drożdży *Kluyveromyces lactis*. Czynniki transkrypcyjne Yap (czynniki typu AP-1; Yap1-Yap8), posiadają konserwatywną domenę bZIP wiążącą DNA, za pośrednictwem której regulują ekspresję genów związanych z opornością wielolekową [173]. Dotychczasowe badania nad *S. cerevisiae* wykazały, że białko należące do tej rodziny, czynnik transkrypcyjny ScYap8 (Acr1), reguluje transkrypcyjną odpowiedź drożdży na stres wywołany obecnością arsenu i antymonu, poprzez indukcję ekspresji genów kodujących reduktazę  $\text{As}^{5+}$  (Acr2) i plazmolemowy transporter  $\text{As}^{3+}$  i  $\text{Sb}^{3+}$  (Acr3) [165, 174-178]. Homologiczne białko Kiyap8 zidentyfikowano w komórkach drożdży *Kluyveromyces lactis*. Nasze badania nad funkcją tego białka wykazały, że Kiyap8 wiąże się do 13-nukleotydowych elementów promotorów genów i uczestniczy w regulacji odpowiedzi drożdży na stres wywołany nie tylko obecnością arsenu i antymonu, ale także kadmu i nadtlenu wodoru [179]. Pokazaliśmy, że drożdże z

delecją genu kodującego Kiyap8, akumulują toksyczne stężenia jonów  $Cd^{2+}$  i  $As^{3+}$  w komórkach ponieważ nie są zdolne do eksportu tych jonów przez błonę komórkową, co sugeruje udział czynnika Kiyap8 w regulacji transkrypcji genów zaangażowanych w transport metaloidów i  $Cd^{2+}$  na zewnątrz komórek [179]. W efekcie, po raz pierwszy scharakteryzowaliśmy funkcjonalnie białko Kiyap8 i wykazaliśmy różnice funkcjonalne pomiędzy homologicznymi białkami Yap8 z drożdży *S. cerevisiae* i *K. lactis*.

Wyniki otrzymane w trakcie dotychczasowych badań nad białkami Fps1p, Acr3p i Kiyap8 drożdży opublikowaliśmy w formie 6 prac oryginalnych:

- Markowska K, Maciaszczyk-Dziubinska E, **Migocka M**, Wawrzycka D, Wysocki R (2015) Identification of critical residues for transport activity of Acr3p, the *Saccharomyces cerevisiae* As(III)/H<sup>+</sup> antiporter. *Molecular Microbiology* 98(1):162-74 [172]
- Maciaszczyk-Dziubinska E, **Migocka M**, Wawrzycka D, Markowska K, Wysocki R (2014) Multiple cysteine residues are necessary for sorting and transport activity of the arsenite permease Acr3p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838(3):747-55 [171]
- Veide Vilg J, Kumar NV, Maciaszczyk-Dziubinska E, Sloma E, Onesime D, Aubert J, **Migocka M**, Wysocki R, Tamás MJ (2014) Elucidating the response of *Kluyveromyces lactis* to arsenite and peroxide stress and the role of the transcription factor Kiyap8. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms* 1839(11): 1295-1306 [179]
- Maciaszczyk-Dziubinska E, **Migocka M**, Wysocki R (2011) Acr3p is a plasma membrane antiporter that catalyzes As(III)/H<sup>+</sup> and Sb(III)/H<sup>+</sup> exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1808(7):1855-9 [169]
- Maciaszczyk-Dziubińska E, Wawrzycka D, Sloma E, **Migocka M**, Wysocki R (2010) The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798(11):2170-5 [168]
- Maciaszczyk-Dziubińska E, Migdal I, **Migocka M**, Bocer T, Wysocki R (2010) The yeast aquaglyceroporin FPS1p is a bidirectional arsenite channel. *FEBS Letters* 584: 726-732 [167]

d) *Badania związane z regulacją białek błonowych V-ATPazy i oksydazy NADPH oraz reduktazy azotanowej ogórka w warunkach stresów abiotycznych*

Zespół Prof. dr hab. Grażyny Kłobus Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin od wielu lat prowadzi badania związane z regulacją aktywności białek o kluczowym znaczeniu dla

metabolizmu komórek roślinnych. Są to białka związane z podstawowymi procesami komórkowymi: pompy protonowe plazmolemy ( $H^+$ -ATPazy) i tonoplastu (V-ATPazy i pirofosfatazy), plazmolemowe oksydazy NADPH oraz białka zaangażowane w asymilację azotu (reduktazy azotanowe i azotynowe). Wykorzystując dotychczasowe doświadczenie w zakresie metod biologii molekularnej, uczestniczyłam w realizacji projektów Zakładu związanych z charakterystyką genów kodujących tonoplastowe białka V-ATPazę i PP-azę, plazmolemową oksydazę NADPH (Rboh) oraz reduktazę azotanową (NR).

Podstawową funkcją pomp protonowych jest generacja gradientu elektrochemicznego w poprzek plazmolemy i tonoplastu, który służy jako siła protonomotoryczna do wtórnego transportu jonów i substancji odżywczych przez błony [180]. Transbłonowy gradient elektrochemiczny generowany przez wakuolarne V-ATPazy i PPazy jest między innymi wykorzystywany do transportu jonów metali (metale ciężkie, sód, wapń) w kierunku z cytoplazmy do wakuoli (antyport  $H^+/Me^{2+}$ ) lub z wakuoli do cytoplazmy (symport  $H^+/Me^{2+}$ ), który służy magazynowaniu korzystnych jonów w celu i ich późniejszego wykorzystania, lub izolacji toksycznych jonów od kluczowych szlaków metabolicznych komórki. W związku z tym zmiany aktywności V-ATPazy i PPazy w warunkach stresów środowiskowych (deficyt lub nadmiar metali, stres solny) będą miały istotny wpływ na zdolność roślin do tolerancji i niwelowania negatywnego wpływu stresu na metabolizm i fizjologię ich komórek. Jak już wspomniałam, dotychczasowe badania wykazały, że w błonach wakuolarnych komórek roślinnych funkcjonuje antyport jonów metali ciężkich do wakuoli, który energię do transportu jonów czerpie z gradientu protonów generowanego przez tonoplastowe pompy protonowe [93-95, 98]. Zatem aktywność tego antyportu, a więc i zdolność komórki do wakuolarnej sekwestracji toksycznych stężeń jonów metali jest ściśle zależna od aktywności V-ATPazy i PPazy. W związku z tym, jednym z aktualnych celów badań prowadzonych w Zakładzie jest kompleksowa analiza zmian aktywności tonoplastowych pomp protonowych w odpowiedzi roślin na stres wywołany obecnością metali balastowych (Cd, Pb) oraz podwyższonych stężeń metali korzystnych (Mn, Ni, Cu, Zn), mająca na celu wyjaśnienie roli V-ATPazy i PPazy, a co za tym idzie wakuoli w homeostazie jonów różnych metali ciężkich w komórkach roślinnych w warunkach zanieczyszczenia środowiska metalami. W swoich dotychczasowych badaniach, pani dr hab. Katarzyna Kabała wykazała, że aktywność V-ATPazy w tonoplaście komórek korzeni ogórka jest stymulowana w obecności toksycznego stężenia  $Cu^{2+}$  w środowisku, ale jest znacznie obniżona pod wpływem  $Cd^{2+}$  oraz podwyższonych stężeń  $Ni^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  [181-183]. W porównaniu z V-ATPazą, tonoplastowa PPaza była stymulowana w obecności 10  $\mu M$  stężenia  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  lub  $Zn^{2+}$  ale hamowana przez  $Cd^{2+}$  i pozostałe metale w stężeniach 100  $\mu M$  [181-183]. Aby wyjaśnić mechanizm regulacji pomp protonowych tonoplastu przez badane metale ciężkie, we współpracy z panią dr hab. Katarzyną Kabałą brałam udział w identyfikacji i sekwencjonowaniu genów

kodujących tonoplastowe białka PPazę i podjednostki V-ATPazy w genomie ogórka. Szczegółowa analiza ekspresji trzech genów kodujących podjednostkę c V-ATPazy (*CsVHA-c*) i dwóch genów kodujących V-PPazę typu I (*CsVHP1*) wykazała, że profile ekspresji poszczególnych izogenów różnią się w różnych organach i stadiach rozwoju ogórka a także pod wpływem  $\text{Cd}^{2+}$  i podwyższonych stężeń  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  lub  $\text{Zn}^{2+}$  [184]. Poziom transkryptów genów *CsVHA-c1* and *CsVHA-c2* był najwyższy w słupkach kwiatowych i starszych liściach, podczas gdy gen kodujący V-PPazę *CsVHP1;1* ulegał największej ekspresji w korzeniach i kwiatach żeńskich [184]. Z kolei poziom mRNA genów *CsVHA-c3* i *CsVHP1;2* był względnie stały we wszystkich badanych organach ogórka [184]. Znaczący wzrost ekspresji badanych genów obserwowaliśmy w korzeniach roślin uprawianych w obecności podwyższonych stężeń  $\text{Ni}^{2+}$  (*CsVHA-c1*, *CsVHA-c2*, *CsVHA-c3*, *CsVHP1;1*),  $\text{Cu}^{2+}$  (*CsVHA-c1*, *CsVHA-c2*, *CsVHP1;1*, *CsVHP1;2*),  $\text{Zn}^{2+}$  (*CsVHP1;2*) lub  $\text{Cd}^{2+}$  (*CsVHA-c2*) [184]. Ponieważ wcześniejsze analizy aktywności hydrolitycznej i transportowej V-ATPazy i V-PPazy w błonach tonoplastowych izolowanych z komórek korzeni ogórka wykazały, że toksyczne stężenia miedzi istotnie stymulują aktywności obydwu pomp protonowych zakładamy, że badane geny PP-azy i podjednostek V-ATPazy kodują białka o istotnym znaczeniu dla adaptacji roślin ogórka do stresu wywołanego nadmiarem miedzi w środowisku. Otrzymane wyniki opublikowaliśmy w formie jednej pracy oryginalnej:

- Kabała K, Janicka-Russak M, Reda M, **Migocka M** (2014) Transcriptional regulation of the V-ATPase subunit c and V-PPase isoforms in *Cucumis sativus* under heavy metal stress. *Physiologia Plantarum* 150(1): 32-45 [184]

Kolejna grupa białek o istotnym znaczeniu dla fizjologii komórek roślinnych to plazmolemowe oksydazy NADPH, znane także jako Rboh (ang. respiratory burst NADPH oxidase homolog). Podstawowa funkcja tych białek w komórkach polega na przekazywaniu elektronów z cytoplazmatycznego NADPH na zewnątrzkomórkowy tlen cząsteczkowy ( $\text{O}_2$ ) w celu syntezy anionorodnika ( $\text{O}_2^-$ ), który stosunkowo szybko jest przekształcany do nadtlenku wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Produkcja reaktywnych form tlenu na powierzchni komórek roślinnych jest formą wczesnej odpowiedzi roślin na warunki stresogenne (185-187). Przypuszcza się, że reaktywne formy tlenu syntetyzowane na powierzchni komórek uczestniczą w bezpośrednim zabijaniu patogenów atakujących rośliny, wzmacnianiu ścian komórkowych na drodze oksydacyjnego łączenia glikoprotein występujących w ścianach, transdukcji sygnału i programowanej śmierci komórki (186-188). Ze względu na swój udział w produkcji reaktywnych form tlenu, plazmolemowe oksydazy NADPH mogą być istotnym elementem odpowiedzi roślin na warunki stresowe. Jednym z celów badań prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin kierowanych przez dr hab. Małgorzatę Janicką było określenie zmian aktywności plazmolemowej oksydazy NADPH ogórka pod wpływem jonów  $\text{Cd}^{2+}$ ,

mające przybliżyć rolę tego białka w adaptacji roślin do stresu wywołanego obecnością balastowych metali ciężkich w środowisku. W trakcie swoich dotychczasowych badań, pani dr hab. Małgorzata Janicka we współpracy ze swoją doktorantką panią mgr Dagmarą Jakubowską wykazały, że aktywność oksydazy NADPH w plazmolemie izolowanej z korzeni ogórków jest znacznie stymulowana w obecności  $Cd^{2+}$ . Co ciekawe, wzrost aktywności tego enzymu korelował ze wzrostem aktywności plazmolemowej pompy protonowej  $H^+$ -ATPazy w korzeniach ogórków traktowanych  $Cd^{2+}$ . Wiadomo, że aktywność plazmolemowej  $H^+$ -ATPazy jest zależna od potencjału redoks błony komórkowej, który generuje oksydaza NADPH. Zatem obserwowane zmiany aktywności plazmolemowej oksydazy NADPH pod wpływem  $Cd^{2+}$  mogły pośrednio wpływać na zmiany aktywności plazmolemowej  $H^+$ -ATPazy. Aby przybliżyć mechanizm regulacji oksydazy NADPH w korzeniach ogórków, we współpracy z panią dr hab. Małgorzatą Janicką i panią mgr Dagmarą Jakubowską wykonaliśmy analizy ekspresji genów kodujących ten kompleks białkowy w korzeniach ogórków [189]. Analizy sekwencji genomu ogórka dostępnych w bazie GenBank wykazały, że ogórek posiada dziewięć genów kodujących kompleks oksydazy NADPH: *CsRbohB*, *CsRbohD*, *CsRbohE*, *CsRbohF1*, *CsRbohF2*, *CsRbohF3*, *CsRbohH1*, *CsRbohH2* i *CsRbohJ* [189]. Za pomocą metody ilościowego RT-PCR wykazałyśmy obecność transkryptów wszystkich zidentyfikowanych genów *CsRboh* w korzeniach ogórków [189]. Dalsze analizy Real-time PCR wykazały, że poziom ekspresji czterech genów oksydazy NADPH (*CsRbohF1*, *CsRbohF2*, *CsRbohF3* i *CsRbohJ*) w korzeniach ogórka istotnie wzrasta po wpływie  $Cd^{2+}$ , co sugeruje, że  $Cd^{2+}$  reguluje aktywność oksydazy na poziomie transkrypcji genów kodujących to białko [189]. Co więcej, aktywność enzymów katalizujących reakcje będące źródłem komórkowego NADPH była również istotnie zwiększona w korzeniach ogórków traktowanych  $Cd^{2+}$  [189]. Możemy zatem sądzić, że zwiększona aktywność plazmolemowej oksydazy NADPH w obecności  $Cd^{2+}$  wynikała nie tylko z pozytywnego wpływu  $Cd^{2+}$  na ekspresję genów kodujących enzym, ale także ze wzrostu ilości NADPH - substratu dla oksydazy w korzeniach stresowanych roślin [189]. Wyniki otrzymane w toku naszych badań pozwalają nam przypuszczać, że plazmolemowa oksydaza NADPH uczestniczy w odpowiedzi roślin ogórków na stres wywołany  $Cd^{2+}$  pośrednio poprzez regulację aktywności plazmolemowej  $H^+$ -ATPazy. Efektem naszych badań jest jedna praca oryginalna opublikowana w czasopiśmie Plant Science:

- Jakubowska D, Janicka-Russak M, Kabala K, **Migocka M**, Reda M (2015) Modification of plasma membrane NADPH oxidase activity in cucumber seedling roots in response to cadmium stress. Plant Science. 234:50-59 [189]

Kolejny z nurtów badań prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Molekularnej roślin obejmuje molekularną i funkcjonalną charakterystykę reduktazy azotanowej (NR), enzymu

katalizującego pierwszy etap asymilacji azotu przez rośliny, polegający na redukcji jonów azotanowych ( $\text{NO}_3^-$ ) do jonów azotynowych ( $\text{NO}_2^-$ ). Ze względu na swoją funkcję, reduktaza azotanowa jest enzymem o kluczowym znaczeniu dla życia roślin i determinuje ich wzrost, rozwój oraz plonowanie. Stąd dokładna molekularna charakterystyka tego białka u gatunków roślin uprawnych, a w szczególności poznanie mechanizmów jego regulacji w warunkach niekorzystnych dla wzrostu roślin jest niezmiernie ważne dla rozwiązania problemów współczesnego rolnictwa, związanych z zanieczyszczeniem gleb (przez metale ciężkie, zasolenie), nieracjonalnym nawożeniem gleb, nadmierną zawartością azotanów w roślinach oraz ich negatywnym wpływem na organizm człowieka. Badania ostatnich lat wykazały, że aktywność reduktazy azotanowej może być modyfikowana w warunkach zasolenia wywołanego zwiększonym poziomem NaCl w środowisku. Wykazano, że w zależności od czasu działania stresu solnego, jego natężenia oraz badanego organu i gatunku roślin, aktywność NR była znacznie obniżona (liście fasoli, kukurydzy, buraka cukrowego, pomidora) lub podwyższona (nasiona fasoli, korzenie pomidora i soi) w odpowiedzi na zasolenie [190-195]. Jednak molekularne mechanizmy regulacji aktywności tego enzymu przez sól nie były do końca jasne. Sugerowano, że stres solny może modyfikować aktywność NR poprzez negatywny wpływ na pobieranie azotanów (substratów dla enzymu) z podłoża, ekspresję genów kodujących to białko, a także modyfikacje potranslacyjne reduktazy. Wiadomo, że reduktaza NR podlega modyfikacjom potranslacyjnym: przyłączenie reszty fosforanowej do reszty serynowej enzymu (fosforylacja) w obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$  warunkuje związanie białka regulatorowego 14-3-3 z reduktazą i jej dezaktywację, natomiast odłączenie reszty fosforanowej (defosforylacja) powoduje aktywację reduktazy NR [196,197]. O ile liczne badania potwierdziły negatywny wpływ zasolenia na pobieranie azotanów przez rośliny [191,198-200], nadal brakowało danych dotyczących wpływu stresu solnego na transkrypcję genów reduktazy NR oraz modyfikacje potranslacyjne tego enzymu. Co więcej, znakomitą większość badań nad reduktazą NR przeprowadzono do tej pory na liściach roślin, pomimo, że aktywność tego enzymu wykryto także w korzeniach roślin. W związku z tym celem badań, w których uczestniczyłam w Zakładzie była identyfikacja genów kodujących reduktazę NR u ogórka a także określenie poziomu ekspresji tych genów oraz poziomu fosforylacji/defosforylacji reduktazy azotanowej w korzeniach ogórków uprawianych w warunkach stresu solnego. We współpracy z panią dr Małgorzatą Redą, zidentyfikowałyśmy w genomie ogórka trzy geny kodujące reduktazę azotanową (*CsNR1*, *CsNR2* i *CsNR3*), zamplifikowałyśmy i ustaliłyśmy skład nukleotdowy sekwencji tych genów oraz zaprojektowałyśmy specyficzne startery do badania poziomu ich transkryptów w różnych organach ogórka i w różnych warunkach uprawy tej rośliny [201]. Wszystkie trzy geny ulegały ekspresji w korzeniach ogórka, jednak poziom transkryptów dwóch z nich: *CsNR1* i *CsNR3* był znacznie obniżony na skutek krótkoterminowego (60 min) działania

NaCl w stężeniu 200 mM [201]. Jednocześnie w tych samych warunkach eksperymentalnych obserwowaliśmy znaczny wzrost aktualnej aktywności NR (nieufosforylowanej NR) w korzeniach, który był niwelowany w obecności inhibitorów fosfataz: kantarydyny i mikrocystyny-LR [201]. Otrzymane wyniki wskazują, że krótkoterminowe działanie stresu solnego powoduje zmiany w aktywności NR na dwóch poziomach regulacji: transkrypcyjnym, poprzez redukcję ekspresji genów kodujących reduktazę NR i potranslacyjny, poprzez stymulację aktywności enzymu na drodze odwracalnej defosforylacji zależnej od białkowych fosfataz [201]. Efektem naszej pracy jest jeden artykuł oryginalny opublikowany w czasopiśmie *Plant Science*:

- Reda M, **Migocka M**, Kłobus G (2011) Effect of short-term salinity on the nitrate reductase activity in cucumber roots. *Plant Science* 180(6):783-8 [201]

Spis literatury wykorzystanej podczas przygotowywania autoreferatu (publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe zaznaczono pogrubiną czcionką):

1. Instytut uprawy i Nawożenia gleb w Puławach, Ocena zanieczyszczenia gleb w Polsce [http://www.iung.pulawy.pl/index.php?option=com\\_content&view=article&id=147&Itemid=90](http://www.iung.pulawy.pl/index.php?option=com_content&view=article&id=147&Itemid=90)
2. NATO/CCMS (2002): Evaluation of demonstrated and emerging technologies for the treatment and clean-up of contaminated land and groundwater. Pilot Study Report 1985–2002, 2001 Update. North Atlantic Treaty Organisation, EPA 542-C-02-001, CD-ROM
3. Axelsen KB, Palmgren MG (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 46: 84-101.
4. Lopez-Marques RL, Poulsen LR, Hanisch S, Meffert K, Buch-Pedersen MJ i wsp. (2010) Intracellular targeting signals and lipid specificity determinants of the ALA/ALIS P4-ATPase complex reside in the catalytic ALA alpha-subunit. *Mol Biol Cell* 21: 791-801.
5. Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647-655.
6. Argüello JM, Eren E, Gonzalez-Guerrero M (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals* 20: 233-248.
7. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY (2007) Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 87: 1011–1046.
8. Mandal AK, Cheung WD, Argüello JM (2002) Characterization of a thermophilic P-type Ag<sup>+</sup>/Cu<sup>+</sup>-ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol.Chem* 277: 7201–7208.
9. Tsivkovskii R, Eisses JF, Kaplan JH, Lutsenko S (2002) Functional properties of the copper-transporting ATPase ATP7B (the Wilson's disease protein) expressed in insect cells. *J Biol Chem* 277: 976–983.
10. Eren E, Argüello JM (2004) Arabidopsis HMA2, a divalent heavy metal-transporting P(1B)-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn<sup>2+</sup> homeostasis. *Plant Physiol* 136: 3712-3723.
11. Barnes N, Tsivkovskii R, Tsivkovskaia N, Lutsenko S (2005) The copper-transporting ATPases, menkes and wilson disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum. *J Biol Chem* 280: 9640–9645.
12. Moreno I, Norambuena L, Maturana D i wsp. (2008) AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca<sup>2+</sup>/heavy metal pump. *J Biol Chem* 283: 9633-9641.
13. Catty P, Boutigny S, Miras R i wsp. (2011) Biochemical characterization of AtHMA6/PAA1, a chloroplast envelope Cu(I)-ATPase. *J Biol Chem* 286: 36188-36197.

14. Sautron E, Mayerhofer H, Giustini C, Pro D, Crouzy S i wsp. (2015) HMA6 and HMA8 are two chloroplast Cu<sup>+</sup>-ATPases with different enzymatic properties. *Biosci Rep* 35(3): e00201; DOI: 10.1042/BSR20150065.
15. Rensing C, Mitra B, Rosen BP (1997) The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14326–1433.
16. Rensing C, Sun Y, Mitra B, Rosen BP (1998) Pb(II)-translocating P-type ATPases *J Biol Chem* 273: 32614–3261.
17. Arguello JM, Mandal AK, Mana-Capelli S (2003) Heavy metal transport CPx-ATPases from the thermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Ann NY Acad Sci* 986: 212-218.
18. Solioz M, Stoyanov JV (2003) Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol Rev* 27: 183-195.
19. Raimunda D, Gonzalez-Guerrero M, Leeber BW, Arguello JM (2011) The transport mechanism of bacterial Cu<sup>+</sup>-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. *BioMetals* 24: 467-475.
20. Kanamaru, K., Kashiwagi, S. and Mizuno, T. (1994) A copper-transporting P-type ATPase found in the thylakoid membrane of the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942. *Mol. Microbiol.* 13, 369-377.
21. Tottey S, Rich PR, Rondet SA, Robinson NJ (2001) Two Menkes-type atpases supply copper for photosynthesis in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* 276: 19999-20004.
22. Fu D, Beeler TJ, Dunn TM (1995) Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu(2+)-ATPase subfamily. *Yeast* 11: 283-292.
23. Yuan DS, Dancis A, Klausner RD (1997) Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J Biol Chem* 272: 25787-25793.
24. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J (1993) Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* 3: 7-13.
25. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, I wsp. (1993) The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 5: 344-350.
26. Nyasae L, Bustos R, Braiterman L, Eipper B, Hubbard A (2007) Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper-dependent redistribution between two intracellular sites. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1181-1194.
27. Schaefer M, Hopkins RG, Failla ML, Gitlin JD (1999) Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *Am J Physiol* 276: G639-646.
28. Argüello JM (2003) Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol* 195: 93-108.
29. Seigneurin-Berny D, Gravot A, Auroy P, Mazard C, Kraut A, i wsp. (2006) HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions. *J Biol Chem* 281: 2882–2892.
30. Kim YY, Choi H, Segami S, Cho HT, Martinoia E, i wsp. (2009) AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn(II) in *Arabidopsis*. *Plant J* 58: 737–753.
31. Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, i wsp. (2009) AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149: 894–904.
32. Chao D-Y, Silva A, Baxter I, Huang YS, Nordborg M, Danku J, i wsp. (2012) Genome-wide association studies identify heavy metal ATPase3 as the primary determinant of natural variation in leaf cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 8:e1002923.
33. Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, i wsp. (2004) P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 1327–39.
34. Verret F, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, David P, Nussaume L, i wsp. (2004) Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Lett* 576: 306–12.



35. Wong CKE, Cobbett CS (2009) HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to-shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 181:71–8.
36. Andres-Colas N, Sancenon V, Rodriguez-Navarro S, Mayo S, Thiele DJ, i wsp. (2006) The *Arabidopsis* heavy metal P-type ATPase HMA5 interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *Plant J* 45: 225-236.
37. Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, i wsp. (1999) RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* 97: 383-393.
38. Binder BM, Rodriguez FI, Bleecker AB (2010) The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 285: 37263-37270.
39. Abdel-Ghany SE, Müller-Moulé P, Niyogi KK, Pilon M, Shikanai T (2005) Two P-type ATPases are required for copper delivery in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Plant Cell* 17(4): 1233-51.
40. Talke IN, 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 Physiol* 142: 148–67.
41. Courbot M, Willems G, Motte P, Arvidsson S, Roosens N, Saumitou-Laprade P, i wsp. (2007) A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with *HMA4*, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiol* 144: 1052–65.
42. Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, i wsp. (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required *cis*-regulatory changes and triplication of *HMA4*. *Nature* 453: 391–5.
43. Craciun AR, Meyer C-L, Chen J, Roosens N, De Groot R, Hilson P, i wsp. (2012) Variation in *HMA4* gene copy number and expression among *Noccaea caerulescens* populations presenting different levels of Cd tolerance and accumulation. *J Exp Bot* 63: 4179–89.
44. Ueno D, Milner MJ, Yamaji N, Yokosho K, Koyama E, Clemencia Zambrano M, i wsp. (2011) Elevated expression of *TcHMA3* plays a key role in the extreme Cd tolerance in a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Plant J* 66: 852–62.
45. Nies DH (2003) Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27(2-3): 313-339.
46. Chao Y, Fu D (2004) Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, *ZitB*. *J Biol Chem* 279(13): 12043-12050.
47. Grass G, Otto M, Fricke B, Haney CJ, Rensing C, Nies DH, Munkelt D (2005) *FieF* (*YiiP*) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* 183(1): 9-18.
48. Guffanti AA, Wei Y, Rood SV, Krulwich TA (2002) An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup>. *Mol Microbiol* 45(1):145-153.
49. MacDiarmid CW, Milanick MA, Eide DJ (2002) Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277(42): 39187-39194.
50. Anton A, Grosse C, Reissmann J, Pribyl T, Nies DH (1999) *CzcD* is a heavy metal ion transporter involved in regulation of heavy metal resistance in *Ralstonia* sp. strain CH34. *J Bacteriol* 181(22): 6876-6881.
51. Persans MW, Nieman K, Salt DE (2001) Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(17): 9995-10000.
52. Delhaize E, Kataoka T, Hebb DM, White RG, Ryan PR (2003) Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance. *Plant Cell* 15(5):1131-1142.
53. Kambe T, Yamaguchi-Iwai Y, Sasaki R, Nagao M (2004) Overview of mammalian zinc transporters. *Cell Mol Life Sci* 61(1):49-68.
54. Munkelt D, Grass G, Nies DH (2004) The chromosomally encoded cation diffusion facilitator proteins *DmeF* and *FieF* from *Wautersia metallidurans* CH34 are transporters of broad metal specificity. *J Bacteriol* 186(23): 8036-8043.
55. Hall JL, Williams LE (2003) Transition metal transporters in plants. *J Exp Bot* 54(393): 2601-2613.

56. Wei Y, Fu D (2005) Selective metal binding to a membrane-embedded aspartate in the *Escherichia coli* metal transporter YiiP (FieF). *J Biol Chem* 280(40): 33716-33724.
57. Li L, Kaplan J (2001) The yeast gene *MSC2*, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc. *J Biol Chem* 276(7): 5036-5043.
58. Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, Sasaki R, Mori K, Iwanaga T, Nagao M (2002) Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 277(21): 19049-19055.
59. Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M (2007) Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* 8:107.
60. Haney CJ, Grass G, Franke S, Rensing C: New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005, 32(6):215-226.
61. Blaudez D, Kohler A, Martin F, Sanders D, Chalot M (2003) Poplar Metal Tolerance Protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. *The Plant Cell* 15: 2911-2928.
62. Lu M, Fu D (2007) Structure of the zinc transporter YiiP. *Science* 317: 1746-1748.
63. Fukunana A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, Migaki H, Okumura K, Masuda S, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, Kambe T (2009) Demonstration and characterization of heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *Journal of Biol Chem* 284: 30798-30806.
64. Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR, Kung C (1992) *COT1*, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12: 3678–3688.
65. MacDiarmid CW, Gaither LA, Eide D (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 19: 2845–2855.
66. Miyabe S, Izawa S, Inoue Y (2001) *Zrc1* is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Comm* 282: 79–83.
67. Ellis CD, Wang F, MacDiarmid CW, Clark S, Lyons T, Eide DJ (2004) Zinc and the *Msc2* zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function. *J Cell Biol* 166: 325–335.
68. Li L, Miao R, Jia X, Ward DM, Kaplan J (2014) Expression of the yeast cation diffusion facilitators *Mmt1* and *Mmt2* affects mitochondrial and cellular iron homeostasis: evidence for mitochondrial iron export. *J Biol Chem* 289(24): 17132-41.
69. Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ and Findley SD (1996) *ZnT-3*, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (25): 14934–14939
70. Huang L, Kirschke CP, Gitschier J (2002) Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, *ZnT6*. *J Biol Chem* 277 (29): 26389–26395.
71. Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, Sasaki R, Mori K, Iwanaga T, Nagao M (2002) Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 277 (21): 19049– 19055.
72. Kirschke CP, Huang L (2003) *ZnT7*, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 278 (6): 4096–4102.
73. Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M (2004) Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, *ZnT-8*, localized into insulin secretory granules. *Diabetes* 53(9): 2330-7.
74. Falcón-Pérez JM, Dell'Angelica EC (2007) Zinc transporter 2 (SLC30A2) can suppress the vesicular zinc defect of adaptor protein 3-depleted fibroblasts by promoting zinc accumulation in lysosomes. *Exp Cell Res* 313(7):1473-83.
75. Lopez V, Kelleher SL (2009) Zinc transporter-2 (*ZnT2*) variants are localized to distinct subcellular compartments and functionally transport zinc. *Biochem J* 422 (1): 43–52.
76. Bosomworth HJ1, Thornton JK, Coneyworth LJ, Ford D, Valentine RA (2012) Efflux function, tissue-specific expression and intracellular trafficking of the Zn transporter *ZnT10* indicate roles in adult Zn homeostasis. *Metallomics* 4(8):771-9.
77. Palmiter RD, Findley SD (1995) Cloning and characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* 14:639–649.

78. Qin Y, Thomas D, Fontaine CP, Colvin RA (2009) Silencing of ZnT1 reduces Zn<sup>2+</sup> efflux in cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 450 (2): 206– 210.
79. Gustin JL, Zanis MJ, Salt DE (2011) Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC evolutionary biology* 11: 76.
80. Kobae Y, Uemura T, Sato MH, Ohnishi M, Mimura T, Nakagawa T, Maeshima M (2004) Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiol* 45: 1749-1758.
81. Arrivault S, Senger T, Kramer U (2006) The *Arabidopsis* metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 46: 861-879.
82. Delhaize E, Gruber BD, Pittman JK, White RG, Leung H, Miao Y, Jiang L, Ryan PR, Richardson AE (2007) A role for the AtMTP11 gene of *Arabidopsis* in manganese transport and tolerance. *The Plant journal: for cell and molecular biology* 51: 198-210.
83. Peiter E, Montanini B, Gobert A, Pendas P, Husted S, Maathuis FJ, Blaudez D, Chalot M, Sanders D (2007) A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *Proc Nat Acad Sci USA*, 104: 8532-8537.
84. Xu J, Chai T, Zhang Y, Lang M, Han L (2009) The cation-efflux transporter BjCET2 mediates zinc and cadmium accumulation in *Brassica juncea* L. leaves. *Plant Cell Rep* 28(8):1235-42.
85. Shahzad Z, Gosti F, Frerot H, Lacombe E, Roosens N, Saumitou-Laprade P, Berthomieu P (2010) The five AhMTP1 zinc transporters undergo different evolutionary fates towards adaptive evolution to zinc tolerance in *Arabidopsis halleri*. *PLoS genetics* 6: e1000911.
86. Lang M, Hao M, Fan Q, Wang W, Mo S, Zhao W, Zhou J (2011) Functional characterization of BjCET3 and BjCET4, two new cation-efflux transporters from *Brassica juncea* L. *J Exp Bot* 62(13):4467-80.
87. Podar D, Scherer J, Noordally Z, Herzyk P, Nies D, Sanders D (2012) Metal selectivity determinants in a family of transition metal transporters. *J Biol Chem* 287(5):3185-96.
88. Yuan L, Yang S, Liu B, Zhang M, Wu K (2012) Molecular characterization of a rice metal tolerance protein, OsMTP1. *Plant Cell Rep* 31: 67-79.
89. Kim D, Gustin JL, Lahner B, Persans MW, Baek D, Yun DJ, Salt DE (2004) The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi goesingense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J* 39(2): 237-51.
90. Gustin JL, Loureiro ME, Kim D, Na G, Tikhonova M, Salt DE (2009) MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuoles suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn-hyperaccumulating plants. *Plant J* 57(6): 1116-27.
91. Chen Z, Fujii Y, Yamaji N, Masuda S, Takemoto Y, Kamiya T, Yusuyin Y, Iwasaki K, Kato S, Maeshima M, Ma JF, Ueno D (2013) Mn tolerance in rice is mediated by MTP8.1, a member of the cation diffusion facilitator family. *J Exp Bot* 64: 4375-4387.
92. Pendas P, Stokholm MS, Hegelund JN, Ladegård AH, Schjoerring JK, and Husted S (2014) Golgi Localized Barley MTP8 Proteins Facilitate Mn Transport. *PLoS One* 9(12): e113759.
93. Salt DE, Wagner GJ (1993) Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity. *J Biol Chem* 268: 12297-12302.
94. Gries GE, Wagner GJ (1998) Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. *Planta* 204(3): 390-396.
95. Gonzalez A, Korenkov V, Wagner GJ (1999) A comparison of Zn, Mn, Cd and Ca transport mechanisms in oat root tonoplast vesicles. *Physiol Plant* 106: 203-209.
96. Burzyński M, Migocka M, Kłobus G (2005) Cu and Cd transport in cucumber (*Cucumis sativus* L.) root plasma membranes. *Plant Sci* 168: 1609-1614.
97. Migocka M, Kłobus G (2007) The properties of the Mn, Ni and Pb transport operating at plasma membranes of cucumber roots. *Physiol Plant* 129: 578-587.
98. **Migocka M, Papierniak A, Kosatka E, Kłobus G (2011) Comparative study of the active cadmium efflux systems operating at the plasma membrane and tonoplast of cucumber root cells. *J Exp Bot* 62(14): 4903-16.**

99. Salt DE, Rauser WE (1995) MgATP-Dependent Transport of Phytochelatins Across the Tonoplast of Oat Roots. *Plant Physiol* 107(4): 1293-1301.
100. Verkleij AC, Koevoets PLM, Blake-Kalf MMA, Chardonnens AN (1998) Evidence for an important role of the tonoplast in the mechanism of naturally selected Zn tolerance in *Silene vulgaris*. *J Plant Physiol* 153: 188-191.
101. Rea TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808.
102. Outten CE, O'Halloran TV (2001) Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis. *Science* 292(5526): 2488 – 2492.
103. Sharma SS, Dietz KJ (2006) The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot* 57(4): 711-726.
104. Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(gluthathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 42-27.
105. Sharma R, Rensing C, Rosen BP, Mitra B (2000) The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275: 3873-3878.
106. Mitra B, Sharma R (2001) The cysteine-rich amino-terminal domain of ZntA, a Pb(II)/Zn(II)/Cd(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*, is not essential for its function. *Biochemistry* 40(25): 7694-9.
107. Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X i wsp. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nat Genet* 41, 1275-1281.
108. Wóycicki R, Witkowicz J, Gawronski P i wsp. (2011) The genome sequence of the North-European cucumber (*Cucumis sativus* L.) unravels evolutionary adaptation mechanisms in plants. *PLoS One* 6, e22728.
109. GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
110. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
111. FGENESH: <http://www.softberry.com>
112. GeneMark.hmm: <http://exon.gatech.edu/GeneMark/gmhmm.cgi>
113. Migocka M, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Poździk P, Posyniak E, Garbiec A, Filleur S (2014) Cucumber metal transport protein MTP8 confers increased tolerance to manganese when expressed in yeast and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 65(18): 5367-84.
114. Migocka M, Kosieradzka A, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Posyniak E, Garbiec A, Filleur S (2015) Two metal-tolerance proteins, MTP1 and MTP4, are involved in Zn homeostasis and Cd sequestration in cucumber cells. *J Exp Bot* 66(3): 1001-1015.
115. Migocka M, Papierniak A, Kosieradzka A, Posyniak E, Maciaszczyk-Dziubińska E, Biskup R, Garbiec A, Marchewka T (2015) Cucumber Metal Transport Protein CsMTP9 is a plasma membrane H<sup>+</sup>-coupled antiporter involved in the Mn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> efflux from root cells. *The Plant Journal*, DOI: 10.1111/tpj.13056
116. Lapinskas PJ, Cunningham KW, Liu XF, Fink GR, Culotta VC (1995) Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase. *Mol Cell Biol* 15: 1382-1388.
117. Cunningham KW, Fink GR (1996) Calcineurin inhibits VCX1-dependent H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and induces Ca<sup>2+</sup> ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 2226-2237.
118. Pittman JK, Cheng NH, Shigaki T, Kunta M, Hirschi KD (2004) Functional dependence on calcineurin by variants of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger Vcx1p. *Mol Microbiol* 54: 1104-1116.
119. Migocka M, Papierniak A, Maciaszczyk-Dziubińska E, Posyniak E, Kosieradzka A (2015) Molecular and biochemical properties of two P1B2 -ATPases, CsHMA3 and CsHMA4, from cucumber. *Plant Cell Environ* 38: 1127-1141.
120. Migocka M, Posyniak E, Maciaszczyk-Dziubińska E, Papierniak A, Kosieradzka A (2015) Functional and Biochemical Characterization of Cucumber Genes Encoding two Copper ATPases CsHMA5.1 and CsHMA5.2. *J Biol Chem* 290(25):15717-29.

121. Thiele D.J. (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol* 8: 2745-2752.
122. Gralla EB, Thiele DJ, Silar P, Valentine JS (1991) ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 8558-8562.
123. Yang Y, Mandal AK, Bredeston LM, González-Flecha FL, Argüello JM (2007) Activation of *Archaeoglobus fulgidus* Cu(+)-ATPase CopA by cysteine. *Biochim Biophys Acta* 1768(3): 495-501.
124. **Migocka M (2015) Copper-transporting ATPases: The evolutionary conserved machineries for balancing copper in living systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 67(10): 737–745**
125. Higgins CF (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology* 8: 67-113.
126. Crouzet J, Trombik T, Fraysse AS, Boutry M (2006) Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett* 580: 1123-1130.
127. Smart CC, Fleming AJ (1996) Hormonal and environmental regulation of a plant PDR5-like ABC transporter. *J Biol Chem* 271: 19351–19357.
128. Sasabe M, Toyoda K, Shiraishi T, Inagaki Y (2002) cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Lett* 518(1):164
129. Ito H, Gray WM (2006) A gain-of-function mutation in the *Arabidopsis* pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. *Plant Physiol* 142: 63-74.
130. Moons A (2008) Transcriptional profiling of the PDR gene family in rice roots in response to plant growth regulators, redox perturbations and weak organic acid stresses. *Planta* 229: 53-71.
131. Růžička K, Strader LC, Bailly A, i wsp. (2010) *Arabidopsis* PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 10749-10753.
132. Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(5): 2355-60
133. Crouzet J, Roland J, Peeters E i wsp (2013) NtPDR1, a plasma membrane ABC transporter from *Nicotiana tabacum*, is involved in diterpene transport. *Plant Mol Biol* 82: 181-192.
134. Kretzschmar T, Kohlen W, Sasse J i wsp. (2012) A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* 483: 341-344.
135. Migocka M, Papierniak A, Warzybok A, Kłobus G (2012) CsPDR8 and CsPDR12, two of the 16 Pleiotropic Drug Resistance genes in cucumber, are transcriptionally regulated by phytohormones and auxin herbicide in roots. *Plant Growth Regulation* 67(2): 171 – 184
136. Campbell EJ, Schenk PM, Kazan K i wsp. (2003) Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 1272-1284.
137. Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005) AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138(2): 827-36
138. Kobae Y, Sekino T, Yoshioka H, Nakagawa T, Martinoia E, Maeshima M (2006) Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiol* 47: 309-318.
139. Stein M, Dittgen J, Sanchez-Rodriguez C, Hou BH, Molina A, Schulze-Lefert P, Lipka V, Somerville S (2006) *Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* 18: 731-746.
140. Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* 50: 207–218
141. Rajsza A, Warzybok A, Migocka M (2015) Genes encoding cucumber full-size ABCG proteins show different responses to plant growth regulators and sclareolide. *Plant Molecular Biology Reporter* DOI: 10.1007/s11105-015-0956-9

142. Migocka M, Papierniak A (2011) Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Molecular Breeding* 28(3):343-357
143. Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:5-17
144. Remans T, Smeets K, Opdenakker K, Mathijsen D, Vangronsveld J, Cuypers A (2008) Normalization of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. *Planta* 227:1343-1349
145. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, i wsp. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
146. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245-5250.
147. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509-515.
148. Forde BG (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465: 219–235.
149. Crawford NM, Glass ADM (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Sci* 3: 389-395.
150. Orsel M, Filleur S, Fraissier V, Daniel-Vedele F (2002) Nitrate transport in plants: Which gene and which control? *J Exp Bot* 53: 825–833.
151. Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett* 581: 2290–2300.
152. De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse J, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* 442: 939–942.
153. Von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, Ludewig U (2010) CLC-b-mediated  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles. *Plant Cell Physiol* 51(6): 960–968.
154. Migocka M, Warzybok A, Kłobus G (2013) The genomic organization and transcriptional pattern of genes encoding nitrate transporters 1 (NRT1) in cucumber. *Plant and Soil* 364(1): 245-260
155. Huang NC, Liu KH, Lo HJ, Tsay YF (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *Plant Cell* 11:1381–1392.
156. Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A et al (2006) Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*. *Physiology and protein-protein interaction. Plant Physiol* 142(3):1304–1317.
157. Warzybok A, Migocka M (2013) Reliable reference genes for normalization of gene expression in cucumber grown under different nitrogen nutrition. *PLoS ONE* 8(9): e72887. doi:10.1371/journal.pone.0072887
158. Liu KH, Huang CY, Tsay YF (1999) CHL1 Is a Dual-Affinity Nitrate Transporter of *Arabidopsis* Involved in Multiple Phases of Nitrate Uptake. *Plant Cell* 11: 865-874.
159. Ho CH, Lin SH, Hu HC, Tsay YF (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138: 1184–1194.
160. Warzybok A, Migocka M (2012) Udział białek NRT1 w transporcie azotanów u roślin. *Postępy biochemii* 58(1): 61-68.
161. Migocka M, Warzybok A, Papierniak A, Kłobus G (2013)  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  antiport in the tonoplast of cucumber root cells is stimulated by nitrate supply: evidence for a reversible nitrate-induced phosphorylation of vacuolar  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  antiport. *PLoS ONE* 8(9): e73972. doi:10.1371/journal.pone.0073972

162. Kabała K, Kłobus G, Janicka-Russak M (2003) Nitrate transport across the tonoplast of *Cucumis sativus* L. root cells. *J Plant Physiol* 159(11): 1245–1253.
163. International Agency for Research on Cancer. Summary & Evaluations, <http://www.inchem.org/documents/arc/vol47/47-11.html>
164. Smith A, Hopenhayn-Rich C, Bates M, Goeden HM (1992) Cancer risks from arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* 97: 259–267.
165. Wysocki R, Bobrowicz P, Ulaszewski S (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 Gene Encodes a Putative Membrane Protein Involved in Arsenite Transport *J Biol Chem* 272 (1997): 30061–30066.
166. Wysocki R, Chéry CC, Wawrzycka D, Van Hulle M, Cornelis R, Thevelein JM, Tamás MJ (2001) The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 40: 1391– 1401.
167. Maciaszczyk-Dziubińska E, Migdal I, Migocka M, Bocér T, Wysocki R (2010) The yeast aquaglyceroporin FPS1p is a bidirectional arsenite channel. *FEBS Letters* 584: 726-732
168. Maciaszczyk-Dziubińska E, Wawrzycka D, Sloma E, Migocka M, Wysocki R (2010) The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798(11):2170-5
169. Maciaszczyk-Dziubińska E, Migocka M, Wysocki R (2011) Acr3p is a plasma membrane antiporter that catalyzes As(III)/H(+) and Sb(III)/H(+) exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1808(7):1855-9
170. Meng YL, Liu Z, Rosen BP (2004) As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279: 18334–18341.
171. Maciaszczyk-Dziubińska E, Migocka M, Wawrzycka D, Markowska K, Wysocki R (2014) Multiple cysteine residues are necessary for sorting and transport activity of the arsenite permease Acr3p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838(3):747-55.
172. Markowska K, Maciaszczyk-Dziubińska E, Migocka M, Wawrzycka D, Wysocki R (2015) Identification of critical residues for transport activity of Acr3p, the *Saccharomyces cerevisiae* As(III)/H<sup>+</sup> antiporter. *Molecular Microbiology* 98(1):162-74
173. Kolaczowska A, Goffeau A (1999) Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist Updates* 2: 403–414.
174. Bobrowicz P, Wysocki R, Owsianik R, Goffeau A, Ulaszewski S (1997) Isolation of Three Contiguous Genes, ACR1, ACR2 and ACR3, Involved in Resistance to Arsenic Compounds in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 819–828.
175. Ghosh M, Shen J, Rosen BP (1999) Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5001-5006
176. Mukhopadhyay R, Shi J, Rosen BP (2000) Purification and Characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* Arsenate Reductase *J Biol Chem* 275: 21149–21157.
177. Bouganin N, David J, Wysocki R, Ramotar D (2001) Yap1 overproduction restores arsenite resistance to the ABC transporter deficient mutant *ycf1* by activating ACR3 expression. *Biochem Cell Biol* 79(4): 441-8.
178. Menezes RA, Amaral C, Delaunay A, Toledano M, Rodrigues-Pousada C (2004) Yap8p activation in *Saccharomyces cerevisiae* under arsenic conditions. *FEBS Lett* 566(1-3): 141-6.
179. Veide Vilg J, Kumar NV, Maciaszczyk-Dziubińska E, Sloma E, Onesime D, Aubert J, Migocka M, Wysocki R, Tamás MJ (2014) Elucidating the response of *Kluyveromyces lactis* to arsenite and peroxide stress and the role of the transcription factor Klyap8. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms* 1839(11): 1295-1306
180. Rea PA, Sanders D. 1987. Tonoplast energization: two H<sup>+</sup>-pumps, one membrane. *Physiol Plant* 71: 131–141.
181. Kabała K, Janicka-Russak M, Anklewicz A (2013) Mechanism of Cd and Cu action on the tonoplast proton pumps in cucumber roots. *Physiol Plant* 147(2): 207-17.
182. Kabała K, Janicka-Russak M, Kłobus G (2010) Different responses of tonoplast proton pumps in cucumber roots to cadmium and copper. *J Plant Physiol* 167(16): 1328-35.

183. Kabała K, Janicka-Russak M (2011) Differential regulation of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase in *Cucumis sativus* roots by zinc and nickel. *Plant Sci* 180(3): 531-9.
184. Kabała K, Janicka-Russak M, Reda M, Migocka M (2014) Transcriptional regulation of the V-ATPase subunit c and V-PPase isoforms in *Cucumis sativus* under heavy metal stress. *Physiologia Plantarum* 150(1): 32-45
185. Doke N (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol Plant Pathol* 23: 359–367.
186. Hammond-Kosack, KE, Jones JDG(1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773–1791.
187. Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251–275.
188. Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant–microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793–1807.
189. Jakubowska D, Janicka-Russak M, Kabała K, Migocka M, Reda M (2015) Modification of plasma membrane NADPH oxidase activity in cucumber seedling roots in response to cadmium stress. *Plant Science* 234:50-59
190. Debouba M, Maâroufi-Dghimi H, Suzuki A, Ghorbel MH, Gouia H (2007) Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. *Ann Bot* 99: 1143-1151.
191. Gouia H, Ghorbal MH, Touraine B (1994) Effects of NaCl on flows of N and mineral ions and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction rate within whole plants of salt-sensitive bean and salt-tolerant cotton. *Plant Physiol* 105: 1409-1418.
192. Abd el Baki GK, Siefritz F, Man HM, Welner H, Kaldenhoff R, Kaiser WM (2000) Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell Environ* 23: 515-521.
193. Ghoulam C, Foursy A, Fares K (2002) Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environ Exp Bot* 47: 39-50.
194. Misra N, Dwivedi UN (1990) Nitrogen assimilation in germinating *Phaseolus aureus* seeds under saline stress. *J Plant Physiol* 135: 719-724.
195. Bourgeais-Chaillou P, Perez-Alfocea F, Guerrier G (1992) Comparative effects of N-Sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl-stress. *J Exp Bot* 43: 1225-1233.
196. Campbell WH (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 277-303.
197. Kaiser WM, Weiner H, Kandlbinder A, Tsai Ch-B, Rockel P, Sonoda M, Planchet E (2002) Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *J Exp Bot* 53: 875-882.
198. Flores P, Botella MÁ, Cerdá A, Martínez V (2004) Influence of nitrate level on nitrate assimilation in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants under saline stress. *Can J Bot* 82: 207-213.
199. Botella MA, Martínez V, Nieves M, Cerdá A (1997) Effect of salinity on the growth and nitrogen uptake by wheat seedlings. *J Plant Nutr* 20: 793-804.
200. Sweby DL, Hockett BL, Watt MP (1994) Effects of nitrogen nutrition on salt-stressed *Nicotiana tabacum* var. Samsun *in vitro* plantlets. *J Exp Bot* 45: 995-1008.
201. Reda M, Migocka M, Kłobus G (2011) Effect of short-term salinity on the nitrate reductase activity in cucumber roots. *Plant Science* 180(6):783-8

Magdalena Migocka