

AUTOREFERAT

przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych

dr Agnieszka Mierek-Adamska

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

Katedra Genetyki

1. Imię i nazwisko

Agnieszka Mierek-Adamska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

05.07.2005: Dyplom licencjata biotechnologii uzyskany na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych). Praca licencjacka pt. „Ekspresja genów związanych ze stresem oksydacyjnym w układzie światło/ciemność”, promotor prof. dr hab. Grażyna Dąbrowska.

04.07.2007: Dyplom ukończenia Studium Pedagogicznego potwierdzający kwalifikacje pedagogiczne uzyskany na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Nauk Pedagogicznych (obecnie Instytut Nauk Pedagogicznych, Wydział Filozofii i Nauk Społecznych).

04.07.2007: Dyplom magistra biotechnologii uzyskany na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych). Praca magisterska pt. „Analiza ekspresji genu akwaporyny *PnPIP1 Ipomoea nil* w warunkach stresu abiotycznego. Klonowanie i analiza sekwencji genu akwaporyny *Ipomoea nil* (*PnPIP2*)”, promotor dr hab. Anna Goc.

18.10.2013: Dyplom doktora nauk biologicznych uzyskany na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska (obecnie Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych). Praca doktorska pt. „Molekularna i funkcjonalna charakterystyka genów metalotionein *Brassica napus* L.”, promotor dr hab. Anna Goc, recenzenci prof. dr hab. Danuta Antosiewicz oraz prof. dr hab. Franciszek Dubert.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

01.10.2012-31.12.2019: Asystent w Zakładzie Genetyki (obecnie Katedra Genetyki), Wydział Biologii i Ochrony Środowiska (obecnie Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych), Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (w tym czasie roczny i dwuletni urlop naukowy oraz od 01.10.2016 do 31.07.2017 zwolnienie lekarskie i urlop macierzyński).

01.10.2014-30.09.2015: Staż podoktorski, Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry, Wielka Brytania.

01.08.2017-31.07.2019: Stypendystka MSCA-IF (Marie Curie Research Fellow), Department of Chemistry, School of Life Sciences, University of Warwick, Coventry, Wielka Brytania.

01.01.2020-obecnie: Adiunkt w Katedrze Genetyki, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

4. Wskazanie osiągnięć wynikających z art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późniejszymi zmianami)

4.1. Tytuł

Cykl publikacji z lat 2018-2026 pt.

Rola metalotionein w magazynowaniu metali ciężkich oraz rozwoju i adaptacji do warunków środowiskowych u roślin uprawnych

4.2. Cykl publikacji

P1. Mierek-Adamska A, Dąbrowska GB, Blindauer CA (2018) The type 4 metallothionein from *Brassica napus* seeds folds in a metal-dependent fashion and favours zinc over other metals. *Metallomics* 10: 1430-1443.

DOI: 10.1039/C8MT00161H

IF₂₀₁₈ 3,571, Q2, liczba cytowań 25 (Google Scholar), 20 (Web of Science), punkty MNiSW 100
Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, pozyskaniu finansowania na wyjazd podoktorski na Uniwersytet Warwick i badania (stypendium podoktorskie w ramach projektu "Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych"), zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń tj.: analiza poziomu mRNA, analiza wzrostu bakterii, przygotowanie konstruktów do ekspresji białka w komórkach bakteryjnych, ekspresja białka w komórkach bakteryjnych, izolacja i oczyszczanie białka, analiza białek poprzez spektrometrię mas, spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego oraz spektroskopię UV-Vis, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu rycin i tabel, analizie statystycznej wyników oraz korekcie manuskryptu po recenzjach.

P2. Mierek-Adamska A, Kotowicz K, Goc A, Boniecka J, Berdychowska J, Dąbrowska G (2019) Potential involvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) metallothioneins in the hydrogen peroxide-induced regulation of seed vigour. *Journal of Agronomy and Crop Science* 205: 598-607.

DOI: 10.1111/jac.12361

IF₂₀₁₉ 3,057, Q1, liczba cytowań 17 (Google Scholar), 15 (Web of Science), punkty MNiSW 140
Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, pozyskaniu finansowania na badania (grant wewnętrzny UMK 1532-B oraz 1934-B), zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń tj.: przygotowanie konstruktów genowych do ekspresji białek w komórkach bakteryjnych i drożdżowych, funkcjonalna analiza białek, analiza siły kiełkowania nasion, analiza wzrostu siewek, analiza poziomu mRNA, koordynacji badań

wykonywanych przez innych współautorów, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu rycin i tabel, analizie statystycznej wyników oraz korekcie manuskryptu po recenzjach.

P3. Konieczna W, **Mierek-Adamska A**, Warchoń M, Skrzypek E, Dąbrowska GB (2023) The involvement of metallothioneins and stress markers in response to osmotic stress in *Avena sativa* L. Journal of Agronomy and Crop Science 209: 371-389.

DOI: 10.1111/jac.12633

IF₂₀₂₃ 3,5, Q1, liczba cytowań 7 (Google Scholar), 5 (Web of Science), punkty MNiSW 140

Mój wkład w powstanie tej publikacji był równoważny z wkładem pierwszego wymienionego autora Wiktorii Koniecznej i polegał na współudziale w zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń tj.: sklonowanie sekwencji kodujących oraz genomowych metalotionein owsa, wykonanie analiz in silico otrzymanych sekwencji, przygotowanie konstruktów genowych do ekspresji białek w komórkach bakteryjnych i funkcjonalna analiza białek, analiza poziomu mRNA, koordynacji badań prowadzonych przez innych współautorów, napisaniu manuskryptu, analizie statystycznej wyników oraz korekcie manuskryptu po recenzjach.

P4. **Mierek-Adamska A**, Kulasek M, Dąbrowska GB, Blindauer CA (2025) Type 4 plant metallothioneins – players in zinc biofortification? Biological Reviews 100: 1229-1249.

DOI: 10.1111/brv.13182

IF₂₀₂₅ 11,7, Q1, liczba cytowań 3 (Google Scholar), 0 (Web of Science), punkty MNiSW 200

Mój wkład w powstanie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy przeglądowej, dokonaniu przeglądu i wyboru literatury, przygotowaniu rycin i tabel, napisaniu manuskryptu, koordynacji pracy pozostałych współautorów oraz korekcie manuskryptu po recenzjach. W tej publikacji jestem również autorem korespondencyjnym.

P5. **Mierek-Adamska A**, Tylman-Mojżesz W, Pawełek A, Kulasek M, Dąbrowska GB (2025) The potential role of *Brassica napus* metallothioneins in salt stress and interactions with plant growth-promoting bacteria. Genes 16: 166.

DOI: 10.3390/genes16020166

IF₂₀₂₅ 2,4, Q2, liczba cytowań 1 (Google Scholar), 0 (Web of Science), punkty MNiSW 100

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu i zaplanowaniu eksperymentów, pozyskaniu finansowania na badania (finansowanie w ramach projektu Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza, Wyłaniające się Pole Badawcze) oraz współudziale w wykonaniu doświadczeń tj.: przygotowaniu materiału roślinnego do analiz, analiza wzrostu siewek i roślin, analiza poziomu mRNA, analiza in silico sekwencji promotorowych, analiza wzrostu bakterii, koordynacji badań prowadzonych przez innych współautorów, opracowaniu

wyników, napisaniu manuskryptu, analizie statystycznej wyników, przygotowaniu rycin i tabel oraz korekcie manuskryptu po recenzjach. W tej publikacji jestem również autorem korespondencyjnym.

P6. Mierek-Adamska A, Gutierrez-Marcos J, Blindauer CA (2026) Histidines promote zinc over cadmium binding to the single type 4 metallothionein from Great Millet (*Sorghum bicolor*). Journal of Inorganic Biochemistry 278: 113227.

DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2026.113227

IF₂₀₂₅ 3,2, Q3, liczba cytowań 0 (Google Scholar), 0 (Web of Science), punkty MNiSW 100

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, pozyskaniu finansowania na badania (stypendium IF-MSCA, PMTFOS-702492), zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich eksperymentów tj.: pozyskanie mutantów na drodze mutagenезy ukierunkowanej, przygotowanie konstruktów do ekspresji białka w komórkach bakteryjnych, ekspresja białka w komórkach bakteryjnych, izolacja i oczyszczanie białka, analiza białek poprzez spektrometrię mas oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego, przygotowanie konstruktów do transformacji roślin, transformacja roślin, selekcja transformatów i pozyskanie linii homozygotycznych, namnożenie materiału roślinnego do oznaczania zawartości pierwiastków, opracowaniu wyników, napisaniu manuskryptu, przygotowaniu rycin i tabel, analizie statystycznej wyników oraz korekcie manuskryptu po recenzjach. W tej publikacji jestem również autorem korespondencyjnym.

4.3. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

1. Wstęp

Jednym z najważniejszych problemów stojących obecnie przez ludzkością jest zapewnienie **bezpieczeństwa żywnościowego** (Cole i in., 2018). Komisja ds. Światowego Bezpieczeństwa Żywnościowego (*Committee on World Food Security - CFS*) w następujący sposób definiuje bezpieczeństwo żywnościowe: „Bezpieczeństwo żywnościowe istnieje, kiedy wszyscy ludzie, przez cały czas mają fizyczny, społeczny i ekonomiczny dostęp do wystarczającej ilości, bezpiecznej i odżywczej żywności, która odpowiada ich potrzebom żywieniowym i preferencjom [...]. **Czterema filarami bezpieczeństwa żywnościowego są dostępność, dostęp, wykorzystanie i stabilność**” (CFS, 2013). Definicja ta wskazuje, że do osiągnięcia bezpieczeństwa żywnościowego niezbędna jest nie tylko wystarczająca ilość żywności, ale również fizyczny i ekonomiczny dostęp do żywności dla wszystkich, odpowiednia jakość żywności oraz stabilność dostaw niezależna od zmieniających się czynników zewnętrznych. W celu zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego kluczowe jest więc zapewnienie odpowiedniej ilości żywności oraz produkcja żywności wolnej od toksyn i innych niebezpiecznych substancji i jednocześnie zapewniającej odpowiednią ilość składników odżywczych (Ingram, 2020).

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) i Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) szacują, że na świecie ponad **700 mln ludzi cierpi z powodu niedoboru pożywienia**, a każdego roku z tego powodu umiera 3 mln dzieci (FAO, 2024). Natomiast z powodu **ukrytego głodu, tj. niedostatecznej ilości mikroelementów i witamin w diecie, według szacunków cierpi na całym świecie około 2 mld ludzi**. Problem głodu występuje przede wszystkim w krajach o niskim i średnim przychodzie. Dla ilustracji tego faktu można przytoczyć porównanie: w skali światowej z powodu głodu cierpi 1 osoba na 11, natomiast w Afryce 1 osoba na 5. Natomiast problem ukrytego głodu dotyka również mieszkańców krajów wysokorozwiniętych. Niedobór mikroelementów takich jak żelazo (Fe), jod (I) czy cynk (Zn) i witamin np. witaminy A jest zwykle trudny do wykrycia, a jego wyraźne objawy pojawiają się dopiero kiedy braki poszczególnych elementów są na wysokim poziomie. Ważne jest też podkreślenie, że **ukryty głód dotyka także osób, które spożywają odpowiednią czy nawet zbyt wysoką liczbę kalorii**. Znacznie problemu ukrytego głodu podkreśla fakt, że światowi eksperci w tym laureaci Nagrody Nobla w dziedzinie ekonomii zaangażowani w Konsensus Kopenhaski (*Copenhagen Consensus Centre*) uznali walkę z niedoborem mikroelementów za jedno z najważniejszych ogólnoswiatowych działań potrzebnych do długofalowej poprawy dobrobytu społeczeństwa. WHO szacuje, że każdego roku 250-500 tyś. dzieci traci wzrok z powodów niedoborów witaminy A, a połowa z nich umiera w ciągu następnych 12 miesięcy. **Te alarmujące dane wskazują jak ważna jest jakość pożywienia, zwłaszcza zawartość witamin i mikroelementów.**

Rosnąca w sposób wykładniczy światowa populacja, z szacunkowym wzrostem do 9,7 mld ludzi w roku 2050, wymusza produkcję coraz większej ilości pożywienia kosztem zwiększania obszarów ziem uprawnych. Obecnie obszary rolne zajmują niemal 40% powierzchni Ziemi, a według szacunków FAO obszary te będą dalej się rozrastać zwłaszcza w krajach rozwijających się. **Związek między maksymalizacją produkcji roślinnej a odżywczą wartością wytwarzanej na bazie roślin żywności jest złożony.** Zielona rewolucja XX wieku miała ogromne znaczenie dla walki z głodem poprzez wprowadzenie nowoczesnych technik agronomicznych, jak nawożenie i nawodnienie oraz wysokoplonujących odmian roślin. Spowodowało to jednak obniżenie jakości roślin pod względem ich wartości odżywczej, co potęguje występowanie ukrytego głodu. Ponadto stosowanie nawozów sztucznych i pestycydów przyczyniło się do degradacji środowiska naturalnego, w tym degradacji gleb, zanieczyszczenia wód i redukcji bioróżnorodności (Yilmaz & Yilmaz, 2025). Rozwiązaniem tego impasu jest więc poszukiwanie holistycznych rozwiązań, które zapewnią **maksymalizację plonów przy jednoczesnym zapewnieniu odpowiednich wartości odżywczych roślin i ochronie środowiska.** Obecnie istnieją różne podejścia do rozwiązania tych problemów. Należy tu wymienić dywersyfikację monokultur, jak płodozmian czy uprawę różnych gatunków/odmian na tym samym polu (Wuest, Peter & Niklaus, 2021), poszukiwanie odmian roślin uprawnych o pożądanych cechach wśród istniejących odmian (Yolcu, Alavilli & Lee, 2020) czy wreszcie wytwarzanie nowych odmian na drodze transgenezy czy edycji genomów (Marone, Mastrangelo & Borrelli, 2023). Konieczne jest wytworzenie odmian zdolnych do kiełkowania, wzrostu i plonowania w glebach o niskiej jakości, nieprzewidywalnych warunkach środowiskowych przy zastosowaniu niewielkiej ilości środków agrochemicznych. W kontekście wartości odżywczych roślin ważna jest również **biodostępność składników odżywczych**, która będzie zależeć nie tylko od całkowitej zawartości danego pierwiastka, ale także od formy chemicznej w jakich jest zmagazynowany w tkankach roślinnych oraz zawartości innych mikro- i makroelementów (Stanton i in., 2022).

Do ważnych białek odpowiedzialnych za akumulację metali ciężkich w roślinach, a także wpływających ich biodostępnością należą metalotioneiny (MT). **Do nadrodziny MT zaliczane są zróżnicowane białek obecne u wszystkich Eukaryota**, wyizolowane po raz pierwszy z kory nerki konia w 1957 roku jako białko wiążące kadm (Margoshes & Vallee, 1957). Białko to, o długości 61 aminokwasów, zawierało 20 reszt cysteinowych oraz nie zawierało aminokwasów aromatycznych. W kolejnych latach wyizolowano MT z innych kręgowców, a wyizolowane białka miały wysoki stopień homologii z pierwszą MT. Z roślin po raz pierwszy MT wyizolowano z zarodków *Triticum aestivum* L. w 1987 jako białko wiążące cynk (białko nazwano E_c – *early cysteine-labelled*) (Lane, Kajioka & Kennedy, 1987). Sekwencje MT z innych niż kręgowce organizmów nie były homologiczne do pierwszej kanonicznej sekwencji MT ze względu na inny układ i liczbę reszt cysteinowych oraz obecność nielicznych aminokwasów aromatycznych. Niezwykłe zróżnicowanie nadrodziny MT w świecie organizmów żywych jest zilustrowane przez ich podział na 15 rodzin i podrodzin na podstawie podobieństwa sekwencji

i pochodzenia filogenetycznego (Binz & Kägi, 1999). Metalotioneiny zidentyfikowano również u niektórych Prokaryota jak cyjanobakterie, *Pseudomonas* czy *Mycobacterium* (Blindauer, 2011). Mimo ogromnego zróżnicowania za cechy wspólne MT uznaje się: (i) **niskocząsteczkowe** (do 10 kDa), (ii) **bogate w reszty cysteinowe** (nawet do 30% wszystkich aminokwasów) oraz (iii) nie posiadają (lub posiadają niewiele) aminokwasów aromatycznych (Ziller & Fraissinet-Tachet, 2018). Analiza filogenetyczna wskazuje, że MT są polifiletyczną grupą białek tj. członkowie danej rodziny są spokrewnieni ewolucyjnie, natomiast związki ewolucyjne pomiędzy rodzinami pozostają nie w pełni wyjaśnione (Krężel & Maret, 2021). MT wiążą jony metali ciężkich poprzez formowanie kompleksów z grupami tiolowymi (-SH) reszt cysteinowych. Mimo ogromnego zróżnicowania strukturalnego tych białek uważa się, że ich główne role wspólne dla różnych grup organizmów to (i) **utrzymanie homeostazy mikroelementów** zwłaszcza cynku (Zn) i miedzi (Cu) oraz (ii) **detoksykacja toksycznych jonów metali** ciężkich zwłaszcza kadmu (Cd). Ponadto utlenienie zredukowanych grup -SH lub wiązania -S-metal jest mechanizmem służącym do usuwania reaktywnych form tlenu (RFT), dzięki czemu MT wykazują również **działanie antyoksydacyjne** (Capdevila i in., 2012).

Roślinne metalotioneiny (pMT) są bardziej zróżnicowane niż MT innych organizmów i zostały podzielone na **4 typy** (pMT1-4) w zależności od liczby i układu reszt cysteinowych: 12 cystein w pMT1, 14 cystein w pMT2, 10 cystein w pMT3 oraz 17 cystein w pMT4. Cysteiny w pMT1-3 są zgrupowane w domenach na N- i C-końcu białka, natomiast w pMT4 są trzy domeny bogate w reszty cysteinowe (Ziller & Fraissinet-Tachet, 2018). W analizowanych genomach roślin występuje zwykle wiele genów kodujących MT np. u *Arabidopsis thaliana* jest 7 ekspymowanych genów (w tym po 2 kodujące MT typu 1, 2 i 4 oraz jeden kodujący MT typu 3) oraz jeden pseudogen. W znanych obecnie genomach roślinnych występują MT wszystkich typów. Roślinne MT należące do danego typu są w wysokim stopniu konserwowane ewolucyjnie, szczególnie w obrębie domen bogatych w cysteiny, zwłaszcza w roślinach okrytonasiennych. Analiza sekwencji zdeponowanych w bankach genów pokazuje istnienie MT o nietypowym układzie/liczbie reszt cysteinowych, jednakże niewiele wiadomo na temat wpływu tych zmian strukturalnych na funkcjonowanie białek (Leszczyszyn, Imam & Blindauer, 2013). **Mimo wielu lat badań wciąż pozostają otwarte pytania dotyczące funkcji roślinnych metalotionein. Nie jest też w pełni jasne czy zróżnicowanie strukturalne odzwierciedla zróżnicowanie funkcjonalne roślinnych MT.** Liczne doniesienia potwierdzają udział roślinnych MT w utrzymaniu homeostazy cynku i miedzi (Guo, Meetam & Goldsbrough, 2008; Ren i in., 2012; Lei, Yamaji & Ma, 2021; Mosna, Jurczak & Krężel, 2023), detoksykacji kadmu (Rono i in., 2021; Yan i in., 2023) czy arsenu (Pan i in., 2018) oraz usuwaniu RFT (Xue i in., 2009; Ma i in., 2023). Ponadto istnieją doniesienia pokazujące możliwy udział pMT w odpowiedzi rośliny na różnorakie warunki środowiskowe, takie jak: niska temperatura (Singh i in., 2011; Feng i in., 2022), susza (Chen i in., 2024), zasolenie (Xue i in., 2009) czy infekcja przez patogeny roślin (Dowd, Naumann & Johnson, 2023).

Problemy ze zdefiniowaniem funkcji roślinnych MT wynikają z kilku powodów:

(i) plejotropowego efektu działania metalotionein (poprzez wiązanie Zn/Cu i reakcje z RFT metalotioneiny oddziałują na niezliczone procesy komórkowe), (ii) braku kompleksowych badań analizujących przynajmniej po jednym przedstawicielu danego typu MT u jeden rośliny w danych warunkach i na danym etapie rozwoju/w danej tkance czy organie, (iii) braku dogłębnych badań właściwości biofizycznych białek pMT zwłaszcza w przypadku roślinnych MT typu 1-3, a w przypadku roślinnych MT typu 4 ograniczenie tych analiz do kilku gatunków roślin, (iv) braku kompleksowego spojrzenia łączącego właściwości strukturalne (badania właściwości biofizycznych białek) z funkcjami biologicznymi (badania *in planta*).

2. Omówienie wyników badań

W poniższym tekście cytowania publikacji stanowiących część cyklu publikacji niniejszego osiągnięcia oznaczono **P1-P6** zgodnie z numeracją w podrozdziale 4.2, natomiast cytowania innych prac własnych podkreślono.

Wymienione powyżej problemy, których skutkiem jest brak zdefiniowanej roli roślinnych metalotionein stały się moją inspiracją do podjęcia badań nad roślinnymi metalotioneinami. W toku moich badań wykazałam **dualistyczną rolę MT roślinnych** tzn. z jednej strony są to białka uczestniczące we wzroście i rozwoju roślin oraz adaptacji do warunków środowiskowych, a z drugiej są to białka zaangażowane w akumulację mikroelementów (zwłaszcza cynku) oraz chroniące przed akumulacją toksycznych jonów metali ciężkich (zwłaszcza kadmu). Wyniki moich badań opublikowane w latach 2018-2026 zebrane w 5 pracach eksperymentalnych oraz 1 pracy przeglądowej (suma punktów MNiSW/MEiN 715 oraz sumaryczny IF 27,4, zgodnie z rokiem opublikowania), przedstawię w postaci dwóch podrozdziałów odzwierciedlających funkcjonalne zróżnicowanie roślinnych metalotionein.

Rola roślinnych metalotionein we wzroście i rozwoju oraz adaptacji jedno- i dwuliściennych roślin uprawnych do warunków środowiskowych

P2. Mierek-Adamska A, Kotowicz K, Goc A, Boniecka J, Berdychowska J, Dąbrowska GB (2019) Potential involvement of rapeseed (*Brassica napus* L.) metallothioneins in the hydrogen peroxide-induced regulation of seed vigour. *Journal of Agronomy and Crop Science* 205: 598-607.

P3. Konieczna W, Mierek-Adamska A, Warchoń M, Skrzypek E, Dąbrowska GB (2023) The involvement of metallothioneins and stress markers in response to osmotic stress in *Avena sativa* L. *Journal of Agronomy and Crop Science* 209: 371-389.

P5. Mierek-Adamska A, Tylman-Mojżesz W, Pawełek A, Kulasek M, Dąbrowska GB (2025) The potential role of *Brassica napus* metallothioneins in salt stress and interactions with plant growth-promoting bacteria. *Genes* 16: 166.

Nadrzędnym pytaniem badań opisanych w tym podrozdziale **była rola roślinnych metalotionein w odpowiedzi roślin uprawnych na niekorzystne warunki środowiskowe oraz ich udział we wzroście i rozwoju**. Badania te miały też na celu zrozumienie jak różne typy roślinnych metalotionein działają w odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe oraz jak współdziałają z innymi elementami składowymi mechanizmów reakcji na warunki środowiskowe, w tym m. in. z enzymami antyoksydacyjnymi czy fitohormonami. Badania prowadzone w tej części dotyczyły dwóch roślin uprawnych o ogromnym znaczeniu w żywieniu ludzi i zwierząt oraz różnych gałęziach przemysłu. Polska jest trzecim na świecie producentem ***Avena sativa* L. (owies zwyczajny)** i ósmym producentem ***Brassica napus* L. (kapusta rzepak)** (dane FAO). Owies (AACDD, $2n = 6x = 42$) jest alloheksploidem, z genomem o wielkości 11 Gpz, powstałym przez skrzyżowanie diploidalnego *Avena longiglumis* Durieu (AA, $2n = 14$) i tetraploidalnego *Avena insularis* Ladiz. (CCDD, $2n = 4x = 28$). Sekwencja genomu *A. sativa* została opublikowana w 2022 (Kamal i in., 2022). Owies cechuje się stosunkową wysoką tolerancją na niską temperaturę oraz ma małe wymagania glebowe. Ponadto, wykazuje **właściwości fitosanitarne**, ponieważ pozostawia po sobie dobre stanowisko dla innych roślin zbożowych (Noworolnik, 2008). Zboże to jest bezglutenowym cennym źródłem **antyoksydantów (polifenole, flawonoidy), wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, witamin, makro- i mikroelementów oraz błonnika** (Singh, De & Belkheir, 2013). Owies jest również powszechnie wykorzystywany w żywieniu zwierząt. Ze względu na właściwości regenerujące i nawilżające jest wykorzystywany w przemyśle kosmetycznym (Barcchiya, Meena & Lal, 2017). Rzepak (AACC, $2n = 4x = 38$) jest allotetraploidem z genomem wielkości ok. 1 Gpz, powstałym około 7500 lat temu przez naturalne krzyżowanie *Brassica oleracea* L. (kapusta warzywna; CC, $2n = 18$) i *Brassica rapa* L. (kapusta właściwa; AA, $2n = 20$). Genom *B. napus* został zsekwencjonowany po raz pierwszy w 2014 roku (Chalhoub i in., 2014). Początkowo rzepak uprawiano tylko w Europie i stosowano odmiany ozime. Wprowadzenie rzepaku do Chin, Australii i Ameryki Północnej spowodowało powstanie na drodze sztucznej i naturalnej selekcji nowych odmian jarych i przewodkowych przystosowanych do warunków klimatycznych. Sekwencjonowanie genomów należących do różnych uprawianych odmian rzepaku potwierdza istnienie znacznego zróżnicowania genetycznego (Song i in., 2020). **Rzepak jest jedną z najważniejszych roślin oleistych w Polsce i na świecie**. Oprócz oleju rzepak jest również źródłem **śruty poekstrakcyjnej** będącej cennym produktem w żywieniu zwierząt. Roślina ta może być wykorzystywana jako surowiec olejarski i paszowy dzięki wprowadzeniu odmian podwójnie ulepszonych tj. o niskiej zawartości kwasu erukowego oraz glukozynolanów (Bartkowiak-Broda, 2002). Olej rzepakowy jest uważany za jeden z najzdrowszych olejów roślinnych o wysokiej zawartości **fitosteroli i tokoferoli**, stosunkowo niskiej zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych oraz wysokiej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych z grupy **omega-3 i omega-6** (Banaś, Piwowar & Harasym, 2023). Olej rzepakowy poza swoim oczywistym zastosowaniem w przemyśle spożywczym jest również

stosowany w przemyśle chemicznym do produkcji np. farb i lakierów oraz do produkcji biodiesla (Chew, 2020).

Rośliny ze względu na osiadły tryb życia muszą posiadać skuteczne mechanizmy umożliwiające dostosowanie się do ciągle zmieniających się warunków środowiskowych. W toku ewolucji powstała wielowymiarowa sieć umożliwiająca odbiór sygnałów ze środowiska, a następnie dostosowanie wzrostu i rozwoju rośliny do warunków zewnętrznych. Pomimo dekad badań na tych procesach pozyskana wiedza wciąż nie jest wystarczająca do ich pełnego zrozumienia (Zhang i in., 2022). Na podstawie danych literaturowych postawiłam hipotezę, że **pMT są istotnym elementem mechanizmów adaptacji roślin do warunków środowiskowych**. Analiza ich roli w dwóch roślinach uprawnych ważnych w żywieniu człowieka i innych gałęziach gospodarki jest kluczowa w kontekście bezpieczeństwa żywnościowego i zrównoważonego rolnictwa. W momencie rozpoczynania pracy nad MT owsa nie była jeszcze dostępna pełna sekwencja genomu tej rośliny. Sekwencje kodujące MT1-3 owsa (AsMT1-3) zostały sklonowane poprzez przeszukanie bazy EST (ang. *expressed sequence tags*) NCBI wykorzystując dostępne w bazie Gene sekwencje MT pszenicy i jęczmienia. Analiza *in silico* otrzymanych sekwencji na poziomie nukleotydowym i aminokwasowym oraz analiza filogenetyczna przypuszczalnych sekwencji aminokwasowych potwierdziła ich przynależność do roślinnych MT poszczególnych typów (**P3**). Dopiero publikacja genomu owsa w roku 2022 pozwoliła na późniejszą analizę całej rodziny MT u tego zboża, przedstawioną w innej publikacji zespołu (Konieczna i in., 2023a). Obie badane rośliny są poliploidalne i posiadają w genomie znacznie większą liczbę genów *MT* niż rośliny diploidalne. Analizy *in silico* sekwencji promotorowych **17 genów *MT B. napus* (P5)** oraz **21 genów *MT A. sativa* (Konieczna i in., 2023a)** wykazały obecność **licznych elementów regulatorowych związanych z odpowiedzią na różnorodne warunki środowiskowe**. W przypadku genów *BnMT* najczęściej występowały elementy: ARE (indukcja w warunkach aerobowych), MBS (odpowiedź na suszę), STRE (związany z odpowiedzią na różne stresy w tym stres osmotyczny czy niedobór mikroelementów) oraz LTR (odpowiedź na niską temperaturę). W niektórych analizowanych promotorach pojawia się również element regulatorowy związany z odpowiedzią rośliny na atak patogenów (W-box). Podobne elementy znaleziono w sekwencjach promotorowych genów *AsMT*. Co ciekawe, w przypadku rzepaku sekwencje promotorowe różniły się średnią liczbą elementów regulatorowych związanych ze stresem w zależności od typu MT – najwięcej znaleziono w sekwencjach promotorowych *BnMT1* i *BnMT2*, a najmniej w *BnMT4* (**P5**). W przypadku promotorów genów *AsMT1-3* liczba elementów regulatorowych związanych ze stresem jest podobna, natomiast *AsMT4* mają większą średnią liczbę takich elementów (Konieczna i in., 2023a). Nieliczne są doniesienia dotyczące analizy sekwencji promotorowych roślinnych MT. Występowanie licznych i różnorodnych elementów regulatorowych związanych z odpowiedzią na stres w sekwencjach promotorowych genów *MT* pokazano także m. in. u ryżu, rzodkiewnika (Dąbrowska, Mierek-Adamska & Goc, 2012b) czy tytoniu (Yu i in., 2021).

Zasadnym było zatem sprawdzenie roli roślinnych metalotionein w odpowiedzi na stres. Jako reprezentatywne przykłady stresu abiotycznego do badań wybrałam **stres osmotyczny** indukowany w warunkach laboratoryjnych przez mannitol i glikol polietylenowy (**P3**) oraz **stres solny (P5)**. Nadmierne zasolenie gleb uprawnych jest powszechnym światowym problem. FAO szacuje, że około 10% powierzchni Ziemi jest nadmiernie zasolona, a przewiduje się, że do roku 2050 utracie może ulec nawet 50% terenów uprawnych (Ludwiczak i in., 2021). Nadmierne zasolenie prowadzi do nawet 50% strat w uprawach (Zörb, Geilfus & Dietz, 2019). Stres osmotyczny w warunkach naturalnych najczęściej powodowany jest przez nadmierne zasolenie czy suszę. Zmiany klimatyczne powodują zwiększanie się obszarów suchych, w skali świata przez ostatnie 65 lat przybyło prawie 10 mln km² obszarów borykających się z dużym niedoborem wody. Ponadto wzrasta częstotliwość występowania incydentów suszy oraz ich dotkliwość (Sardans i in., 2024). W zależności od gatunku oraz stadium rozwojowego rośliny, susza może powodować nawet 90% straty w uprawach (Dietz, Zörb & Geilfus, 2021). **Generalnie ekspresja metalotionein owsa (AsMT1-3) zmieniała się w odpowiedzi na stres osmotyczny** zarówno w pędach jak i korzeniach siewek, jednakże obserwowano wyraźne różnice zarówno w przypadku sposobu traktowania jak i typu MT (**P3**). Największy wzrost poziomu mRNA zaobserwowano dla AsMT2 po potraktowaniu mannitolem – 4,7-krotny wzrost w pędach i aż 8,9-krotny wzrost w korzeniach. Wyraźny wzrost ekspresji po traktowaniu mannitolem zaobserwowano również dla AsMT3 w pędach i korzeniach oraz AsMT1 w pędach. Co ciekawe, PEG 6000 generalnie nie powodował zmian w ekspresji AsMT1-3, z wyjątkiem 1,5-krotnego wzrostu AsMT2 w pędach. PEG i mannitol są powszechnie stosowane w badaniach nad stresem osmotycznym u roślin, ale badania porównujące sposób ich oddziaływania na rośliny są raczej nieliczne. Niektóre badania wskazują, że mannitol może być cząsteczką sygnałową czy antyoksydantem (Patel & Williamson, 2016). Ze względu na swoje małe rozmiary mannitol może przechodzić przez pory w ścianie komórkowej i powodować plazmolizę. PEG za względu na większe rozmiary cząsteczek raczej powoduje cytoryzę. Działanie PEG ogranicza się zatem do indukcji stresu osmotycznego, podczas gdy mannitol może także oddziaływać na inne fizjologiczne i biochemiczne mechanizmy. Analiza ekspresji AsMT1-3 (**P3**) jest zgodna z wynikami analizy transkryptomu *A. thaliana* po traktowaniu PEG i mannitolem która wykazała, że generalnie PEG powoduje zmianę poziomu ekspresji znacznie mniejszej liczby genów niż mannitol. Traktowanie mannitolem powodowało zmianę ekspresji *AtMT1C*, *AtMT2A* i *AtMT2B*, natomiast PEG nie zmieniał ekspresji tych genów (Gonzalez i in., 2024). Analiza funkcji AsMT1-3 poprzez ich heterologiczną ekspresję w komórkach *E. coli* **nie wykazała wyraźnego promowania wzrostu bakterii ekspresujących MT owsa w pożywkach zawierających PEG i mannitol** w porównaniu do komórek transformowanych pustym wektorem ekspresyjnym (**P3**). Podobna analiza wykonana dla MT4 *Cucumis sativus* L. wykazała, że bakterie ekspresujące badany gen rosną lepiej w stresie osmotycznym niż bakterie kontrolne. Jednakże, w tym doświadczeniu stres osmotyczny indukowano NaCl i sorbitolem, co może być

przyczyną obserwowanych różnic (Zhou i in., 2019). Analiza ekspresji *AsMT1-3* w roślinach owsa poddanych stresowi suszy glebowej wykazała największy wzrost ekspresji *AsMT2* (Konieczna i in., 2023b), który również był najbardziej indukowany przez PEG i mannitol (**P3**).

Analiza ekspresji *BnMT1-4* w pędach siewek rzepaku wykazała, że **ekspresja *BnMT1-3* spada w odpowiedzi na NaCl w sposób zależnych od stężenia**, natomiast ekspresja *BnMT4* **wzrasta**, ale tylko w siewkach traktowanych najwyższym (150 mM) stężeniem NaCl (**P5**). Obserwacja ta sugeruje rolę *BnMT4* w adaptacji do stresu solnego o dużym nasileniu. Przez długi czas dogmatem dotyczącym roślinnych MT typu 4 była ich obecność tylko w nasionach tj. ekspresja wzrasta wyraźnie w czasie dojrzewania nasion, a następnie spada w czasie ich kiełkowania (Kawashima i in., 1992; Schiller i in., 2014; Konieczna i in., 2023a). Za dominującą rolę *pMT4* uważano akumulację cynku w dojrzewających nasionach, który następnie w czasie kiełkowania nasion jest dostarczany do innych białek (Ren i in., 2012). Badania *BnMT4* przedstawione w **P5** oraz inne badania zespołu dotyczące *AsMT4* (Konieczna i in., 2023a, 2024) przeczą temu dogmatowi i pokazują, że **MT4 pełnią także inne funkcje na innych etapach rozwoju rośliny** m.in. są zaangażowane w odpowiedź na stresy środowiskowe. Moje badania roli MT4 sorgo i rzepaku w akumulacji cynku i odróżnianiu pomiędzy cynkiem i kadmem w nasionach zostaną omówione w podrozdziale poniżej.

W celu zrozumienia **współdziałania MT owsa i rzepaku z innymi mechanizmami zaangażowanymi w adaptację roślin do zmieniających się warunków środowiskowych** wykonano analizę korelacji ekspresji *AsMT1-3* (**P3**) oraz *BnMT1-4* (**P5**) z fitohormonami oraz innymi parametrami rozwojowymi i biochemicznymi. Wykonane analizy wykazały wysoką **pozytywną korelację ekspresji *AsMT1-3* z poziomem kwasu abscysynowego (ABA)** w pędach siewek owsa w warunkach stresu osmotycznego. Poziom ABA wzrastał w pędach siewek owsa po potraktowaniu zarówno mannitołem jak i PEG (**P3**). Poziom ABA wzrastał również w siewkach rzepaku po potraktowaniu NaCl. W warunkach stresu solnego **pozytywną korelację zaobserwowano pomiędzy ABA a *BnMT4*, a negatywną pomiędzy ABA a *BnMT1***. Ponadto *BnMT4* **negatywnie korelował z poziomem kwasu indolilo-3-octowego (IAA), a *BnMT1* pozytywnie z kwasem jasmonowym (JA) (P5)**. W literaturze liczne są doniesienia pokazujące zmianę ekspresji genów kodujących *pMT* w odpowiedzi na egzogenne podawane fitohormony, **brakuje natomiast analiz pokazujących interakcję *pMT* z endogennymi fitohormonami w czasie reakcji roślin na stresy środowiskowe**. ABA jest jednym z najważniejszych czynników regulujących odpowiedź roślin na stresy środowiskowe, a jedną z kluczowych funkcji tego fitohormonu jest regulacja odpowiedzi na suszę (Rai i in., 2024). Pozytywna korelacja ekspresji *AsMT1-3* (**P3**) oraz *BnMT4* (**P5**) z ABA wskazuje, że ***pMT* są częścią szlaku odpowiedzi na stres suszy/osmotyczny zależnego od ABA**. Kwas jasmonowy jest zaangażowany w regulację wzrostu roślin oraz odpowiedź na czynniki stresowe. Jednym z procesów, który jest indukowany przez JA jest starzenie się liści (Kumar, Partap & Warghat, 2025). Wśród transkryptów o wysokiej ekspresji w starzejących się liściach rzepaku, a jednocześnie bardzo niskiej ekspresji w liściach zielonych był transkrypt *BnMT1* (Buchanan-

Wollaston, 1994) oraz *BnMT2* (Buchanan-Wollaston & Ainsworth, 1997), chociaż w przypadku tego drugiego genu różnica w poziomie mRNA pomiędzy liśćmi zielonymi a starzejącymi się była znacznie mniejsza. Obserwowana pozytywna korelacja *BnMT1* z JA (**P5**) sugeruje **regulację ekspresji *BnMT1* przez JA**. Podczas starzenia *BnMT1* może być zaangażowany w redystrybucję mikroelementów (zwłaszcza Zn i Cu) do innych organów. Również w czasie działania stresu dochodzi do redystrybucji składników odżywczych, a ich zbalansowany poziom (także mikroelementów) jest niezbędny do ochrony roślin przed każdym rodzajem stresu (Haneklaus, Bloem & Schnug, 2018).

Działanie niekorzystnych warunków środowiskowych na rośliny często jest przyczyną akumulacji RFT, które mogą prowadzić do oksydacyjnych uszkodzeń komórki (Choudhury i in., 2017). Z drugiej strony RFT są cząsteczkami sygnałowymi w mechanizmach adaptacji do różnorodnych warunków środowiskowych oraz w procesach rozwojowych (Mittler i in., 2022). **Budowa chemiczna metalotionein umożliwia im bezpośrednią reakcję z RFT**. Grupy tiolowe MT mogą reagować z RFT, zarówno kiedy występują w formie zredukowanej (-SH), jak i kiedy wiążą jon metalu (-S-Me). W formie wiążącej metal grupy tiolowe są mniej reaktywne niż w formie zredukowanej, a poziom reaktywności zależy od związanego jonu metalu (Krężel & Maret, 2021). Z drugiej strony **MT mogą służyć jako donory jonów Zn^{2+}** (może także Cu^{+}), które są niezbędnym kofaktorem dysmutazy ponadtlenkowej (Zn/Cu-SOD) (Ahmad i in., 2010). W tym aspekcie, zasadne było sprawdzenie czy pMT stanowią element obronny komórek przed stresem oksydacyjnym. **Komórki bakteryjne *E. coli* ekspresujące metalotioneiny rzepaku (*BnMT1-4*) rosły lepiej niż komórki kontrolne transformowane pustym wektorem ekspresyjnym w pożywkach zawierających 0,5 i 5 mM H_2O_2** . W niższym stężeniu H_2O_2 najlepiej rosły komórki bakteryjne ekspresujące *BnMT3*, a w wyższym ekspresujące *BnMT1* i *BnMT4*. Co ciekawe, ekspresja *BnMT1-4* w komórkach *S. cerevisiae* **mutanta *yap-1Δ* nie komplementowała mutacji** i nie zwiększała odporności mutantów drożdżowych na H_2O_2 (**P2**). Mutant *yap-1Δ* ma delecję w genie kodującym czynnik transkrypcyjny YAP-1, który kontroluje m.in. ekspresję genu *ycf-1* (*yeast cadmium factor*), kodującego transporter z rodziny ABC (*ATP-binding cassette family*) odpowiedzialny za transport S-koniugatów glutationu (w tym koniugatów GSH z Cd, Hg, As) do wakuoli. **Ekspresja *BnMT2-4* w komórkach analizowanego mutantu powodowała zwiększenie tolerancji na kadm**. Na pożywkach zawierających kadm w stężeniu 25 μM i 75 μM komórki szczepu kontrolnego BY4741 i mutantu transformowane pustym wektorem pYES2 rosły bardzo słabo, podobnie jak te transformowane wektorem niosącym sekwencje kodującą *BnMT1*. Komórki ekspresujące *BnMT2-4* rosły bardzo dobrze, a pozytywny efekt obserwowany był tylko na podłożu indukcyjnym zawierającym galaktozę (**P2**). Obserwacja ta pokazuje, że przy braku transportera Cd do wakuoli MT rzepaku chelatują jony Cd^{2+} w cytoplazmie i ograniczają ich negatywny wpływ na komórkę. Brak tego ochronnego efektu w przypadku nadtlenu wodoru można wytłumaczyć brakiem reduktazy tioredoksyny Trx2 odpowiedzialnej za redukcję utlenionych grup tiolowych w cysteinach oraz syntetazy

γ -glutamylcysteiny odpowiedzialnej za pierwszy etap syntezy glutationu (oba te geny są pod kontrolą czynnika transkrypcyjnego YAP-1). **Reakcja MT z RFT powoduje utlenienie grup tiolowych, które przy braku Trx2 i GSH nie ulegają redukcji, a tym samym nie mogą ponownie reagować z RFT.** Podobne obserwacje opisano dla mutantów *S. cerevisiae yap-1Δ* i *skn7Δ*, w których eksprymowane były MT jęczmienia (Hegelund i in., 2012).

Wskaźnikiem stresu może być zwiększenie aktywności enzymów antyoksydacyjnych, takich jak SOD, katalaza (CAT) czy peroksydaza (PX) (Ahmad i in., 2010), związków fenolowych (Kruk i in., 2022) czy cukrów rozpuszczalnych (Rosa i in., 2009). Pod wpływem stresu **osmotycznego aktywność katalazy i peroksydazy wzrastała w pędach siewek owsa**, nie zmieniała się natomiast w korzeniach. Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku **SOD**, którego aktywność nie zmieniała się w pędach natomiast **wzrosła w korzeniach**. Ponadto, w pędach siewek owsa **wzrastała zawartości cukrów rozpuszczalnych**, a spadała w korzeniach. **Wzrost zawartości związków fenolowych** obserwowano natomiast tylko w korzeniach (**P3**). Analiza korelacji pomiędzy wymienionymi wyżej parametrami a ekspresją *AsMT1-3* wykazała, że generalnie **AsMT pozytywnie korelują z SOD i CAT, a negatywnie z PX**. W przypadku związków fenolowych i cukrów rozpuszczalnych korelacja zależała od organu rośliny i zasadniczo była słabsza niż w przypadku enzymów antyoksydacyjnych (**P3**). Udział pMT w obronie komórek przed stresem oksydacyjnym jest potwierdzony licznymi publikacjami (np. Zhu i in., 2009; Kumar i in., 2012; Yao i in., 2020), jednakże **związek pomiędzy metalami a metabolizmem redoks i udziałem w tym pMT** pozostaje niejasny. Pasywny w komórkowych reakcjach redoks jon Zn^{2+} , może być w takie reakcje zaangażowany właśnie poprzez metalotioneiny. Reakcja kompleksów MT-Zn z RFT prowadzi do uwolnienia jonów cynku, które następnie mogą być wiązane przez Cu/Zn-SOD lub czynniki transkrypcyjne z domeną palca cynkowego, regulujące ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres. W komórkach zwierzęcych postuluje się również istnienie sygnalizacji cynkowej, w której MT są źródłem jonów Zn^{2+} oraz mogą wyciszać sygnał przez ich ponowne wiązanie (Krężel & Maret, 2021).

Nie mniej ważną rolę roślinnych MT wydaje się być udział w procesach rozwojowych w tym **kluczowym dla wszystkich dalszych etapów rozwoju rośliny kiełkowaniu**. Wcześniejsze badania zespołu wykazały zróżnicowaną ekspresję wszystkich typów MT w kiełkujących nasionach rzepaku (Dąbrowska, Mierek-Adamska & Goc, 2013) oraz owsa (Konieczna i in., 2023a). W literaturze **brakuje natomiast doniesień pokazujących związek MT z elementami regulatorowym tego procesu**. ABA oprócz dobrze znanej roli w adaptacji roślin do warunków stresowych jest też zaangażowany w kiełkowanie nasion. Akumulacja ABA w czasie rozwoju nasion prowadzi do ich dojrzenia i indukcji pierwotnego spoczynku nasion. Przejście od fazy spoczynku do kiełkowania wymaga obniżenia poziomu ABA (Ali i in., 2022). Wykazana pozytywna korelacja pomiędzy *BnMT4* a endogennym poziomem ABA (**P5**) sugeruje, że ekspresja tego genu jest kontrolowana przez ten fitohormon, a **mechanizm regulacji BnMT4 przez ABA może być również istotny w czasie kiełkowania nasion rzepaku**.

W związku z tym, że grupy tiolowe MT mogą reagować z RFT, a RFT, w tym nadtlenek wodoru, są dobrze poznanym czynnikiem odpowiedzialnym za regulację każdego etapu rozwoju i kiełkowania nasion (Bailly, 2023) **sprawdziłam relację BnMT4 z H₂O₂ (P2)**. Kiełkowanie nasion rzepaku w obecności niższych stężeń H₂O₂ skutkowało zwiększeniem siły kiełkowania, jednakże zbyt wysokie stężenie H₂O₂ powodowało jego całkowite zahamowanie. Obecność H₂O₂ wpływała również pozytywnie na wzrost siewek, co przejawiało się zwłaszcza w długości korzeni 6-dniowych siewek rzepaku. Przy wysokim stężeniu H₂O₂ dochodziło do zahamowania wzrostu korzeni, ale jednoczesnej stymulacji wzrostu hypokotyli **(P2)**. Mechanizm promowania kiełkowania nasion przez H₂O₂ pozostaje nie w pełni wyjaśniony. Dane literaturowe wskazują na możliwość degradacji inhibitorów kiełkowania lub obniżania stężenia ABA przez nadtlenek wodoru (Diaz-Vivancos, Barba-Espín & Hernández, 2013). Ciekawe zatem było sprawdzenie ekspresji *BnMT4* w nasionach kiełkujących w nadtlenu wodoru. **Przy najwyższym zastosowanym stężeniu H₂O₂ (10 mM) poziom mRNA *BnMT4* obniżał się po 3 godzinach od rozpoczęcia imbibicji i efekt ten utrzymywał się do 48 godziny**. Nadtlenek wodoru w stężeniu 2 i 5 mM również powodował obniżenie poziomu transkryptu *BnMT4*, zwłaszcza w późniejszych fazach procesu. Co ciekawe, **w 48 godzinie kiełkowania 1 mM H₂O₂ powodował wzrost ilości mRNA** badanego genu **(P2)**. Ta pierwsza wykonana analiza poziomu mRNA *pMT4* w czasie kiełkowania w obecności RFT sugeruje, że przy niskim/umiarkowanym natężeniu stresu oksydacyjnego w czasie tego procesu **BnMT4 działają jako antyoksydanty**.

Mało poznanym aspektem funkcjonowania *pMT* jest ich **rola w interakcjach z mikroorganizmami promującymi wzrost roślin (PGPM)**. Taka możliwość wskazana była przez wcześniejsze doświadczenia pokazujące wzrost ekspresji *MT1* u *Salix viminalis* L. rosnącej w glebie zanieczyszczonej Cd po inokulacji *Bacillus cereus* (Hryniewicz i in., 2012). Z drugiej strony, nie obserwowano zasadniczych zmian ekspresji *BnMT2* w roślinach rzepaku rosnących w glebie zawierającej zarodniki grzybów mikoryzowych *Acaulospora longula*, *Glomus geosporum*, *Glomus mosseae* i *Scutellospora calospora* (Dąbrowska, Hryniewicz & Trejgell, 2012a). Do badania wybrałam bakterię *Serratia plymuthica*, która cechowała się **wysoką tolerancją na stres solny (P5)**. Bakterie z rodzaju *Serratia* spp. są znane ze swoich właściwości do promowania wzrostu roślin, także w warunkach stresowych (Kulkova, Wróbel & Dobrzyński, 2024). Inokulacja nasion rzepaku *S. plymuthica* **promowała kiełkowanie i wzrost siewek rzepaku** w warunkach stresu solnego. **Związek między inokulacją nasion *S. plymuthica* a ekspresją *BnMT1-4* był różny i zależał od typu MT i stężenia NaCl**. Generalnie, w warunkach kontrolnych inokulacja powodowała spadek ekspresji *BnMT1-3*, natomiast w warunkach stresu ekspresja tych genów była na takim samym poziomie w siewkach, które wyrosły z nasion inokulowanych i nieinokulowanych. Inokulacja powodowała bardzo duży wzrost ekspresji *BnMT4* przy wysokim stężeniu NaCl **(P5)**. **Pokazuje to odmienne role BnMT w interakcji roślin z *S. plymuthica* w zależności od warunków środowiskowych**. W innych badaniach zespołu analizowaliśmy wpływ grzyba *Trichoderma viride* na wzrost i plonowanie

owsa w obecności jonów kadmu (Konieczna i in., 2024). Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są znane ze swoich zdolności do stymulacji wzrostu roślin, poprawy jakości gleb oraz biokontroli (Guzmán-Guzmán i in., 2023). Inokulacja *T. viride* nie poprawiała istotnie kiełkowania czy wzrostu siewek owsa, ale obserwowano znaczący wzrost liczby nasion zwłaszcza w glebie o umiarkowanym stężeniu Cd. W tych analizach wykazaliśmy wzrost ekspresji *AsMT1-3* po inokulacji *T. viride*, ale tylko w glebach o najniższym stężeniu Cd, podczas gdy ekspresja *AsMT4* wzrastała po inokulacji w glebach o wyższym stężeniu Cd (Konieczna i in., 2024).

Zasadniczo tematem, który też nie jest poruszany w badaniach roślinnych metalotionein są wzajemne oddziaływania pomiędzy pMT należącymi do różnych typów. Wiąże się to z hipotezą, że poszczególne typy pMT pełnią odmienne funkcje oraz z hipotezą, że funkcja może się zmieniać w zależności od fazy rozwoju/organu. Ciekawe są zatem **obserwacje korelacji ekspresji poszczególnych typów MT w warunkach stresowych**. W stresie solnym obserwowana jest pozytywna korelacja *BnMT3* z *BnMT1* i *BnMT2* (**P5**), a w stresie osmotycznym obserwowana była generalnie pozytywna korelacja pomiędzy *AsMT1-3*. Jedynym wyjątkiem była negatywna korelacja ekspresji *AsMT1* w korzeniach z *AsMT2* i *AsMT3*. Co ciekawe, również ekspresja *AsMT1* w pędach negatywnie korelowała z ekspresją tego genu w korzeniach (**P3**). W glebie zanieczyszczonej Cd, ekspresja *AsMT1-3* korelowała pozytywnie ze sobą, a równocześnie negatywnie z ekspresją *AsMT4* (Konieczna i in., 2024). Obserwacje te prowadzą do wciąż otwartych pytań dotyczących ewolucji metalotionein u roślin tj. czy zróżnicowanie na cztery strukturalnie odmienne typy odzwierciedla zróżnicowanie funkcjonalne. Wyniki zawarte w tym podrozdziale analizujące rolę wszystkich typów MT w danych warunkach u jednego gatunku **potwierdzają tezę o odmiennych funkcjach poszczególnych typów**.

Za najważniejsze osiągnięcia moich badań prezentowanych w powyższym podrozdziale uważam:

1. Wykazanie obecności MT4 również w innych organach roślinnych niż nasiona, co podważa utrwalone od lat przekonanie o funkcjonowaniu tych białek wyłącznie w obrębie struktur generatywnych.
2. Stwierdzenie regulacji poziomu ekspresji *MT4* w odpowiedzi na działanie czynników stresowych w siewkach co wskazuje, iż rola tego typu pMT nie ogranicza się jedynie do procesu akumulacji cynku w nasionach, lecz obejmuje także szersze spektrum funkcji fizjologicznych związanych z adaptacją roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych.
3. Wykazanie udziału MT4 w regulacji poziomu reaktywnych form tlenu w czasie kiełkowania nasion, co wskazuje na znaczący udział tych białek w kontrolowanie prawidłowego przebiegu wczesnych etapów rozwoju rośliny, także poprzez utrzymywanie równowagi oksydacyjnej.

4. Pokazanie udziału MT1-3 w odpowiedzi roślin na różne warunki stresowe, przy czym charakter tej odpowiedzi zależy od rodzaju stresu i co istotne także od typu MT. Wskazuje to zatem na wyspecjalizowane i komplementarne funkcje MT1-3 w mechanizmach adaptacyjnych roślin do warunków środowiskowych.
5. Wykazanie istotnych korelacji pomiędzy roślinnymi metalotioneinami a endogennym poziomem fitohormonów, w szczególności kwasu abscysynowego. Potwierdza to udział tego fitohormonu w regulacji pMT w odpowiedzi roślin na zmieniające się warunki środowiskowe.
6. Stwierdzenie udziału roślinnych metalotionein w molekularnych mechanizmach interakcji z mikroorganizmami promującymi wzrost roślin *Serratia plymuthica* i *Trichoderma viride* także w zanieczyszczonych podłożach.
7. Funkcjonalne potwierdzenie ochronnego działania roślinnych metalotionein przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, uzyskane na drodze heterologicznej ekspresji w komórkach bakteryjnych i drożdżowych.

Udział roślinnych metalotionein typu 4 w selektywnej akumulacji cynku w nasionach jedno- i dwuliściennych roślin uprawnych

P1. Mierek-Adamska A, Dąbrowska GB, Blindauer CA (2018) The type 4 metallothionein from *Brassica napus* seeds folds in a metal-dependent fashion and favours zinc over other metals. *Metallomics* 10: 1430-1443.

P4. Mierek-Adamska A, Kulasek M, Dąbrowska GB, Blindauer CA (2025) Type 4 plant metallothioneins – players in zinc biofortification? *Biological Reviews* 100: 1229-1249.

P6. Mierek-Adamska A, Gutierrez-Marcos J, Blindauer CA (2026) Histidines promote zinc over cadmium binding to the single type 4 metallothionein from Great Millet (*Sorghum bicolor*). *Journal of Inorganic Biochemistry* 278: 113227.

Nadrzędnym celem badań opisanych w tym podrozdziale było **określenie właściwości wiązania metali ciężkich przez metalotioneiny typu 4, określenie roli reszt histydynowych w prawidłowym fałdowaniu pMT4 w zależności od jonu metalu ciężkiego (cynk - kadmi) oraz związku struktury przestrzennej pMT4 z ich funkcjonowaniem**. Celem było również **poszerzenie wiedzy** na temat biofizycznych właściwości roślinnych metalotionein typu 4 oraz kompleksowe zebranie wiedzy na temat tych białek.

Badania w tej części prowadzone były na opisanym w powyższym podrozdziale rzepaku oraz na **sorgo dwubarwnym** (*Sorghum bicolor* Moench.), roślinie diploidalnej ($2n = 20$) o relatywnie małym genomie (0,73 Gpz) zsekwencjonowanym w 2009 roku (Paterson i in., 2009). Sorgo, zboże mało popularne w Europie, jest jednym z podstawowych źródeł pożywienia dla ponad 500 mln ludzi. **Zboże to wyróżnia się bardzo wysoką odpornością na suszę i ciepło**, co czyni je szczególnie ważnym dla suchych i półsuchych regionów świata.

Coraz częstsze, dłuższe i bardziej rozpowszechnione incydenty suszy powodują, że sorgo może w najbliższej przyszłości stać się bardziej popularne na całym świecie. Sorgo jest też ważną rośliną modelową w badaniach molekularnych i anatomicznych podstaw tolerancji na suszę. Zboże to uprawia się również w celu produkcji biopaliw i etanolu oraz jako pożywienie dla zwierząt (Różewicz, 2022; Liaqat i in., 2024). Ponadto jest źródłem cennych składników odżywczych jak kwasy tłuszczowe (kwas oleinowy i linolowy), taniny, polifenole, błonnik i białka (Tanwar i in., 2023). Sorgo należy do zaniedbanych i niedostatecznie wykorzystywanych gatunków roślin uprawnych (ang. ***neglected and underutilised crops - NUCs***), które stanowią 97% wszystkich roślin uprawnych i dostarczają 50% kalorii rolnikom w najbiedniejszych krajach. Rośliny te często są pomijane w badaniach naukowych i badawczo-rozwojowych, a tym samym informacje naukowe i wiedza na ich temat są ograniczone. Z drugiej strony rośliny te posiadają korzystne cechy z punktu widzenia rolnictwa i odżywiania np. wysokie wartości odżywcze czy odporność na niekorzystne warunki środowiskowe. Obecnie na świecie 30 gatunków roślin odpowiada za dostarczenie 95% kalorii. **Dywersyfikacja upraw** jest niezbędna, aby rozwijać zrównoważone rolnictwo niepodatne na zagrożenia wynikające patogenów chorobotwórczych czy niekorzystnych warunków środowiskowych. Zatem badania dotyczące roślin uprawnych należących do NUC są jednym z kluczowych elementów w walce o zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego (Farooq i in., 2023).

Współczesne odmiany roślin uprawnych wybierano ze względu na plonowanie i inne cechy agronomiczne w tym odporność na choroby, natomiast zawartość pierwiastków była pomijana. W związku z tym, generalnie stosowane odmiany zbóż cechują się niską zawartością pierwiastków zwłaszcza mikroelementów takich jak żelazo (Fe) czy cynk (Zn). **Pozyskanie odmian o wysokiej zawartości mikroelementów wymaga poznania białek zaangażowanych w akumulację mikroelementów w jadanych częściach rośliny** oraz określenia ich właściwości wiązania jonów metali. **W swoich badaniach skupiłam się na MT typu 4, które wiążą cynk w nasionach.** Nasiona zapewniają 70% kalorii dla ludzi w postaci pożywienia oraz pokarmu dla zwierząt (Sreenivasulu & Wobus, 2013). **Cynk jest nieodzownym składnikiem wszystkich żywych organizmów**, będący kofaktorem ponad 300 enzymów oraz elementem strukturalnym niezliczonych czynników transkrypcyjnych z domeną palca cynkowego (Marreiro i in., 2017; Cassandri i in., 2017). Rola cynku nie jest zatem ograniczona do jednego/kilku specyficznych procesów, dlatego skutki jego niedoboru są wielowymiarowe. Niedobór cynku u ludzi i zwierząt prowadzi do problemów m.in. z układem immunologicznym, nerwowym i rozrodczym. Niedobór cynku u dzieci prowadzi do zahamowania wzrostu i rozwoju oraz negatywnie wpływa na pamięć i zdolności do uczenia się (Prasad, 2020). Metodą uznawaną obecnie za posiadającą największy potencjał do walki z niedoborem mikroelementów jest **biofortyfikacja – pozyskiwanie odmian roślin o zwiększonej zawartości mikroelementów w jadanych częściach** poprzez hodowlę selektywną lub metody inżynierii genetycznej (Stanton i in., 2022). W tym aspekcie problemem są toksyczne jony metali ciężkich niepełniące

fizjologicznych funkcji jak kadm (Cd), ołów (Pb) czy rtęć (Hg). **Toksycznym naśladowcą cynku jest kadm** – pierwiastek o podobnych właściwościach fizykochemicznych, którego toksyczne działanie na organizmy żywe wynika po części z wypierania cynku z miejsc jego wiązania w enzymach i innych białkach. Kadm występuje w glebach uprawnych, gdyż jest częstym zanieczyszczeniem mineralnych **nawozów fosforanowych** oraz występuje w stosowanych jako nawóz **osadach ściekowych**. Białka zaangażowane w pobieranie Zn (oraz innych mikroelementów) z gleby, transport i sekwestrację generalnie cechują się niską specyficznością np. transportery odpowiedzialne za pobieranie cynku z podłoża z wysoką wydajnością pobierają również Cd. Problem odróżniania pomiędzy cynkiem a kadmem przez białka zaangażowane w wymienione wcześniej procesy jest zatem istotny z punktu widzenia bezpieczeństwa żywnościowego, gdyż celem jest nie tylko otrzymanie roślin o zwiększonej ilości mikroelementów ale również żywności wolnej od substancji niebezpiecznych. W pracy przeglądowej **P4** szczegółowo podsumowałam istniejące dane literaturowe dotyczące drogi cynku i kadmu z gleby do nasion. Na podstawie tego przeglądu można stwierdzić, że mechanizmy odpowiedzialne za pobieranie, transport i akumulację cynku w nasionach oraz innych częściach roślin nie są wystarczająco selektywne, aby zapobiec transportowi kadmu do nasion. **W tym aspekcie istotna wydaje się rola występujących w nasionach metalotionein typu 4 i potencjału tych białek do odróżniania pomiędzy niezbędnym Zn a toksycznym Cd.**

Dane literaturowe dotyczące ekspresji genów kodujących pMT4 są nieliczne, dlatego przeanalizowałam dostępne bazy danych zawierające dane z sekwencjonowania RNA (**P4**). Analiza ta wykazała, że **występowanie transkryptów pMT4 nie jest ograniczone do nasion**, co przez wiele lat było ustalonym dogmatem. Potwierdzają to również moje badania BnMT4 przedstawione w **P5** oraz inne badania zespołu (Konieczna i in., 2023a). Ponadto, wcześniej uważano, że ekspresja pMT4 w czasie kiełkowania nie jest regulowana przez jony metali. Stwierdzenie to było oparte na bardzo wczesnych badaniach ekspresji genu kodującego białko E_c pszenicy, którego ekspresja była regulowana przez ABA (Kawashima i in., 1992). W dojrzewających nasionach (łuszczyzny 12 dni po zapyleniu) *A. thaliana* wykazano niewielką indukcję ekspresji *MT4a* i *MT4b* po potraktowaniu Cd, ale nie innymi metalami (Ren i in., 2012). **Wykazałam po raz pierwszy, że poziom mRNA BnMT4 w czasie kiełkowania jest regulowany przez jony metali.** Ekspresja *BnMT4* wzrastała w 48 godzinie kiełkowania w obecności Cd 4,4-krotnie, a w obecności Zn 2,4-krotnie w porównaniu do kontroli. W nasionach kiełkujących w obecności Cu w 24 godzinie ekspresja *BnMT4* znacząco spadała w porównaniu do kontroli (**P1**). Co ciekawe, w innych badaniach zespołu wykazaliśmy, że ekspresja *AsMT4* wzrasta w pędach i korzeniach siewek owsa traktowanych jednocześnie cynkiem i kadmem, ale nie samym kadmem czy samym cynkiem (Konieczna i in., 2023a). Wskazuje to na rolę w utrzymaniu homeostazy cynku oraz detoksykacji kadmu w czasie kiełkowania i na późniejszych etapach rozwoju rośliny.

Oprócz podziału metalotionein ze względu na ich sekwencję, zwłaszcza liczbę i układ reszt cysteinowych, wprowadzono również ich podział funkcjonalny na Zn- and Cu-tioneiny (Palacios, Atrian & Capdevila, 2011). Określenie przynależności danej MT w tym systemie klasyfikacyjnym wymaga analizy metalacji MT (poprzez spektrometrię mas oraz analizę elementarną) oraz potwierdzenia prawidłowości fałdowania (poprzez spektroskopię dichroizmu kołowego lub magnetycznego rezonansu jądrowego). **Metalotioneiny przyjmują struktury wyższego rzędu tylko w obecności jonów metali, a prawidłowa konformacja przestrzenna jest obserwowana tylko w obecności „właściwego” jonu metalu.** Na podstawie liczby reszt cysteinowych (oraz histydynowych) można określić jaką maksymalną liczbę jonów metali będzie wiązać dana MT, ale na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej nie można określić jaki metal jest tym „właściwym”. Metalotioneiny kręgowców pozostają najlepiej scharakteryzowane pod względem strukturalnym (Vašák & Meloni, 2011; Krężel & Maret, 2021). Jednakże znacznie odbiegają one sekwencją aminokwasową oraz układem reszt cysteinowych od metalotionein roślinnych, które pozostają stosunkowo słabo scharakteryzowane pod względem cech biofizycznych. W publikacji **P4** zebrałam istniejące doniesienia literaturowe dotyczące analizy właściwości wiązania jonów metali ciężkich przez pMT4, które są ograniczone do kilku gatunków. Najlepiej poznane pod względem tych właściwości pozostaje białko E_c z pszenicy. Zebrane dane literaturowe (**P4**) wskazują, że MT4 wiążą maksymalnie 6 jonów Zn²⁺ (lub Cd²⁺) w dwóch domenach: **domenie I** (określanej też jako domena γ), w której jony wiązane są w klastrze **Zn₂Cys₆** oraz **domenie II** (określanej też jako domena β_E), w której jony wiązane są miejsce **ZnHis₂Cys₂** oraz klaster **Zn₃Cys₉**. Uzupełnieniem tego braku wiedzy są moje badania dotyczące właściwości wiązania metali przez BnMT4 z rzepaku (**P1**) oraz SbMT4 z sorgo (**P6**). Porównanie sekwencji aminokwasowych roślinnych MT4 (**P4**) wykazało, że największą różnicą pomiędzy MT4 jedno- i dwuliściennych jest N-końcowy fragment poprzedzający pierwszą domenę bogatą w reszty cysteinowe długości około 10 aminokwasów, obecny tylko w MT4 dwuliściennych. **Białka SbMT4 i BnMT4 mają klasyczną liczbę i układ reszt cysteinowych oraz histydynowych oraz sekwencję typową dla MT4 roślin odpowiednio jedno- i dwuliściennych.** Oba białka wytwarzałam poprzez heterologiczną ekspresję w komórkach *E. coli* w pożywkach z dodatkiem jonów Zn²⁺, Cd²⁺ lub Cu²⁺, a następnie oczyszczałam na drodze chemicznej precypitacji i filtracji żelowej. Tożsamość i czystość białek została potwierdzona przez spektrometrię mas z elektrorozpylaniem (ESI-MS) w pH około 2, w którym następuje dysocjacja związanych jonów metali. Powstające białka odpowiadały przewidywanym na podstawie sekwencji aminokwasowej masom BnMT4 i SbMT4. Stosując ESI-MS w pH około 7-8 oraz optyczną spektroskopię emisyjną ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES) wykazałam, że **BnMT4 oraz SbMT4 są typowymi Zn-tioneinami wiążącymi 6 jonów Zn²⁺ (P1, P6).** W obecności jonów Zn²⁺ w spektrum masowym widoczny jest tylko jeden pik odpowiadający formie Zn₆. Oba białka **wiążą również 6 jonów Cd²⁺**, jednakże w tym przypadku w widmie masowym oprócz formy Cd₆ (która jest dominująca) występuje również forma **Cd₅Zn₁**. Wyniki te **potwierdziłam**

w analizie ICP-OES, która wykazała stosunek Zn do białka 6,2 dla BnMT4 i 6,1 dla SbMT4. W przypadku kompleksów badanych białek z Cd analiza ICP-OES wykazała stosunek Cd do białka, odpowiednio 5,9 dla BnMT4 oraz 4,8 dla SbMT4. W obu przypadkach wyniki ICP-OES potwierdzały występowanie również cynku (Zn/BnMT4 wynosił 0,3 i Zn/SbMT4 wynosił 0,2). Moje wyniki są zgodne z tymi uzyskanymi dla białek: E_c z pszenicy (Leszczyszyn, Schmid & Blindauer, 2007), MT4a i MT4b *A. thaliana* (Leszczyszyn i in., 2013) oraz MT4 *Helianthus annuus* L. (Tomas i in., 2014). Dla obu białek przeprowadziłam również, niewykonywaną wcześniej dla pMT4, **analizę kompleksów z jonami Cu⁺**. MT wiążą jony miedzi w formie jednowartościowej, a redukcja z Cu²⁺ odbywa się wewnątrz komórki i jest zależna od poziomu napowietrzenia hodowli bakteryjnej (Palacios i in., 2011). W widmach masowych obu białek widoczne były liczne piki, jednakże jednoznaczne odróżnienie pomiędzy Zn i Cu w ESI-MS jest niemożliwe ze względu na zbyt podobną masę obu pierwiastków. Analiza ICP-OES wykazała, że w przypadku **BnMT4 większość związanych jonów stanowiły Cu⁺** (w zależności od stopnia napowietrzenia hodowli stosunek Zn/BnMT4 wynosił 0,7 lub 1,4, a Cu/BnMT4 9,7 lub 12,1), a **w przypadku SbMT4 większość jonów stanowiły Zn²⁺** (stosunek Zn/SbMT4 wynosił 5,6 a Cu/SbMT4 0,9) (**P1, P6**). Analiza ta potwierdza, że BnMT4 i SbMT4 to Zn-tioneiny. Mimo wysokiego stopnia homologii pomiędzy pMT4 istnieją **różnice w mechanizmach wiązania jonów metali ciężkich przez te białka z różnych gatunków roślin** (jak uwidacznia analiza kompleksów z jonami Cu⁺), co potwierdza konieczność analiz większej liczby białek.

Wiązanie jonów metali do grup tiolowych cystein jest zgodne z serią Irvinga-Williamsa obrazującą stabilność kompleksów metal- grupa SH: Mn²⁺ < Fe²⁺ < Co²⁺ < Ni²⁺ < Cu²⁺ > Zn²⁺. Co ważne, jony Cd²⁺ są silniej związane przez grupy tiolowe cystein niż jony Zn²⁺. Obrazuje to analiza wartości pH, przy której połowa ze związanych jonów ulega oddysocjowaniu z kompleksu metal-białko - pH(1/2). Analiza wykonana dla kompleksów Zn₆BnMT4 i Cd₆BnMT4 wykazała, że wartości pH(1/2) wynoszą odpowiednio 4,5 i 3,33 (**P1**). Wcześniejsze badania wykazały podobną wartość pH(1/2) dla kompleksów Zn-E_c (Peroza i in., 2009a) oraz Zn-AtMT (Leszczyszyn i in., 2013). W przypadku kompleksów Cd-MT4 taka analiza wykonana została wcześniej tylko dla białka E_c (Peroza i in., 2009a), a uzyskana wartość była niemal identyczna z wartością uzyskaną przeze mnie dla BnMT4. Analizując mechanizm utraty jonów w zależności of pH poprzez ESI-MS można określić mechanizm demetalacji. Jeżeli utrata jednego jonu wpływa na powinowactwo białka do pozostałych jonów to mechanizm jest kooperatywny, a jeżeli utrata każdego z jonów jest niezależna od pozostałych to mechanizm demetalacji jest niekooperatywny. Obserwowany *in vitro* mechanizm demetalacji dostarcza cennych informacji na temat funkcjonowania tych białek *in vivo*. Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że **utrata jonów Zn²⁺ z BnMT4 zachodzi w sposób niekooperatywny**. Podobnych obserwacji dostarczyła analiza reakcji kompleksów Zn-E_c (Leszczyszyn & Blindauer, 2010) oraz Zn-AtMT4a/b (Imam & Blindauer, 2018) z EDTA. Niekooperatywny sposób demetalacji oznacza, że wszystkie kompleksy MT4-metal (bez względu na liczbę jonów metali ciężkich) są tak samo stabilne. Sugeruje to, że kompleksy wiążące mniejszą niż maksymalną możliwą

liczbę jonów metali także są stabilne i mogą pełnić fizjologiczne funkcje jak np. działanie antyoksydacyjne – wolne grupy tiolowe mają możliwość reakcji z RFT. **Potwierdza to postulowany przeze mnie w poprzednim podrozdziale (P2) udział BnMT4 w usuwaniu reaktywnych form tlenu.** Zupełnie inny obraz demetalacji obserwowano w widmach masowych kompleksów Cd-BnMT4. Forma Cd_5BnMT4 była stabilna w szerokim zakresie pH, a następnie dochodziło do nagłej utraty wszystkich jonów Cd^{2+} (P1). Wskazuje, na **kooperatywny mechanizm demetalacji**. W literaturze brakuje innych doniesień dotyczących mechanizmów demetalacji kompleksów Cd-pMT4. Uzyskane wyniki pokazują, że stabilna jest tylko forma zawierająca 5 jonów Cd^{2+} , co z kolei sugeruje rolę pMT4 w detoksyfikacji kadmu tylko przy wysokich stężeniach tego pierwiastka. Przy niskich stężeniach powstające kompleksy BnMT4-Cd o mniejszej niż 5 liczbie jonów Cd^{2+} są niestabilne. Taki wynik może również sugerować, że w obecności Cd pMT4 tracą swoje zdolności antyoksydacyjne.

Obecność histydyn ma znaczący wpływ na właściwości wiązania metali ciężkich przez pMT4. **Obecność His wpływa na powinowactwo MT do jonów metali** co jest związane z regułą Pearsona, która dotyczy twardych i miękkich kwasów i zasad (HSAB) (Pearson, 1963). Cd^{2+} jest miękkim kationem preferującym jako ligandy grupy tiolowe cystein, podczas gdy Zn^{2+} nie ma wyraźnych preferencji w stosunku do ligandów. Histydyny są konserwowane ewolucyjnie w pMT4, natomiast stosunkowo rzadko występują w innych typach roślinnych MT. Ponadto, porównanie licznych sekwencji aminokwasowych pMT4 (P4) wykazało, że jedna z MT4 w *Glycine max* (L.) Merr. (GmMT4b) ma drugą z His podstawioną tyrozyną. Analiza poprzez ESI-MS tej MT wykazała, że białko to wiąże 5-6 jonów Zn^{2+} oraz 6 jonów Cd^{2+} (Pagani i in., 2012). Dalsza analiza, oparta na pośrednim badaniu reaktywności z DEPC, wykazała, że jedna reszta histydynowa w białku GmMT4b nie jest zaangażowana ani w wiązanie Zn^{2+} ani Cd^{2+} (Tomas i in., 2014). W literaturze brakuje natomiast dogłębnych badań roli **histydyn w nadawaniu specyficzności pMT4 w stosunku do Cd i Zn**, dlatego wygenerowałam mutanty białka SbMT4 (P6) z substytucją jednej lub obu histydyn przez tyrozynę (**mutanty H32Y, H40Y, H32Y/H40Y**). Tyrozyna podobnie jak histydyna jest twardym ligandem, jednakże zaangażowana jest głównie w wiązanie jonów metali alkalicznych, rzadziej jonów metali ciężkich z bloku d układu okresowego pierwiastków (baza danych MetalPDB). W obecności jonów Zn^{2+} w widmie masowym wszystkich mutantów obecne są piki odpowiadające kompleksom z 5 i 6 jonami Zn^{2+} . **W przypadku mutantów pojedynczych (H32Y i H40Y) Zn_6 jest główną formą, a dla mutantu podwójnego (H32Y/H40Y) Zn_5 jest formą dominującą.** Potwierdziłam to również w analizie ICP-OES, w której stosunek cynku do białka wynosił odpowiednio 5,24 dla H32Y, 5,74 dla H40Y i 5,03 dla H32Y/H40Y (P6). Podobne wyniki obserwowano wcześniej dla białka E_c z substytucją His przez Ala (Leszczyszyn, White & Blindauer, 2010). Moje wyniki sugerują, że przy braku histydyn w domenie II jony cynku są wiązane w **klaser Zn_3Cys_9** , a klaster Zn_4Cys_{11} jest formowany znacznie rzadziej (P6). W obecności jonów Cd^{2+} w widmie masowym **Cd_6 jest formą dominującą dla wszystkich**

mutantów. Co istotne, obserwowana w widmie masowym białka SbMT4 forma **Cd₅Zn₁** jest **obserwowana tylko w przypadku mutantu H32Y**. Ten pojedynczy jon Zn²⁺ jest wiązany przez miejsce His₂Cys₂ w białku dzikim, które u mutantów pojedynczych zmienia się w miejsce HisTyrCys₂. Sugeruje to, że w domenie II jony Cd²⁺ są wiązane przede wszystkim w **klastrze Cd₄Cys₁₁** w przeciwieństwie do jonów Zn²⁺. Przyczyną tego jest prawdopodobnie większa średnica jonów Cd²⁺ niż jonów Zn²⁺. Tyrozyna mimo zdolności do wiązania jonów metali nie zastępuje funkcji histydy. Ponadto obecność formy Cd₅Zn₁ tylko u mutantu H32Y wskazuje na **kluczową rolę His40 w preferencyjnym wiązaniu cynku przez pMT4**. Obserwacje te potwierdzają wyniki ICP-OES, w których widoczny jest rosnący stosunek Cd do białka oraz Cd do Zn zgodnie z kolejnością H32Y<H40Y<H32Y/H40Y. Wszystkie te obserwacje wyraźnie pokazują, że **substytucja jednej histydy zwiększa powinowactwo SbMT4 do Cd, ale rola His32 i His40 w wiązaniu Cd jest odmienna**. Aby dogłębniej poznać mechanizm specyficzności wiązania cynku i kadmu przez pMT4 zaplanowałam doświadczenie, w którym SbMT4 eksprymowano w bakteriach hodowanych w pożywce z dodatkiem **równomolowych ilości Zn²⁺ i Cd²⁺ (P6)**. Analiza widm masowych wykazała, że w takich warunkach dla białka **SbMT4 dominującą formą jest Cd₄Zn₂, dla mutantu H32Y dominująca jest forma Cd₅Zn₁, a dla dwóch pozostałych mutantów forma Cd₆**. Wyniki te są również poparte analizą ICP-OES tj. zmniejszający się stosunek Zn do białka oraz zwiększający się stosunek Cd do białka zgodnie z kolejnością SbMT4<H32Y<H40Y<H32Y/H40Y. W oparciu o wspomnianą wcześniej kolejność pokazującą względną stabilność kompleksów metal-ligand, kadm jest wiązany znacznie silniej do cystein niż cynk. Zakładając, że oba te pierwiastki występują w komórce w porównywalnym stężeniu MT wiążąca metal tylko za pomocą grup tiolowych cystein powinna wiązać tylko jony Cd²⁺ - co było obserwowane dla mutantu H32Y/H40Y, ale także dla mutantu z jedną histydyną H40Y. **W doświadczeniu tym wykazałam zatem, że obecność histydy utrudnia wiązanie Cd do SbMT4 wymuszając selektywne wiązanie cynku, ale ważniejszą rolę ma His40 (P6)**. Jest to pierwsze tego typu doświadczenie dla pMT4, które pozwala obserwować selektywne wiązanie jonów metali przez białko w kontekście komórkowym.

Wiedza dotycząca trójwymiarowej struktury roślinnych metalotionein jest również ograniczona. Wcześniejsze badania poprzez spektroskopię 1D [¹H] i 2D [¹H, ¹H] NMR białek E_c pszenicy i MT4 *A. thaliana* wykazały, że **kompleksy białko-Zn są sfałdowane, a kompleksy z Cd są sfałdowane tylko częściowo** tj. domena I jest sfałdowana natomiast domena II nie (wyniki zebrane w pracy **P4**). Najpowszechniej występującym w przyrodzie izotopem cynku jest ⁶⁴Zn, który jest spektroskopowo „milczący” więc nie można używać kompleksów Zn-MT do badania połączeń pomiędzy jonami metali a poszczególnymi aminokwasami w spektroskopii NMR. W MT ssaczyczych czy bakteryjnych, wymiana Zn na Cd jest izostrukturalna a więc określenie połączeń metal-aminokwas jest możliwe dla kompleksów Cd-MT stosując spektroskopię ¹¹¹Cd czy ¹¹³Cd NMR, ponieważ struktura kompleksów zawierających Cd odpowiada strukturze kompleksów z Zn. W przypadku pMT4 brak sfałdowania domeny II w obecności jonów Cd²⁺ uniemożliwia eksperymentalne określenie połączeń metal-

aminokwasy, a opublikowana struktura przestrzenna domeny II jest tylko jedną z wielu możliwych konfiguracji (Peroza *i in.*, 2009b). Obserwując stabilność formy **Cd₅BnMT4** w szerokim zakresie pH (**P1**) postawiłam hipotezę, że **forma ta cechuje się również uporządkowaną strukturą przestrzenną**. W celu weryfikacji tej hipotezy wykonałam analizę 1D [¹H] NMR kompleksów Cd-BnMT4 w roztworach o różnym pH. W zakresie pH od 7,1 do 5,6 nie obserwowano znaczących zmian pomiędzy widmami NMR. Poniżej pH 5,1 dochodzi do zmniejszenia intensywności pików pochodzących z domeny I, a obraz widma NMR przy pH 3,0 odpowiada widmu białka niesfałdowanego. Z tej analizy wynika, że mimo stabilności w szerokim zakresie pH, **forma Cd₅BnMT4 nie cechują się uporządkowaną strukturą przestrzenną**, a więc nie można jej wykorzystać do ustalania połączeń metal-aminokwas. Analiza 2D [¹H, ¹H] NMR wykazała, że podobnie do opisanych wcześniej białek kompleksy **Zn-BnMT4 są sfałdowane prawidłowo. Kompleksy Cd-BnM4 są sfałdowane tylko częściowo**, obserwowane sygnały pochodzą z domeny I, brak jest natomiast sygnałów z domeny II (**P1**). Analiza kompleksów Zn-SbMT4 (**P6**) poprzez analizę 1D [¹H] i 2D [¹H, ¹H] NMR wykazała, że jest to białko prawidłowo sfałdowane podobnie jak BnMT4. **Niespodziewana była natomiast obserwacja, że kompleks Cd-SbMT4 jest również prawidłowo sfałdowany**. Sygnały pochodzące z domeny II były słabsze niż w przypadku kompleksów tego białka z Zn, ale wyraźne. W widmie tym wyraźne były również sygnały pochodzące od obu reszt histydynowych, które są częścią domeny II. W oparciu o analizę ESI-MS oraz ICP-OES stwierdziłam, że sygnały obserwowane w widmie NMR pochodzące z domeny II pochodziły nie z kompleksów Cd₆-SbMT4, ale z Cd₅Zn₁-SbMT4, które występowały w próbce w znacznych ilościach. **Ta obserwowana po raz pierwszy dla pMT4 sfałdowana struktura formy zawierającej jony Cd²⁺ otwiera drogę do eksperymentalnego ustalenia struktury domeny II**. Następnie, aby odpowiedzieć na pytanie jak substytucja histydyn na tyrozyny wpływa na fałdowanie białka wykonałam analizy 1D [¹H] i 2D [¹H, ¹H] NMR mutantów H32Y, H40Y oraz H32Y/H40Y w kompleksach z Zn²⁺ i Cd²⁺ (**P6**). **Dla żadnego z mutantów nie obserwowano sygnałów świadczących o poprawnym sfałdowaniu domeny II, bez względu na rodzaj jonu metalu**. Obserwowany pojedynczy pik Cd₆ w widmie masowym dla mutantu H32Y/H40Y nie jest równoznaczny z poprawnym fałdowaniem białka. W białku E_c z substytucją histydyny przez alaninę, domena II również była niesfałdowana (Leszczyszyn *i in.*, 2010). Tyrozyna, w przeciwieństwie do alaniny, może być ligandem jonów metali w białkach, jednakże w przypadku pMT4 wyraźnie nie pełniła tej roli. W mutantach w **domenie II najprawdopodobniej powstaje korzystniejszy termodynamicznie klaster Zn₄/Cd₄Cys₁₁ lub Zn₃/Cd₃Cys₉**, a w mutantach H32Y i H40Y pozostałe histydyny nie są zaangażowane w wiązanie jonów metali (**P6**).

Wykazane zdolności do wiązania jonów metali ciężkich przez pMT4 *in vitro*, doprowadziły mnie do pytania czy zdolność pMT4 do wiązania jonów będzie powodowała wzrost tolerancji na metale obecne w podłożu? Aby odpowiedzieć na to pytanie wykonałam analizę wzrostu bakterii ekspresujących *BnMT4* w obecności jonów Zn²⁺, Cu²⁺ i Cd²⁺ oraz

porównałam do bakterii, które transformowałam wektorem ekspresyjnym bez wstawki (P1). **Analiza ta wykazała wzrost tolerancji bakterii tylko w przypadku jonów Zn^{2+} .** Dla jonów Cd^{2+} nie obserwowano różnic we wzroście pomiędzy bakteriami ekspresyjnymi *BnMT4*, a bakteriami kontrolnymi. W przypadku jonów Cu^{2+} bakterie ekspresyjające *BnMT4* rosły gorzej niż bakterie kontrolne. Taki rezultat sugeruje, że kompleksy *BnMT4* z Cu^+ , a także prawdopodobnie z Cd^{2+} , ze względu na nieprawidłowe fałdowanie są bardziej podatne na degradację, a jony metali zostają uwolnione. Z drugiej strony słabszy wzrost bakterii ekspresyjających *BnMT4* może być spowodowany nadmiernym wiązaniem jonów Cu^+ , przez co białka zależne od tego pierwiastka nie mogą prawidłowo funkcjonować. Zasadne jest również pytanie o związek pomiędzy obecnością/brakiem histydyn w pMT4 a akumulacją cynku i kadmu. Transgeniczne rośliny *A. thaliana* z nadekspresją *SbMT4* nie akumulują w pędach więcej cynku i kadmu w porównaniu do roślin typu dzikiego (P6). Nie zaobserwowałam również różnic w akumulacji cynku i kadmu pomiędzy roślinami ekspresyjnymi dziką formę *SbMT4* a białkami z substytucją histydyny przez tyrozynę (H32Y, H40Y, H32Y/H40Y). Głównym mechanizmem ograniczania toksyczności kadmu jest jego akumulacja w wakuolach (Hu i in., 2025), a więc różnice w działaniu pomiędzy białkiem *SbMT4* i mutantami pozbawionymi histydyn nie są widoczne na poziomie całego organizmu, ale mogą być widoczne na poziomie komórkowym. Moja hipoteza zakłada, że substytucja histydyn/y w *SbMT4* będzie powodowała większą akumulację Cd w cytoplazmie, ponieważ brak histydyn w pMT4 spowoduje wiązanie większej ilości jonów Cd przez to białko. Obecność histydyn w pMT4 ograniczy wiązanie Cd przez to białko, a tym samym więcej tego jonu zostanie przetransportowane do wakuoli. Oprócz różnic w lokalizacji subkomórkowej jonów Cd i Zn spodziewać się również można różnic w chemicznej specjacji tj. naturze chemicznej ligandów wiążących jony.

Roślinne metalotioneiny typu 4 są z pewnością białkami zaangażowanymi w selektywną akumulację cynku w czasie dojrzewania nasion zarówno u rośliny jedno- i dwuliściennych. Jednakże, zebrane w P4 dane literaturowe oraz wykonana analiza sekwencji promotorowych wskazują wyraźnie, że pMT4 pełni również inne fizjologiczne funkcje poza akumulacją cynku w nasionach. W analizowanych sekwencjach regulatorowych genów pMT4 liczne są elementy odpowiedzi na fitohormony, z czego element odpowiedzi na ABA (ABRE) występował we wszystkich analizowanych promotorach. Innym elementem, który był obecny we wszystkich analizowanych promotorach jest element odpowiedzi na światło G-box. Ponadto we wszystkich przeanalizowanych promotorach występowały elementy takie jak MYC (odpowiedź na suszę, ABA i zimno) czy MYB (odpowiedź na suszę i ABA), często występowały elementy jak STRE (odpowiedź na stres osmotyczny, niskie pH czy niedobór składników odżywczych) oraz ARE (odpowiedź na warunki beztlenowe). Moje wyniki (P5) oraz zebrane z dostępnych danych transkryptomicznych (P4) pokazujące obecność transkryptów pMT4 poza nasionami również potwierdzają, że akumulacja cynku w nasionach nie jest jedyną rolą tej grupy białek.

Do najważniejszych osiągnięć moich badań prezentowanych w tym podrozdziale zaliczam:

1. Wykazanie, że białka SbMT4 oraz BnMT4 to klasyczne Zn-tioneiny. Ponadto, po raz pierwszy udokumentowanie międzygatunkowego zróżnicowania mechanizmu wiązania jonów miedzi przez białka pMT4, co prowadzi do nowych pytań badawczych dotyczące ich potencjalnej roli w utrzymaniu homeostazy także jonów miedzi w komórkach roślinnych.
2. Stwierdzenie niekooperatywnego mechanizmu demetalacji kompleksów Zn-BnMT4, a kooperatywnego w przypadku Cd-BnMT4. Zaobserwowane różnice wskazują na stabilność kompleksów z jonami cynku, kiedy liczba jonów jest mniejsza niż maksymalna i niestabilność analogicznych kompleksów z jonami kadmu. Wskazuje to zatem, że właściwości antyoksydacyjne pMT4 zależą od jonu metalu związanego z białkiem.
3. Wykazanie, że reszty histydynowe białek SbMT4 oraz BnMT4 istotnie obniżają ich powinowactwo do jonów kadmu, co zostało potwierdzone zarówno w warunkach badań *in vitro*, jak i w kontekście komórkowym. Dowodzi to potencjału tych białek w selektywnym akumulowaniu niezbędnego cynku, a jednocześnie ograniczaniu magazynowania toksycznego kadmu w tkankach roślinnych.
4. Udokumentowanie, że kompleks SbMT4–Cd₅Zn₁ przyjmuje prawidłowo sfałdowaną konformację, w której jon cynku jest koordynowany przez miejsce Cys₂His₂. Odkrycie to otwiera możliwość przeprowadzenia, po raz pierwszy, analizy oddziaływań aminokwas–metal w domenie II białek pMT4, co w konsekwencji umożliwi uzyskanie pełnej struktury przestrzennej tych białek wyłącznie na podstawie danych eksperymentalnych.
5. Stwierdzenie, że substytucja reszt histydynowych przez tyrozynowe w pMT4 skutecznie zaburza prawidłowe fałdowanie białka w obecności zarówno jonów cynku, jak i jonów kadmu. Mutacja His-Tyr prowadzi tym samym do utraty charakteru Zn-tioneiny, a ponadto promuje wiązanie jonów kadmu przez pMT4.
6. Wykazanie, że ekspresja roślinnych metalotionein typu 4 w trakcie kiełkowania nasion podlega regulacji przez jony cynku i kadmu, ale nie przez jony miedzi. Obserwacja ta sugeruje, iż białka te pełnią nie tylko funkcję związaną z akumulacją cynku w nasionach, lecz również uczestniczą w detoksykacji kadmu podczas kiełkowania — kluczowego etapu rozwoju roślin.
7. Kompleksowe scharakteryzowanie roślinnych metalotionein typu 4, po raz pierwszy integrujące badania prowadzone na poziomie organizmu roślinnego z analizą biofizycznych właściwości tych białek. Ponadto, sformułowanie nowych hipotez dotyczących potencjalnych funkcji pMT4, wykraczających poza ich rolę w akumulacji cynku w nasionach.

Podsumowanie

Roślinne metalotioneiny to białka zdolne do wiązania jonów metali ciężkich oraz do usuwania reaktywnych form tlenu. Ta druga funkcja nabiera szczególnego znaczenia, gdy MT zachowują stabilność także w formach zawierających liczbę jonów metali mniejszą niż maksymalna, co umożliwia wolnym grupom tiolowym bezpośrednio reagowanie z RFT. Ponieważ jony metali i RFT uczestniczą w niezwykle szerokim spektrum procesów komórkowych, to również roślinne MT są zaangażowane w liczne szlaki metaboliczne, wywierając pleiotropowy wpływ na funkcjonowanie roślin.

Za najważniejsze wnioski płynące z przedstawionych powyżej badań uważam: (i) istotny udział metalotionein roślin uprawnych w mechanizmach adaptacji do warunków stresowych, (ii) funkcjonalne zróżnicowanie poszczególnych typów pMT, (iii) udział pMT w systemach antyoksydacyjnych, przy czym właściwości antyoksydacyjne są determinowane przez rodzaju związanego jonu metalu, oraz (iv) kluczowe znaczenie reszt histydynowych w pMT4 dla selektywnego wiązania jonów cynku.

Ogólnie rzecz ujmując, uzyskane wyniki wskazują na istotny potencjał roślinnych metalotionein w kontekście bezpieczeństwa żywnościowego, zarówno jako białek uczestniczących w adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych, jak i jako elementów procesów biofortyfikacji roślin w kluczowe mikroelementy zwłaszcza cynk. Uważam, że moje badania w sposób istotny poszerzają aktualną wiedzę na temat roślinnych metalotionein. Uzyskane wyniki nie tylko pogłębiają zrozumienie ich biologicznych funkcji, ale także prowadzą do nowych istotnych pytań badawczych.

Literatura:

- AHMAD, P., JALEEL, C.A., SALEM, M.A., NABI, G. & SHARMA, S. (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit Rev Biotechnol* 30, 161–175.
- ALI, F., QANMBER, G., LI, F. & WANG, Z. (2022) Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. *J Adv Res* 35, 199–214.
- BAILLY, C. (2023) ROS in seed germination. In *Oxidative Stress Response in Plants* (eds R. MITTLER & F. VAN BREUSEGEM), pp. 177–204.
- BANAŚ, K., PIWOWAR, A. & HARASYM, J. (2023) The potential of rapeseed (canola) oil nutritional benefits wide spreading via oleogelation. *Food Biosci* 56, 103162.
- BARCCHIYA, J., MEENA, R.K. & LAL, N. (2017) Oat is a multifunctional cereal crop. *Innovative Farming* 2, 114–116.
- BARTKOWIAK-BRODA, I. (2002) Możliwości poszerzania zmienności genetycznej u *Brassica napus* L. *Rośliny Oleiste* 23, 61–71.
- BINZ, P.-A. & KÄGI, J.H.R. (1999) Metallothionein: Molecular evolution and classification. In *Metallothionein IV* (ed C. KLAASSEN), pp. 7–13. Birkhauser Verlag, Basel.
- BLINDAUER, C.A. (2011) Bacterial metallothioneins: Past, present, and questions for the future. *J Biol Inorg Chem* 16, 1011–1024.
- BOUTTE, C.C. & CROSSON, S. (2013) Bacterial lifestyle shapes the regulation of stringent response activation. *Trends Microbiol* 21, 174–180.
- BUCHANAN-WOLLASTON, V. (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol* 105, 839–846.
- BUCHANAN-WOLLASTON, V. & AINSWORTH, C. (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol Biol* 33, 821–834.
- CAPDEVILA, M., BOFILL, R., PALACIOS, O. & ATRIÁN, S. (2012) State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century. *Coord Chem Rev* 256, 46–62.
- CASSANDRI, M., SMIRNOV, A., NOVELLI, F., PITOLLI, C., AGOSTINI, M., MALEWICZ, M., MELINO, G. & RASCHELLÀ, G. (2017) Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery* 3, 17071.
- CHALHOUB, B., DENOEUDE, F., LIU, S., PARKIN, I.A.P., TANG, H., WANG, X., CHIQUET, J., BELCRAM, H., TONG, C., SAMANS, B., CORRÉA, M., DA SILVA, C., JUST, J., FALENTIN, C., KOH, C.S., ET AL. (2014) Early allopolyploid evolution in the post-neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345, 950–953.

- CHEN, Y., HE, Y., PAN, Y., WEN, Y., ZHU, L., GAO, J., CHEN, W. & JIANG, D. (2024) Involvement of the metallothionein gene OsMT2b in drought and cadmium ions stress in rice. *Rice* 17, 63.
- CHEW, S.C. (2020) Cold-pressed rapeseed (*Brassica napus*) oil: Chemistry and functionality. *Food Res Internat* 131, 108997.
- CHOUDHURY, F.K., RIVERO, R.M., BLUMWALD, E. & MITTLER, R. (2017) Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant J* 90, 856–867.
- CICATIELLO, P., DARDANO, P., PIROZZI, M., GRAVAGNUOLO, A.M., DE STEFANO, L. & GIARDINA, P. (2017) Self-assembly of two hydrophobins from marine fungi affected by interaction with surfaces. *Biotechnol Bioengineer* 114, 2173–2186.
- COLE, M.B., AUGUSTIN, M.A., ROBERTSON, M.J. & MANNERS, J.M. (2018) The science of food security. *Science of Food* 2, 14.
- COMMITTEE ON WORLD FOOD SECURITY (CFS) (2013) Global Strategic Framework for Food Security & Nutrition (GSF).
- DĄBROWSKA, G. & GŁOWACKA, B. (2004) Aquaporins - new entry into plants water movement. *Adv Biochem* 50, 383–387.
- DĄBROWSKA, G., HRYNKIEWICZ, K. & TREJGELL, A. (2012a) Do arbuscular mycorrhizal fungi affect metallothionein MT2 expression in *Brassica napus* L. roots? *ABC Series Botanica* 54, 34–39.
- DĄBROWSKA, G., MIEREK-ADAMSKA, A. & GOC, A. (2012b) Plant metallothioneins: Putative functions identified by promoter analysis in silico. *ABC Series Botanica* 54, 109–120.
- DĄBROWSKA, G., MIEREK-ADAMSKA, A. & GOC, A. (2013) Characterisation of *Brassica napus* L. metallothionein genes (*BnMTs*) expression in organs and during seed germination. *Aust J Crop Sci* 7, 1324–1332.
- DIAZ-VIVANCOS, P., BARBA-ESPÍN, G. & HERNÁNDEZ, J.A. (2013) Elucidating hormonal/ROS networks during seed germination: Insights and perspectives. *Plant Cell Rep* 32, 1491–1502.
- DIETZ, K. -J., ZÖRB, C. & GEILFUS, C. -M. (2021) Drought and crop yield. *Plant Biol* 23, 881–893.
- DOWD, P.F., NAUMANN, T.A. & JOHNSON, E.T. (2023) Potential role of a maize metallothionein gene in pest resistance. *Plant Gene* 34, 100409.
- DURFEE, T., HANSEN, A.M., ZHI, H., BLATTNER, F.R. & DING, J.J. (2008) Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190, 1084–1096.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP & WHO (2024) The State of Food Security and Nutrition in the World 2024. Rome.
- FAROOQ, M., REHMAN, A., LI, X. & SIDDIQUE, K.H.M. (2023) Neglected and underutilized crops and global food security. *Neglected and Underutilized Crops: Future Smart Food*, 3–19.
- FENG, M., YU, Q., CHEN, Y., FU, Z., XU, L. & GUO, J. (2022) ScMT10, a metallothionein-like gene from sugarcane, enhances freezing tolerance in *Nicotiana tabacum* transgenic plants. *Environ Experimental Bot* 194, 104750.
- GODLEWSKA, K., RONGA, D. & MICHALAK, I. (2021) Plant extracts - importance in sustainable agriculture. *Ital J Agron* 16, 1851.
- GONZALEZ, S., SWIFT, J., YAARAN, A., XU, J., MILLER, C., ILOUZ-ELIAZ, N., NERY, J.R., BUSCH, W., ZAIT, Y. & ECKER, J.R. (2024) Arabidopsis transcriptome responses to low water potential using high-throughput plate assays. *eLife* 12.
- GUO, W.J., MEETAM, M. & GOLDSBROUGH, P.B. (2008) Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiol* 146, 1697–1706.
- GUZMÁN-GUZMÁN, P., KUMAR, A., DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S., PARRA-COTA, F.I., OROZCO-MOSQUEDA, MA. DEL C., FADIJI, A.E., HYDER, S., BABALOLA, O.O. & SANTOYO, G. (2023) *Trichoderma* species: our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—a review. *Plants* 12, 432.
- HANEKLAUS, S., BLOEM, E. & SCHNUG, E. (2018) Hungry plants—a short treatise on how to feed crops under stress. *Agriculture* 8, 43.
- HEGELUND, J.N., SCHILLER, M., KICHEY, T., HANSEN, T.H., PEDAS, P., HUSTED, S. & SCHJOERRING, J.K. (2012) Barley metallothioneins: MT3 and MT4 are localized in the grain aleurone layer and show differential zinc binding. *Plant Physiol* 159, 1125–1137.
- HONOKI, R., ONO, S., OIKAWA, A., SAITO, K. & MASUDA, S. (2018) Significance of accumulation of the alarmone (p)ppGpp in chloroplasts for controlling photosynthesis and metabolite balance during nitrogen starvation in *Arabidopsis*. *Photosynth Res* 135, 299–308.
- HORNEBER, M., VAN ACKEREN, G., LINDE, K. & ROSTOCK, M. (2008) Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database Syst Rev* 2020, CD003297.
- HRYNKIEWICZ, K., BAUM, C. & LEINWEBER, P. (2010) Density, metabolic activity, and identity of cultivable rhizosphere bacteria on *Salix viminalis* in disturbed arable and landfill soils. *J Plant Nut Soil Sci* 173, 747–756.
- HRYNKIEWICZ, K., DĄBROWSKA, G., BAUM, C., NIEDOJADŁO, K. & LEINWEBER, P. (2012) Interactive and single effects of ectomycorrhiza formation and *Bacillus cereus* on metallothionein MT1 expression and phytoextraction of Cd and Zn by willows. *Wat Air Soil Poll* 223, 957–968.
- HRYNKIEWICZ, K., ZŁOCH, M., KOWALKOWSKI, T., BAUM, C., NIEDOJADŁO, K. & BUSZEWSKI, B. (2015) Strain-specific bioaccumulation and intracellular distribution of Cd²⁺ in bacteria isolated from the rhizosphere, ectomycorrhizae, and fruitbodies of ectomycorrhizal fungi. *Environ Sci Poll Res* 22, 3055–3067.
- HU, Y., HE, R., MU, X., ZHOU, Y., LI, X., WANG, H., XING, W. & LIU, D. (2025) Cadmium toxicity in plants: from transport to tolerance mechanisms. *Plant Signal Behav* 20, 2544316.
- IMAM, H.T. & BLINDAUER, C.A. (2018) Differential reactivity of closely related zinc(II)-binding metallothioneins from the plant *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Inorg Chem* 23, 137–154.
- INGRAM, J. (2020) Nutrition security is more than food security. *Nature Food* 1, 2–2.
- KAMAL, N., TSARDAKAS RENHULDT, N., BENTZER, J., GUNDLACH, H., HABERER, G., JUHÁSZ, A., LUX, T., BOSE, U., TYE-DIN, J.A., LANG, D., VAN GESSEL, N., RESKI, R., FU, Y.-B., SPÉGEL, P., CEPLITIS, A., ET AL. (2022) The mosaic oat genome gives insights into a uniquely healthy cereal crop. *Nature* 606, 113–119.
- KAWASHIMA, I., KENNEDY, T.D., CHINO, M. & LANE, B.G. (1992) Wheat Ec metallothionein genes: Like mammalian Zn²⁺ metallothionein genes, wheat Zn²⁺ metallothionein genes are conspicuously expressed during embryogenesis. *Europ J Biochem* 209, 971–976.

- PEARSON, R.G. (1963) Hard and soft acids and bases. *J Am Chem Soc* 85, 3533–3539.
- PELZER, F., LOEF, M., MARTIN, D.D. & BAUMGARTNER, S. (2022) Cancer-related fatigue in patients treated with mistletoe extracts: a systematic review and meta-analysis. *Support Care in Cancer* 30, 6405–6418.
- PEROZA, E.A., KAABI, A. AL, MEYER-KLAUCKE, W., WELLENREUTHER, G. & FREISINGER, E. (2009a) The two distinctive metal ion binding domains of the wheat metallothionein Ec-1. *J Inorg Biochem* 103, 342–353.
- PEROZA, E.A., SCHMUCKI, R., GÜNTERT, P., FREISINGER, E. & ZERBE, O. (2009b) The β E-domain of wheat Ec-1 metallothionein: A metal-binding domain with a distinctive structure. *J Mol Biol* 387, 207–218.
- PIETRZAK, W. & NOWAK, R. (2021) Impact of harvest conditions and host tree species on chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Viscum album* L. *Molecules* 26, 3741.
- PRASAD, A.S. (2020) Lessons learned from experimental human model of zinc deficiency. *J Immunol Res* 2020, 9207279.
- RAI, G.K., KHANDAY, D.M., CHOUDHARY, S.M., KUMAR, P., KUMARI, S., MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C., MARTÍNEZ-MELGAREJO, P.A., RAI, P.K. & PÉREZ-ALFOCEA, F. (2024) Unlocking nature's stress buster: Absciscic acid's crucial role in defending plants against abiotic stress. *Plant Stress* 11, 100359.
- REN, Y., LIU, Y., CHEN, H., LI, G., ZHANG, X. & ZHAO, J. (2012) Type 4 metallothionein genes are involved in regulating Zn ion accumulation in late embryo and in controlling early seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* 35, 770–789.
- ROCHA, I., MA, Y., SOUZA-ALONSO, P., VOSÁTKA, M., FREITAS, H. & OLIVEIRA, R.S. (2019) Seed coating: a tool for delivering beneficial microbes to agricultural crops. *Frontiers Plant Sci* 10, 1357.
- RONO, J.K., LE WANG, L., WU, X.C., CAO, H.W., ZHAO, Y.N., KHAN, I.U. & YANG, Z.M. (2021) Identification of a new function of metallothionein-like gene OsMT1e for cadmium detoxification and potential phytoremediation. *Chemosphere* 265, 129136.
- ROSA, M., PRADO, C., PODAZZA, G., INTERDONATO, R., GONZÁLEZ, J.A., HILAL, M. & PRADO, F.E. (2009) Soluble sugars - metabolism, sensing and abiotic stress. *Plant Signal Behav* 4, 388–393.
- RÓŻEWICZ, M. (2022) Possibility of sorghum cultivation in Poland and utilisation strategies for sorghum grains and green matter. *Pol J Agron* 48, 11–20.
- SARDANS, J., MIRALLES, A., TARIQ, A., ZENG, F., WANG, R. & PEÑUELAS, J. (2024) Growing aridity poses threats to global land surface. *Comm Earth Environ* 5, 776.
- SCHILLER, M., HEGELUND, J.N., PEDAS, P., KICHEY, T., LAURSEN, K.H., HUSTED, S. & SCHJOERRING, J.K. (2014) Barley metallothioneins differ in ontogenetic pattern and response to metals. *Plant Cell Environ* 37, 353–367.
- SCHOLTMEIJER, K., WESSELS, J.G.H. & WÖSTEN, H.A.B. (2001) Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 1–8.
- SINGH, R., DE, S. & BELKHEIR, A. (2013) *Avena sativa* (oat), a potential nutraceutical and therapeutic agent: an overview. *Critical Rev Food Sci Nut* 53, 126–144.
- SINGH, R.K., ANANDHAN, S., SINGH, S., PATADE, V.Y., AHMED, Z. & PANDE, V. (2011) Metallothionein-like gene from *Cicer microphyllum* is regulated by multiple abiotic stresses. *Protoplasma* 248, 839–847.
- SONG, J.-M., GUAN, Z., HU, J., GUO, C., YANG, Z., WANG, S., LIU, D., WANG, B., LU, S., ZHOU, R., XIE, W.-Z., CHENG, Y., ZHANG, Y., LIU, K., YANG, Q.-Y., ET AL. (2020) Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of *Brassica napus*. *Nature Plants* 6, 34–45.
- SREENIVASULU, N. & WOBUS, U. (2013) Seed-development programs: a systems biology-based comparison between dicots and monocots. *Annu Rev Plant Biol* 64, 189–217.
- STANTON, C., SANDERS, D., KRÄMER, U. & PODAR, D. (2022) Zinc in plants: Integrating homeostasis and biofortification. *Mol Plant* 15, 65–85.
- TANWAR, R., PANGHAL, A., CHAUDHARY, G., KUMARI, A. & CHHIKARA, N. (2023) Nutritional, phytochemical and functional potential of sorghum: A review. *Food Chem Adv* 3, 100501.
- TOMAS, M., PAGANI, M.A., ANDREO, C.S., CAPEDEVILA, M., BOFILL, R. & ATRIAN, S. (2014) His-containing plant metallothioneins: Comparative study of divalent metal-ion binding by plant MT3 and MT4 isoforms. *J Biol Inorg Chem* 19, 1149–1164.
- VAŠÁK, M. & MELONI, G. (2011) Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *J Biol Inorg Chem* 16, 1067–1078.
- WU, Y., LI, J., YANG, H. & SHIN, H.-J. (2017) Fungal and mushroom hydrophobins: a review. *J Mushroom* 15, 1–7.
- WUEST, S.E., PETER, R. & NIKLAUS, P.A. (2021) Ecological and evolutionary approaches to improving crop variety mixtures. *Nature Ecol Evol* 5, 1068–1077.
- XUE, T., LI, X., ZHU, W., WU, C., YANG, G. & ZHENG, C. (2009) Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *J Exp Bot* 60, 339–349.
- YAN, K., ABLIMIT, M., LIU, S., LIU, Z. & WANG, Y. (2023) A novel metallothionein gene *HcMT* from halophyte shrub *Halostachys caspica* respond to cadmium and sodium stress. *Plant Physiol Biochem* 201, 107763.
- YAO, Y., WANG, M., ZHANG, P., WANG, X., HUANG, X., LIU, W., WANG, Z. & YANG, R. (2020) Different responses in metallothionein gene expression and antioxidative enzyme activity lead to more ROS accumulation in rice exposed to TI(III) than to TI(I). *Chemosphere* 259, 127258.
- YILMAZ, H. & YILMAZ, A. (2025) Hidden hunger in the age of abundance: the nutritional pitfalls of modern staple crops. *Food Sci Nut* 13, e4610.
- YOLCU, S., ALAVILLI, H. & LEE, B. (2020) Natural genetic resources from diverse plants to improve abiotic stress tolerance in plants. *IJMS* 21, 8567.
- YU, Q., HE, L., HUO, C., JIANG, X., CHEN, H., WANG, R., TANG, M., DONG, L., CHEN, J., LI, Y., ZHU, S. & LIU, W. (2021) Genome-wide identification and expression analysis of heavy metal stress-responsive metallothionein family genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biology Rep* 39, 443–454.
- ZHANG, H., ZHU, J., GONG, Z. & ZHU, J.-K. (2022) Abiotic stress responses in plants. *Nature Rev Gen* 23, 104–119.
- ZHOU, Y., LIU, J., LIU, S., JIANG, L. & HU, L. (2019) Identification of the metallothionein gene family from cucumber and functional characterization of CsMT4 in *Escherichia coli* under salinity and osmotic stress. *3 Biotech* 9, 394.

- ZHU, W., ZHAO, D.X., MIAO, Q., XUE, T.T., LI, X.Z. & ZHENG, C.C. (2009) *Arabidopsis thaliana* metallothionein, AtMT2a, mediates ROS balance during oxidative stress. *J Plant Biol* 52, 585–592.
- ZILLER, A. & FRAISSINET-TACHET, L. (2018) Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein. *Metallomics* 10, 1549–1559.
- ZÖRB, C., GEILFUS, C. -M. & DIETZ, K. -J. (2019) Salinity and crop yield. *Plant Biol* 21, 31–38.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

W roku 2014 uzyskałam finansowanie na staż podoktorski w ramach projektu **"Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych"** współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki. Stypendium to umożliwiło mi wyjazd na roczny (1.10.2014 – 30.09.2015) staż podoktorski na **Wydział Chemii Uniwersytetu Warwick w Coventry, Wielka Brytania**. Celem wyjazdu była realizacja opracowanego przeze mnie projektu pt. „Analiza mechanizmów wiązania metali ciężkich przez metalotioneiny *Brassica napus*” w grupie **prof. Claudii A. Blindauer**. Celem tego wyjazdu było połączenie moich badań prowadzonych w ramach projektu doktorskiego dotyczących metalotionein *B. napus* z badaniami biofizycznych i biochemicznych właściwości białek MT rzepaku. Wyjazd pozwolił mi na poznanie technik, które umożliwiają takie właśnie badania: **spektrometrię mas z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI-MS), spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektroskopię UV-Vis**. Ponadto, poznałam techniki umożliwiające produkcję w komórkach bakteryjnych oraz oczyszczanie (poprzez **chromatografię FPLC**) rekombinowanych metalotionein oraz analizę elementarną poprzez **spektrometrię mas sprzężoną z indukcyjnie wzbudzaną plazmą (ICP-MS) oraz optyczną spektroskopię emisyjną sprzężoną z indukcyjnie wzbudzaną plazmą (ICP-OES)**. Odbycie rocznego stażu w grupie prof. Blindauer umożliwiło mi poznanie unikalnego podejścia do oczyszczania metalotionein – bez stosowania dodatkowych znaczników/etykiet oraz zapoznanie się z metodami analizy właściwości wiązania jonów metali przez białka, w których prof. Blindauer jest światowym autorytetem (szczególnie analiza białek przez NMR). W trakcie tego wyjazdu przeprowadziłam badania, których efektem była publikacja wchodząca w skład cyklu publikacji opisywanego osiągnięcia (**P1**) oraz wystąpienie ustne na międzynarodowej konferencji.

Mierek-Adamska A, Dąbrowska GB, Blindauer CA. The role of seed-specific type 4 metallothionein in *Brassica napus* seeds. Dalton 2018 Meeting Royal Society of Chemistry, 3-5 kwietnia 2018, Coventry, UK, Książka Abstraktów: 116.

W trakcie tego stażu uczestniczyłam również w projektach realizowanych przez innych członków zespołu prof. Blindauer. **Sklonowałam mRNA MT z niezsekwencjonowanego genomu ryby *Clarias gariepinus* (twada, sum afrykański)**, która została następnie

zdeponowana w banku genów NCBI pod numerem KU999947 (CgMT). Analiza *in silico* uzyskanej sekwencji ujawniła istnienie otwartej ramki odczytu kodującej przypuszczalnie białko o długości 60 aminokwasów z 20 resztami cysteiny rozmieszczonymi równomiernie w całym łańcuchu aminokwasowym, co jest typowe dla metalotionein kręgowców. Analiza poziomów transkryptów metalotioneiny w wątrobach osobników pozyskanych z różnych odcinków rzeki Kafue na terenie Zambii wykonana metodą real-time PCR wykazała zależność poziomu mRNA *MT* od stopnia zanieczyszczenia wody i osadów dennych metalami ciężkimi. Sekwencję kodującą *MT* *C. gariepinus* wklonowałam w bakteryjny wektor ekspresyjny, opracowałam metodę pozyskania stabilnych kompleksów metal-białko, które zostały przeanalizowane z wykorzystaniem ICP-OES oraz ESI-MS. Rekombinowane białko wiązało 7 jonów cynku lub 7 jonów kadmu. Analiza widm masowych wykazała, że białko to ma wyraźny charakter Zn-tioneiny, ponieważ kompleks Zn_7CgMT występował jako dominująca forma. W przypadku kadmu Cd_7CgMT był główną występującą formą, jednakże znaczne ilości kompleksów Cd_6- , Cd_6Zn- czy nawet $Cd_7Zn-CgMT$ były także obserwowane w widmie masowym. Współpraca ta zaowocowała publikacją w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

M'kandawire E, Mierek-Adamska A, Stürzenbaum SR, Choongo K, Yabe J, Mwase M, Saasa N, Blindauer CA (2017) Metallothionein from wild populations of the African catfish *Clarias gariepinus*: from sequence, protein expression and metal binding properties to transcriptional biomarker of metal pollution. International Journal of Molecular Sciences 18: E1548.

W trakcie pobytu na stypendium przygotowałam wniosek do Komisji Europejskiej o Stypendium Indywidualnej Marii Skłodowskiej-Curie (MSCA-IF) złożony we wrześniu 2015 roku (mentor - prof. Claudia Blindauer, instytucja goszcząca - Uniwersytet Warwick). Wniosek zatytułowany „Plant metallothioneins as potential players in food security” dotyczył roli roślinnych metalotionein w wiązaniu mikroelementów i toksycznych metali ciężkich i ich potencjalnego zastosowania w biofortyfikacji oraz roli roślinnych metalotionein na stres. Projekt łączył badania *in planta* z analizami biochemicznymi i biofizycznymi metalotionein *Sorghum bicolor* (sorgo dwubarwne). **Realizację stypendium MSCA-IF (akronim i numer projektu PMTFOS – 701492), rozpoczęłam 1.08.2017.** Część wyników z realizacji tego projektu dotyczących metalotioneiny typu 4 sorgo zostało zawartych w publikacji **P6** będącej częścią cyklu publikacji opisywanego osiągnięcia.

W genomie sorgo jest 5 genów kodujących metalotioneiny (dane z banku genów NCBI) – po jednym genie kodującym *MT* każdego typu (*SbMT1-4*) oraz 1 gen kodujący *MT* z nietypową liczbą 17 cystein w 2 domenach, o najwyższym stopniu homologii do *MT2* (nazwany *SbMT2C*). Geny te ulegają ekspresji co potwierdziłam w reakcji RT-PCR. Otwarte ramki odczytu wklonowałam w wektor ekspresyjny pET21(+) w taki sposób, aby rekombinowane białka pozbawione były dodatkowych znaczników. Białka eksprymowałam w komórkach *E. coli* w pożywkach z dodatkiem cynku, kadmu lub miedzi.

Metoda opracowana wcześniej do oczyszczania pMT typu 4 (poprzez chemiczne wytrącanie mieszaniną etanol:chloroform – publikacje **P1** i **P6** z cyklu publikacji opisywanego osiągnięcia) nie przyniosła oczekiwanych rezultatów dla SbMT1-3, a inne istniejące w literaturze protokoły do oczyszczania pMT1-3 są oparte o wykorzystanie znaczników. **Opracowałam więc protokół umożliwiający powtarzalne i efektywne oczyszczanie tych metalotionein z lizatu komórkowego oparte o chromatografię anionowymienną i filtrację żelową, bez konieczności stosowania dodatkowych znaczników.** Mimo licznych prób i modyfikacji metody nie udało mi się oczyścić kompleksów białka SbMT2C z żadnym z testowanych metali. Metalotioneiny, zwłaszcza kiedy nie są poprawnie sfałdowane, są wrażliwe na utlenienie. W przypadku SbMT2C nietypowa liczba cystein może powodować nieprawidłowe fałdowanie białka bez względu na jon metalu, a tym samym jest prawdopodobne, że białko ulega degradacji w czasie oczyszczania. Wydajność i specyficzność opracowanej metodologii potwierdziłam analizami uzyskanych białek poprzez ICP-OES i spektrometrię mas. **Analiza ta wykazała, że białko SbMT1 jest Cu-tioneiną**, na co wskazuje formowanie się pojedynczej formy $\text{Cu}_8\text{SbMT1}$ potwierdzone w ESI-MS. W spektrum masowym widać również formy zawierające od 4 do 7 jonów Cu^+ , jednakże ich obecność może być spowodowana częściowym utlenieniem się kompleksów metal-białko w czasie izolacji i oczyszczania. Białko to wiąże również od 1 do 4 jonów Zn^{2+} . Co ciekawe, nie udało mi się wyizolować tego białka w formie kompleksów z jonami Cd^{2+} . **Białka SbMT2 i SbMT3 nie wiążą jonów miedzi, natomiast najlepiej sfałdowane są w obecności jonów Cd^{2+}** - białko SbMT2 wiąże 5 jonów Cd^{2+} a białko SbMT3 - 3 jony Cd^{2+} . W przypadku obu białek obecne są również formy zawierające jony Cd^{2+} i jeden jon Zn^{2+} , jednakże ilość takich kompleksów jest niewielka. W przypadku cynku powstaje kilka form zawierających od 2 do 5 jonów w przypadku SbMT2 i od 1 do 3 w przypadku SbMT3. Wyniki te sugerują, że oba białka mają pośredni charakter i nie są typowo ani Zn- ani Cu-tioneiną. Wyniki analizy charakteru SbMT1-3 zostały przedstawione na międzynarodowym spotkaniu grupy będącej częścią akcji COST Zinc-Net (TD1304).

Mierek-Adamska A, Blindauer CA. Metal specificities of the metallothioneins from the drought-resistant crop *Sorghum bicolor*. 14th Zinc UK Meeting, 18 stycznia 2019, Cambridge, UK, Książka Abstraktów: 14.

Wiedza na temat właściwości biofizycznych/biochemicznych metalotionein roślinnych opiera się na analizie białek produkowanych w komórkach bakteryjnych. Jak dotąd, jedyną pMT wyizolowaną z tkanek roślinnych w ilościach pozwalających na dalszą charakterystykę pozostaje białko E_c z pszenicy. **W trakcie stypendium podjęłam zatem próbę opracowania protokołu analizy specjacji chemicznej cynku w nasionach sorgo, a następnie izolacji SbMT4 z nasion.** Białka z dojrzałych nasion sorgo izolowałam stosując bufor Tris/sacharoza/DTT lub HEPES/sacharoza/DTT. Następnie uzyskany lizat rozdzielałam na frakcje stosując filtrację żelową. W trakcie rozdzielania monitorowano absorbancję 200 nm i 280 nm, a w uzyskanych frakcjach analizowano zawartości cynku i siarki poprzez ICP-OES. Cynk wpływał z kolumny

między 70 a 80 ml w postaci pojedynczego wyraźnego pik, natomiast siarka pojawiała się wcześniej około 40 ml, ale frakcje o najwyższym stężeniu były obserwowane również około 70-80 ml. Ponadto, właśnie we frakcjach pomiędzy 70-80 ml obserwowano niską absorbcję 280 nm, co jest charakterystyczną cechą MT (brak aminokwasów aromatycznych). **Wyływ cynku z kolumny w czasie, kiedy spodziewane są małe białka oraz analiza absorbcji sugerują, że duża część cynku w nasionach sorgo jest związana z małymi białkami zawierającymi tiol, prawdopodobnie także z SbMT4.** W celu izolacji SbMT4 z nasion, do lizatu uzyskanego jak powyżej stosowałam opisaną wcześniej metodę chemicznego wytrącania (etanol:chloroform), a uzyskany osad oczyszczałam poprzez filtrację żelową. Wszystkie frakcje ponownie sprawdziłam pod kątem zawartości siarki i cynku, te o najwyższych stężeniach obu pierwiastków zagęszczałam i analizowałam poprzez spektrometrię mas. W pH 2 obserwowałam pik odpowiadający masie SbMT4 bez jonów metali, natomiast w pH 7 obserwowałam **pik odpowiadający masie SbMT4 z 6 jonami Zn/Cu.** Analiza ICP-OES tej formy wykazała, że związanym metalem jest przede wszystkim cynk, jednakże obecna jest również miedź w stosunku około 5 dla Zn do białka i 1,5 dla Cu do białka. Pozostaje niewyjaśnione, czy takie mieszane formy występują *in vivo* w nasionach czy miedź jest zanieczyszczeniem pochodzącym z buforów/materiałów użytych w czasie izolacji i oczyszczania.

Ważnym elementem projektu były również badania dotyczące **udziału MT w reakcji na stres oksydacyjny u roślin.** W celu monitorowania w czasie reakcji z nadtlenku wodoru z kompleksami Zn-SbMT4 i Cd-SbMT4 stosowałam spektrometrię mas. Kompleksy białek zawierające 6 jonów Zn^{2+} lub 6 jonów Cd^{2+} inkubowałam z H_2O_2 w stężeniu równomolowym w stosunku do tioli. Reakcję sprawdzano po 10, 20, 30, 60, 120 minutach, a następnie po 24 godzinach. W obu przypadkach obserwowano uwolnienie jonów metali z SbMT4, jednakże reakcja była szybsza dla cynku niż dla kadmu. W przypadku kompleksów Zn-SbMT4 po 10 minutach pojawiały się formy zawierające od 1 do 6 jonów Zn, jednakże forma zawierająca 6 jonów Zn^{2+} pozostawała nadal dominująca. Po 20 minutach reakcji obecne były wszystkie formy (od 0 do 6 jonów Zn^{2+}), a forma z 4 jonami Zn^{2+} była dominująca. Podobnie po 30 minutach, tylko dominowała forma z 2 jonami Zn^{2+} . Po 60 minutach główną formą był kompleks pozbawiony jonów metali, a na podstawie analizy masy można stwierdzić, że grupy tiolowe występowały w formie utlenionej (mostki disiarczkowe). W reakcji kompleksów Cd-SbMT4 obserwowałam podobny przebieg, jednakże znacznie wolniejszy tj. po 120 minutach obecne były wszystkie formy od 0 do 6 jonów Cd^{2+} , a obecność tylko formy całkowicie pozbawionej jonów metali stwierdziłam dopiero po 24 godzinach. Część uzyskanych wyników przedstawiłam w formie plakatu na międzynarodowej konferencji.

Mierek-Adamska A, Blindauer CA. Hydrogen peroxide-mediated release of zinc from type 4 *Sorghum bicolor* metallothionein. 12th Conference of the Polish Society of Experimental Plant Biology, 9-12 wrzesień 2025, Warszawa, Książka Abstraktów: 166.

Reakcjom MT roślinnych z ROS dotyczyły także inne projekty, w realizacji których uczestniczyłam w trakcie stypendium. Pod moją opieką swoje prace magisterskie przygotowywali Hormoz Parsapour (2018) i Mia Foran (2019), którzy badali **reakcje białek MT4a i MT4b z *A. thaliana* z nadtlenkiem wodoru i glutationem (GHS)/utlenionym glutationem (GSSG) stosując spektroskopię UV-Vis oraz spektrometrię mas.** Celem tych badań było określenie potencjalnej roli H_2O_2 i GSH/GSSG w uwalnianiu cynku z MT. Wcześniejsze badania sugerowały rolę AtMT4b jako transportera cynku, a AtMT4a jako właściwego magazynu tych jonów. Nasze badania na poziomie białek potwierdzają tę hipotezę, ponieważ Zn jest uwalniany szybciej z AtMT4a niż AtMT4b. Na podstawie tych badań oraz wcześniejszych badań prowadzonych przez byłego doktoranta prof. Blindauer, dr Hasana Tanvira Imama, przygotowywana jest obecnie wspólna publikacja do czasopisma o zasięgu międzynarodowym.

Stypendium IF-MSCA umożliwiło mi nawiązanie współpracy z prof. Jose Gutierrez-Marcos (Wydział Przyrodniczy, Uniwersytet Warwick), która umożliwiła mi wygenerowanie transgenicznych linii *A. thaliana* z nadekspresją SbMT4 (**P6**) oraz **zastosowanie technologii edycji genomu CRISPR/Cas9 w badaniach nad roślinnymi metalotioneinami.** W trakcie stypendium stosując CRISPR/Cas9 wytworzyłam mutanty *A. thaliana* z delecją w genie *MT4a* oraz *MT4b*, a także skrzyżowałam te mutanty aby otrzymać roślinę pozbawioną MT typu 4 (mutant podwójny *AtMT4a/MT4b*). Badania tych mutantów są obecnie kontynuowane w ramach projektu doktorskiego mgr Marcela Antoszewskiego i mgr Magdaleny Michalak (badania te zostały opisane poniżej).

Kontynuując współpracę z prof. Blindauer w dniach **17.01.-2.02.2023** odbyłam **wizytę badawczą** na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warwick wraz z ówczesną doktorantką dr Wiktorią Konieczną, której byłam promotorem pomocniczym. Celem wizyty była analiza **właściwości wiązania metali ciężkich przez MT4 owsa.** Analiza poprzez ICP-OES oraz ESI-MS potwierdziła, że również to białko jest Zn-tioneiną wiążącą 6 jonów Zn^{2+} . Białko to wiąże również 6 jonów Cd^{2+} , jednakże w przeciwieństwie do innych pMT4 nie obserwowano formy Cd_5Zn_1 , a stosunek Cd/AsMT4 były wyższy niż ten obserwowany dla BnMT4 i SbMT4. Wstępne wyniki pokazały również inny niż dotychczas opisywany mechanizm reakcji AsMT4 z EDTA, jednakże doświadczenie to wymaga wykonania kolejnych powtórzeń.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

Osiągnięcia dydaktyczne

Prowadzone zajęcia dydaktyczne:

- **Biologia molekularna** – wykład i ćwiczenia dla studentów kierunku Biotechnologia

- **Environmental impacts of genetically modified organisms** - wykład dla studentów kierunku Global Change Biology
- **Genetics and evolution** - wykład i ćwiczenia dla studentów kierunku Global Change Biology oraz studentów zagranicznych przyjeżdżających w ramach Erasmus+
- **Genetyka** - ćwiczenia dla studentów kierunku Biologia i kierunku Geografia
- **Genetyka molekularna** - wykład i ćwiczenia dla studentów kierunku Biotechnologia
- **Genetyczne metody stosowane w laboratoriach kryminalistycznych** - wykład i ćwiczenia dla studentów kierunku Biologia sądowa
- **Metody badania funkcji genu** - ćwiczenia dla studentów kierunku Biologia
- **Metody stosowane w biologii molekularnej** – ćwiczenia dla studentów kierunku Biologia
- **Mutageny, mutacje, choroby** - ćwiczenia dla studentów kierunku Biologia
- **Podstawowe metody inżynierii genetycznej** - ćwiczenia dla studentów kierunku Biologia
- **Techniki biologii molekularnej** - wykład i ćwiczenia dla studentów kierunku Biotechnologia
- **Wstęp do genetyki** - ćwiczenia dla studentów kierunku Biotechnologia

Koordynowane przedmioty:

- Biologia molekularna
- Environmental impacts of genetically modified organisms
- Genetics and evolution
- Genetyczne metody stosowane w laboratoriach kryminalistycznych
- Genetyka
- Podstawowe metody inżynierii genetycznej
- Techniki biologii molekularnej
- Moduł do wyboru na kierunku Biologia Inżynieria genetyczna

Projekty edukacyjne:

- Współprowadzenie zajęć „Metody badania funkcji genów” dla studentów Biotechnologii w ramach projektu „Wzbogacenie oferty edukacyjnej na studiach stacjonarnych II stopnia kierunku biotechnologia” - projekt realizowany przez Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UMK w Toruniu w ramach Priorytetu IV POKL 2007-2013, Poddziałanie 4.1.2.
- Współprowadzenie zajęć „Metody badania ekspresji genów *in vitro*” dla studentów Biotechnologii w ramach projektu „Wzbogacenie oferty edukacyjnej na studiach stacjonarnych I stopnia kierunku biotechnologia – nowa perspektywa” – projekt realizowany przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UMK w Toruniu w ramach Priorytetu IV POKL 2007-2013, Poddziałanie 4.1.2.
- Współprowadzenie warsztatów „Wykorzystanie chromatografii GC/MS do diagnostyki metabolitów” dla studentów Diagnostyki molekularnej w ramach projektu Universitas Copernicana Thoruniensis In Futuro – modernizacja Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w ramach Zintegrowanego Programu Uczelni (projekt nr POWR.03.05.00-00-Z302/17-00) realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.

- Opieka nad studentami kierunku Diagnostyka molekularna przygotowującymi zespołowy projekt badawczy pt. „Molekularna analiza genomów i transkryptów organizmów prokariotycznych i eukariotycznych” w ramach projektu Universitas Copernicana Thoruniensis In Futuro – modernizacja Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w ramach Zintegrowanego Programu Uczelni (projekt nr POWR.03.05.00-00-Z302/17-00) realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój.

Opieka naukowa nad studentami:

- Byłam promotorem 2 prac magisterskich na kierunku Diagnostyka molekularna (2021 oraz 2024). Tematyka tych prac była ściśle związana z prowadzonymi przeze mnie badaniami dotyczącymi roślinnych metalotionein.
- Obecnie jestem promotorem 1 pracy magisterskiej na kierunku Biotechnologia oraz 1 pracy licencjackiej na kierunku Biologia sądowa.
- Sprawowałam opiekę naukową nad studentami przygotowującymi prace licencjackie (3) i magisterskie (8) na kierunku Biologia, Biotechnologia oraz Diagnostyka molekularna realizowane w Katedrze Genetyki UMK w Toruniu.
- Sprawowałam opiekę na studentami (2) przygotowującymi prace magisterskie realizowane w grupie prof. Claudii A. Blindauer na Wydziale Chemii, Uniwersytet Warwick.
- Sprawowałam opiekę nad doktorantem Habtamu Chekol Fantahun z Uniwersytetu Addis Ababa Uniwersytetu w Etiopii w ramach programu Erasmus+ (2021 oraz 2023).
- Sprawowałam opiekę nad studentami ze Studenckiego Koła Naukowego Biotechnologii „Biotechnologia Thoruniensis” przygotowującymi projekt pt. „Lifescience dla licealistów” – warsztaty z biologii molekularnej z elementami genetyki dla uczniów szkół średnich (marzec 2014).
- Jestem promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich (mgr Marcel Antoszewski i mgr Magdalena Michalak) oraz byłam promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej dr Seny Turkan (2023) i dr Wiktorii Koniecznej (2025).

Działalność popularyzatorska

Przygotowanie i poprowadzenie zajęć dla uczniów:

- Wykład dla uczniów szkół średnich „Fitoremediacja metali ciężkich” w ramach zajęć organizowanych przez Pracownię Dydaktyki WBiNoZ oraz Oddział Toruński Polskiego Towarzystwa Botanicznego (marzec 2009).
- Zajęcia laboratoryjne dla uczniów szkół podstawowych, średnich oraz dorosłych w ramach Toruńskiego Festiwalu Nauki i Sztuki pt. „Moje DNA” „DNA jest jak odcisk palca”, „Tajemnice zapisane w DNA”, „Zabawa z genetyką” (corocznie w latach 2011-2016).
- Zajęcia laboratoryjne dla uczniów szkół podstawowych „Wyizoluj własne DNA” (w roku akademickim 2011/12, 2012/13 oraz 2013/14) oraz „Czy pieluchy mogą być przydatne dla roślin? (w roku akademickim 2023/24) w ramach Uniwersytetu Dziecięcego organizowanego przez Fundację Amicus UMK.
- Zajęcia laboratoryjne dla uczniów szkół średnich pt. „Tajemnice zapisane w DNA” w ramach Promocji Edukacyjnej WBiOŚ (obecnie WNBiW) UMK oraz pt. „Techniki

biologii molekularnej” w ramach Dnia Otwartego WBiOŚ (obecnie WNBiW) UMK (2015-2016).

- Zajęcia laboratoryjne dla uczniów szkół podstawowych pt. „W świecie mutantów” w ramach Nocy Biologów 2016 (styczeń 2016) oraz pt. „Bakterie, bierzcie się do dzieła!” w ramach Nocy Biologów 2020 (styczeń 2020).
- Zajęcia laboratoryjne dla uczniów szkół średnich na Wydziale Chemii, Uniwersytet Warwick (marzec 2018).
- Zajęcia laboratoryjne dla uczniów szkół podstawowych pt. „Zrozumieć genetykę – podstawy genetyki dla każdego” w ramach projektu Projekt pt. „Biologia bez barier” (POWR.03.01.00-00-T061/18) realizowany przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska (obecnie Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych) UMK w Toruniu w ramach konkursu nr POWR.03.01.00-IP.08-00-3MU/18 pt. „Trzecia Misja Uczelni” (wrzesień 2019).
- Wykład dla uczniów szkół średnich pt. „Czy grozi nam ukryty głód?” w ramach Nocy Biologów 2020 (styczeń 2020).
- Wykład pt. „Edycja genomów podstawą nowoczesnego rolnictwa” wygłoszony w czasie VII edycji Szkolnego Forum Badaczy zorganizowanego w Uniwersyteckim Liceum Ogólnokształcącym w Toruniu (wrzesień 2023).
- Przygotowanie uczniów Uniwersyteckiego Liceum Ogólnokształcącego w Toruniu do Olimpiady Biologicznej (marzec – czerwiec 2024).
- Zajęcia laboratoryjne dla uczniów szkół podstawowych pt. „Owocowe DNA” w ramach Fascynującego Dnia Roślin 2024 (maj 2024).
- Zajęcia dla uczniów szkół ponadpodstawowych „Biologia molekularna w wersji light” i „Genetyka bez tajemnic” w ramach Dnia Otwartego WNBiW UMK (październik 2025).

Udział w konferencjach/targach/impresach masowych:

- Wystąpienie pt. „Biofortyfikacja – narzędzie do walki z niedoborem mikroelementów” w czasie seminarium „Mniej chemii na hektar, więcej wiedzy na hektar” zorganizowanego przez Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko-Pomorskiego (19.11.2021).
- Wystąpienie pt. „Edycja genomów metodą CRISPR/Cas9, czyli rewolucja w rolnictwie?” w czasie seminarium „Postęp biologiczny w produkcji roślinnej” zorganizowanego przez Katedrę Genetyki WNBiW UMK w Toruniu i Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko-Pomorskiego (25.11.2022).
- Wystąpienie pt. „Gleba źródłem zdrowia i chorób roślin” w ramach seminarium z okazji obchodów Międzynarodowego Dnia Zdrowia Roślin zorganizowanego przez Katedrę Genetyki WNBiW UMK w Toruniu, Centralne Laboratorium Państwowej Inspekcji Ochrony Roślin i Nasiennictwa oraz Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko-Pomorskiego (11.05.2023).
- Stoisko wystawiennicze dla rozwiązania „Ochrona biootoczka nasion rzepaku” w czasie XVI Międzynarodowych Targów Wynalazków i Innowacji Intarg w Katowicach (24-25.05.2023).
- Stoisko promujące Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu w czasie Kujawsko-Pomorskich Dni Pola 2023 w Minikowie (1-2.07.2023).

- Wystąpienie pt. „Jak otrzymać stypendium podoktorskie MSCA (Marie Skłodowska-Curie Actions): okiem stypendysty i okiem eksperta” w czasie IV edycji konferencji „Drogi rozwoju naukowego” Wydziału Lekarskiego CM UMK w Toruniu (23.03.2024).
- Stoisko promujące innowacyjne rozwiązania opracowane w Katedrze Genetyki Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu w czasie drzwi otwartych „Dzień na UMK” w strefie innowacji i sukcesów (6.04.2024).
- Wystąpienie pt. „Metalotioneiny narzędziem walki o bezpieczeństwo żywnościowe” w czasie seminarium „Postęp biologiczny w produkcji roślinnej – utopia czy niezbędna potrzeba” zorganizowanego przez Katedrę Genetyki WNBiW UMK w Toruniu i Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko-Pomorskiego (28.11.2024).

Artykuły prasowe/wystąpienia w mediach:

- Artykuł pt. „Sorgo w czasie suszy: białka strzegące przed usychaniem” w serwisie internetowym Nauka w Polsce (04.03.2016).
- Występ w Radio Sfera UMK dotyczący badań nad roślinnymi metalotioneinami (marzec 2016).
- Artykuł pt. „Biofortyfikacja upraw cynkiem dla większego bezpieczeństwa żywnościowego” w serwisie internetowym CORDIS (13.12.2019).
- Udział w spotkaniu „Szybkie Randki Naukowo-Dziennikarskie” organizowanym przez Stowarzyszenie Rzecznicy Nauki i UMK (16.11. 2022).
- Występ w programie TVP Bydgoszcz „Eko-opcja” – w odcinku z dnia 3.12.2022 wypowiedź dotycząca zastosowania metod edycji genomu w produkcji roślinnej oraz w odcinku z dnia 25.03.2023 wypowiedź dotycząca zastosowania mikroorganizmów w rolnictwie.

Działalność organizacyjna

- Udział jako ekspert i sprawozdawca w ewaluacji wniosków o stypendium indywidualne Marii Skłodowskiej-Curie w ramach programu UE Horyzont 2020 i Horyzont Europa (od 2020).
- Członek Podkomisji ds. efektów uczenia się na kierunku Diagnostyka molekularna Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych (2024-2028).
- Członek Wydziałowego Zespołu ds. współpracy z podmiotami zewnętrznymi (2023).
- Członek komitetu organizacyjnego 5 Międzynarodowej Konferencji Plant productivity and food safety: microbiology, soil science, food quality and agricultural genetics, Toruń, 23-24.06.2025.
- Członek komitetu organizacyjnego oraz współprzewodniczący sesji „Plant metabolism and signalling” 4 Międzynarodowej Konferencji Plant productivity and food safety: microbiology, soil science, food quality and agricultural genetics, Toruń, 26-27.09.2024.
- Współorganizator seminarium „Postęp biologiczny w produkcji roślinnej – utopia czy niezbędna potrzeba”, Toruń, 28.11.2024.
- Współorganizator seminarium z okazji obchodów Międzynarodowego Dnia Zdrowia Roślin, Toruń, 11.05.2023.
- Opiekun studentów na kierunku Diagnostyka molekularna (studia II stopnia, od roku akademickiego 2021/22).

- Recenzentka 7 prac magisterskich oraz 2 prac licencjackich. Przewodnicząca 8 komisji egzaminacyjnych.

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

Przebieg pracy naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoją pracę naukowo-badawczą rozpoczęłam w roku 2005 od realizacji pracy magisterskiej w Zakładzie Genetyki (obecnie Katedra Genetyki) na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi (obecnie Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych) Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. Anny Goc oraz prof. dr hab. Grażyny Dąbrowskiej. **Celem pracy była identyfikacja i charakterystyka genów akwaporyn u rośliny modelowej kwitnienia dnia krótkiego *Ipomoea nil* (L.) Roth (wilec wielkokwiatowy).** W trakcie realizacji pracy magisterskiej poznałam różnorodne techniki biologii molekularnej m.in. izolacja kwasów nukleinowych, klonowanie i rekombinowanie DNA, analiza poziomu mRNA.

Zainteresowanie się tematyką związaną z molekularnymi mechanizmami leżącymi u podstaw adaptacji roślin do warunków środowiskowych było powodem rozpoczęcia w 2007 roku studiów doktoranckich w Zakładzie Genetyki na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem dr hab. Anny Goc oraz prof. dr hab. Grażyny Dąbrowskiej. **Celem badań była identyfikacja i charakterystyka roślinnych genów metalotionein (MT).** Swoje badania początkowo prowadziłam na roślinie *I. nil*. MT typu 1 wilca została zidentyfikowana wcześniej przez prof. dr hab. Dąbrowską jako gen ulegający podwyższonej ekspresji w roślinach wilca indukowanych do kwitnienia. Analiza *in silico* przypuszczalnej sekwencji aminokwasowej oraz analiza filogenetyczna potwierdziła przynależność sklonowanej sekwencji do roślinnych MT1. Gen wykazywał podwyższoną ekspresję w siewkach traktowanych jonami miedzi. W kolejnych doświadczeniach zamierałam zidentyfikować sekwencje kodujące pozostałe MT wilca poprzez przeszukanie bazy EST (ang. *expressed sequence tags*). Sukcesem zakończyło się klonowanie tylko MT typu 2 (*InMT2*). Niepowodzenie klonowania w przypadku MT3 i MT4 było spowodowane brakiem pokrewieństwa wilca z jakąkolwiek rośliną powszechnie wykorzystywaną w biologii molekularnej oraz stosunkowo niewielką liczbą sekwencji MT3 i MT4 dostępnych w tamtym czasie w banku genów NCBI. Sklonowałam natomiast sekwencje genomowe MT typu 1 i 2 wilca i wykonałam hybrydyzację Southern, która wykazała, że geny występują w genomie *I. nil* w niewielkiej liczbie kopii. Traktowanie siewek wilca jonami Cu i Zn nie zmieniało w sposób istotny ekspresji *InMT2*. Komórki *E. coli* ekspresujące *InMT2* były bardziej wrażliwe na kadm. Część wyników z opisanych wyżej doświadczeń została opublikowana w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (publikacja ukazała się po uzyskaniu stopnia doktora) oraz zaprezentowane na dwóch konferencjach międzynarodowych oraz dwóch konferencjach krajowych (szczegóły dotyczące konferencji w załączniku 4).

Mierek-Adamska A, Znajewska Z, Goc A, Dąbrowska GB (2018) Molecular cloning and characterization of *Ipomoea nil* metallothioneins. Turkish Journal of Botany 42: 247-256.

Po uzyskaniu z **Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego finansowania projektu pt. „Nowe zastosowanie rzepaku – analiza ekspresji, lokalizacji i potencjalnej przydatności w fitoremediacji metalotionein rzepaku”** (2009-2012), w którym byłam wykonawcą (40%) dalsze badania w ramach przygotowywania pracy doktorskiej prowadziłam na roślinie *B. napus*. Badania rozpoczęto przed opublikowaniem sekwencji genomu rzepaku (rok 2014). Sekwencje kodujące MT rzepaku poszczególnych typów zidentyfikowałam poprzez przeszukanie bazy EST z użyciem znanych sekwencji kodujących MT rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Przynależność sklonowanych sekwencji do poszczególnych typów roślinnych metalotionein potwierdziłam przez analizę *in silico* przypuszczalnych sekwencji aminokwasowych oraz analizę filogenetyczną. Sekwencje nazwano *BnMT1-4* i zdeponowano w banku genów NCBI pod odpowiednimi numerami JX035784, JX103200, JX103201, JX103202. Analiza ekspresji *BnMT1-4* w organach rzepaku wykonana metodą półilościowego RT-PCR wykazała, że podobnie jak u innych gatunków roślin ekspresja poszczególnych typów metalotionein jest organospecyficzna. Podobnych wniosków dostarczyła analiza poziomów mRNA MT rzepaku w czasie kiełkowania nasion. W suchych nasionach najwyższy jest poziom mRNA *BnMT4*, który jednak wyraźnie spada po kilku godzinach uwadniania. Transkrypty *BnMT3* pojawiają się dopiero po 24 godzinach imbibicji, natomiast mRNA *BnMT1* i *BnMT2* są obecne na każdym etapie kiełkowania nasiona. W kolejnym kroku sprawdziłam jak zmienia się ekspresja poszczególnych typów metalotionein w nasionach kiełkujących w obecności jonów metali ciężkich: mikroelementów (cynk i miedź) oraz metali toksycznych (ołów i kadm). Ekspresja poszczególnych *BnMT* okazała się być zróżnicowana i zmieniała się w zależności od rodzaju użytego jonu oraz etapu procesu kiełkowania. Poziom mRNA genów *BnMT1-3* w liścieniach 6-dniowych siewek traktowanych jonami metali ciężkich zależał od typu MT oraz czasu, który upłynął od jego aplikacji. Analiza funkcjonalna *BnMT1-4* w komórkach bakteryjnych *E. coli* wykazała, że bakterie ekspresujące MT rzepaku rosną gorzej, tak samo lub lepiej niż bakterie kontrolne (transformowane pustym wektorem), a efekt jest zależny od typu MT i rodzaju stosowanego jonu metalu ciężkiego. Ponadto sekwencje kodujące MT rzepaku wklonowałam do wektora drożdżowego, a otrzymanymi konstrukcjami transformowałam szczep *S. cerevisiae* z mutacją powodującą zwiększoną wrażliwość na kadm (wyniki te są zawarte w publikacji **P2** i opisano je powyżej). Uzyskane wyniki posłużyły mi do napisania **pracy doktorskiej pt. „Molekularna i funkcjonalna charakterystyka genów metalotionein *Brassica napus* L.”**, którą obroniłam 11 października 2013 (nadanie stopnia doktora decyzją Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska z dnia 18.10.2013). Promotorem pracy doktorskiej była dr hab. Anna Goc, natomiast recenzentami prof. dr hab. Danuta Maria Antosiewicz z Instytutu Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego oraz prof. dr hab. Franciszek Dubert z Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie. Część wyników zawartych

w mojej pracy doktorskiej została opublikowana w formie prac badawczych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, pracy przeglądowej w czasopiśmie o zasięgu krajowym (publikacje ukazały się przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz przedstawiona na jednej konferencji międzynarodowej (po uzyskaniu stopnia doktora) oraz czterech konferencjach krajowych (trzech przed i jednej po uzyskaniu stopnia doktora; szczegóły dotyczące konferencji w załączniku 4).

Mierek-Adamska A, Dąbrowska G, Goc A (2009) Rośliny modyfikowane genetycznie a strategię oczyszczania gleb z metali ciężkich. *Postępy Biologii Komórki* 36: 649 - 662.

Dąbrowska G, Mierek-Adamska A, Goc A (2013) Characterisation of *Brassica napus* L. metallothionein genes (*BnMTs*) expression in organs and during seed germination. *Australian Journal of Crop Science* 7: 1324 - 1332.

Dąbrowska G, Mierek-Adamska A, Goc A (2012) Plant metallothioneins: putative functions identified by promoter analysis *in silico*. *ABC Series Botanica* 54/2: 109-120.

W trakcie studiów doktoranckich realizowałam również inne działania, które nie były bezpośrednio związane z tematem mojej pracy. W latach 2008-2013 we współpracy z prof. dr hab. Grażyną Dąbrowską i prof. dr hab. Katarzyną Hryniewicz z Zakładu Mikrobiologii (obecnie Katedra Mikrobiologii) UMK w Toruniu prowadziłam **badania dotyczące promowania kiełkowania i wzrostu rzepaku przez bakterie ryzosferowe wyizolowane z gleb zdegradowanych przez działania antropogeniczne**. W badaniach wyselekcjonowano szczepy bakterii zdolne do promowania kiełkowania i wzrostu siewek rzepaku także w warunkach stresowych powodowanych przez m.in. jony metali ciężkich czy zasolenie. Jednakże obserwowano znaczne różnice w zależności od badanej odmiany rzepaku. W tym czasie rozpoczęłam także badania kontynuowane po uzyskaniu stopnia doktora nad udziałem roślinnych metalotionein w interakcji roślin z mikroorganizmami promującymi wzrost. Wykazano, że ekspresja *BnMT2* zmienia się po inokulacji nasion grzybami mikoryzowymi i bakteriami ryzosferowymi. W tym okresie powstały dwie publikacje w czasopiśmie o zasięgu krajowym (opublikowane przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz cztery doniesienia konferencyjne przedstawione na konferencjach o zasięgu krajowym (przed uzyskaniem stopnia doktora) oraz jedno doniesienie przedstawione na konferencji o zasięgu międzynarodowym (po uzyskaniu stopnia doktora; szczegóły dotyczące konferencji w załączniku 4).

Dąbrowska G, Hryniewicz K, Kłosowska K, Trejgell A, Mierek-Adamska A (2010) Wpływ bakterii ryzosferowych na kiełkowanie nasion *Brassica napus* L. w obecności metali ciężkich (Cd, Cu, Pb, Zn). *Rośliny Oleiste XXXI*: 85 - 97.

Dąbrowska G, Hryniewicz K, Mierek-Adamska A, Goc A (2012) Wrażliwość odmian jarych i ozimych rzepaku na metale ciężkie i bakterie glebowe. *Rośliny Oleiste XXXIII*: 201 – 220.

W latach 2012-2014 uczestniczyłam w pracach zespołu kierowanego przez dr n. med. Małgorzatę Szady-Grad z Katedry i Zakładu Higieny i Epidemiologii (obecnie Katedra Higieny, Epidemiologii, Ergonomii i Kształcenia Podyplomowego) Wydziału Nauk o Zdrowiu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu, w projekcie pt. „**Badania populacyjne dzieci**

i młodzieży w kierunku identyfikacji zagrożeń chorobami metabolicznymi". Mój udział w projekcie polegał na analizie występowania częstości polimorfizmu punktowego C-T (numer z bazy NCBI rs7903146) w genie *TCF7L2*. U osób z genotypem CT i TT stwierdzono zwiększoną zachorowalność na cukrzycę typu 2 w porównaniu do osób z genotypem CC. Występowanie alleli jest zróżnicowane w zależności od populacji i np. w populacji europejskiej częstość allelu C wynosi około 0,7, natomiast w populacji azjatyckiej allel C występuje z częstością około 0,95 (Guinan, 2012). W projekcie stosując metodę PCR-RFLP i allelospecyficzny PCR przeanalizowałam DNA pochodzące od ponad 1000 dzieci. W przebadanej populacji częstości alleli C i T odpowiadały częstościom określonym dla populacji europejskiej.

Przebieg pracy naukowo-badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałam swoje badania nad roślinnymi metalotioneinami. Część wyników uzyskanych w tych badaniach zostało zawartych w publikacjach **P1-P6** stanowiących opisywane osiągnięcie. Ponadto, w trakcie swojej pracy naukowo-badawczej prowadziłam badania skupiające się na innych zagadnieniach, które omawiam poniżej.

W roku 2013 rozpoczęłam współpracę z dr hab. Anną Jakubowską, prof. UMK oraz dr hab. Maciejem Ostrowskim, prof. UMK z Katedry Biochemii, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, UMK w Toruniu **dotyczącą koniugatów auksyn i roli syntetazy z rodziny Gretchen Hagen 3 (GH3) w syntezie połączeń kwasu indolilo-3-octowego (IAA) z aminokwasami u grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.)**. Mój udział w projekcie polegał na sklonowaniu pełnej otwartej ramki odczytu genu *GH3* (sekwencja referencyjna genomu grochu zwyczajnego została opublikowana w roku 2019) opierając się na starterach zdegenerowanych zaprojektowanych w oparciu o sekwencje *GH3* z *Medicago truncatula* Gaertn. i *Glycine max* (L.) Merr. oraz sekwencje EST grochu zwyczajnego zdeponowane w banku genów NCBI. W reakcji RT-PCR uzyskałam fragment o długości 1858 par zasad zawierający pełną otwartą ramkę odczytu kodującą białko o długości 600 aminokwasów. Uzyskana sekwencja została zdeponowana w banku genów NCBI pod numerem KU310549.1. Analiza filogenetyczna przypuszczalnej sekwencji aminokwasowej wykazała jej podobieństwo do innych białek należących do rodziny GH3, największe do GH3.3 z *M. truncatula*. Następnie wklonowałam sekwencję kodującą do wektora ekspresyjnego pET21a(+) co umożliwiło produkcję, a następnie dalszą analizę rekombinowanego białka. Analiza ta potwierdziła, że białko to jest funkcjonalnym enzymem katalizującym syntezę koniugatów auksyny z aminokwasami, preferencyjnie IAA z kwasem asparaginowym. Efektem współpracy była publikacja w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz dwa doniesienia konferencyjne (szczegóły dotyczące konferencji w załączniku 4).

Ostrowski M, Mierek-Adamska A, Porosińska D, Goc A, Jakubowska A (2016) Cloning and biochemical characterization of indole-3-acetic acid-amino acid synthetase PsGH3 from pea. *Plant Physiology and Biochemistry* 107: 9-20.

W okresie październik 2014 - wrzesień 2015 oraz sierpień 2017 - lipiec 2019 przebywałam na stypendiach podoktorskich na Uniwersytecie Warwick w Wielkiej Brytanii (szczegóły opisane powyżej). W okresie październik 2016 - marzec 2017 przybywałam na zwolnieniu lekarskim, a następnie do lipca 2017 na urlopie macierzyńskim.

Po powrocie ze stypendium MSCA w Wielkiej Brytanii, w roku 2020 rozpoczęłam współpracę dr Stefany Cárdenas Pérez z Katedry Geobotaniki i Planowania Krajobrazu, Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, UMK w Toruniu **dotyczącą mechanizmów adaptacji halofita *Salicornia europaea* L. (soliród zielny) do stresu solnego**. Mój udział w badaniach polegał na sklonowaniu fragmentu sekwencji kodującej genu *SOS1* (*salt overly sensitive*), genom *S. europaea* nie jest jak dotąd zsekwencjonowany, opierając się na zdegenerowanych starterach zaprojektowanych na podstawie sekwencji *SOS1* zdeponowanych w banku genów NCBI pochodzących z *A. thaliana*, *Lycopersicon esculentum* (L.), *Mesembryanthemum crystallinum* (L.), *Oryza sativa* (L.), *T. aestivum* i *Salicornia brachiata* Roxb. Sekwencja ta (*SeSOS1*) została następnie zdeponowana w banku genów NCBI pod numerem MZ707082. Następnie metodą real time PCR sprawdziłam ekspresję sklonowanego genu *SeSOS1* (koduje antyporter Na^+/H^+ zlokalizowany w błonie komórkowej) oraz genu *SeNHX1* (koduje antyporter Na^+/H^+ zlokalizowany w tonoplaście) w 2-miesięcznych roślinach *S. europaea* pochodzących z okolic Ciechocinka (środowisko o wysokim zasoleniu, około 1000 mM NaCl) oraz Inowrocław-Mątwy (środowisko o średnim zasoleniu, około 550 mM NaCl) uprawianych następnie w warunkach laboratoryjnych w różnych stężeniach NaCl (0-1000 mM). Badanie te pokazały, że gen *SeSOS1* jest wyżej ekspresjonowany w roślinach pochodzących z Ciechocinka natomiast *SeNHX1* w roślinach pochodzących z Inowrocław-Mątwy. Ekspresja obu genów w obu populacjach nie była natomiast wyraźnie zależna od stężenia soli w jakim rosły rośliny. Sekwestracja jonów Na^+ w wakuolach stanowi kluczowy element mechanizmu tolerancji roślin na stres solny. **Wyższa ekspresja *SeNHX1* w populacji Inowrocław-Mątwy wraz z obserwacjami anatomicznymi i biochemicznymi wskazuje, że populacja ta cechuje się wyższą tolerancją na stres solny niż populacja z Ciechocinka.** Współpraca ta zaowocowała dwoma publikacjami w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Cárdenas-Pérez S, Niedojadło K, Mierek-Adamska A, Dąbrowska GB, Piernik A (2022) Maternal salinity influences anatomical parameters, pectin content, biochemical and genetic modifications of two *Salicornia europaea* populations under salt stress. *Scientific Reports* 12: 2968.

Cárdenas Pérez S, Strzelecki J, Piernik A, Rajabi Dehnavi A, Trzeciak P, Puchałka R, Mierek-Adamska A, Chanona Pérez J, Kačík F, Račko V, Kováč, Bhagia S, Ďurkovič J (2024) Salinity-driven changes in *Salicornia* cell wall nanomechanics and lignin composition. *Environmental and Experimental Botany* 218: 105606.

W ramach dalszej współpracy z dr Cárdenas Pérez uczestniczyłam w przygotowaniu zakwalifikowanego do finansowania wniosku o grant NCN w konkursie **Sonata 17 „Disentangling the salt-responses of functional traits: the *Salicornia europaea* model”** (nr 2021/43/D/NZ8/01137) – kierownik grantu dr Cárdenas Pérez. Projekt zakładał analizę

anatomicznych, biochemicznych i genetycznych mechanizmów adaptacji *S. europaea* do stresu solnego przez porównanie roślin z 4 populacji: dwóch polskich – Inowrocław (INO) i Ciechocinek (CIE) oraz dwóch niemieckich – Salzgraben (SAL) i Soltauquelle (SOL). Mój udział w projekcie obejmował izolację całkowitego RNA, jego analizę jakościową oraz przygotowanie do sekwencjonowania, a następnie analizę i walidację uzyskanych wyników. Ponadto sprawdziłam czy poziom metylacji DNA zmienia się w zależności od stężenia NaCl i/lub populacji, z której pochodziły nasiona. **Wykazałam znaczne różnice w ekspresji genów oraz metylacji DNA pomiędzy populacjami polskimi a niemieckimi.** Szczegółowe wyniki są obecnie analizowane i na ich podstawie przygotowywana jest publikacja do czasopisma o zasięgu międzynarodowym.

W roku 2021 rozpoczęłam współpracę z dr Aswaf Degu z Wydziału Biologii Roślin i Zarządzania Bioróżnorodnością, Uniwersytetu Addis Ababa w Etiopii dotyczącą **mechanizmów adaptacji *Coffea arabica* L. (kawa arabska) do stresu suszy.** W ramach programu Erasmus+ ówczesny doktorant Habtamu Chekol Fantahun z Wydziału Biologii Roślin i Zarządzania Bioróżnorodnością, Uniwersytetu Addis Ababa w Etiopii odbył pod moją opieką 3-miesięczny staż naukowy (marzec-maj 2021) w Katedrze Genetyki, UMK w Toruniu. W trakcie stażu kontynuowane były badania rozpoczęte w Etiopii dotyczące mechanizmów tolerancji stresu suszy kawy. Kawa arabska jest jednym z najważniejszych uprawianych przez człowieka gatunków roślin, a uprawy są ograniczone do regionów świata o klimacie tropikalnym. Regiony te są narażone na suszę, a ponadto nawadnianie upraw nie jest typową praktyką agronomiczną stosowaną w tych regionach. **Może to powodować straty w uprawach sięgające nawet 80%** (DaMatta & Ramahlo, 2006). Istotne jest zatem poszukiwanie odmian opornych na suszę. Badania prowadzone we współpracy z naukowcami z Uniwersytetu Addis Ababa w Etiopii miały na celu zbadanie zależności pomiędzy cechami nasion (waga, wymiary, powierzchnia, objętość, zawartość wody), kiełkowaniem i wzrostem siewek a stopniem tolerancji poszczególnych odmian na suszę (po 3 odmiany tolerancyjne, średnio wrażliwe i wrażliwe na suszę zidentyfikowane w poprzednich badaniach). **Wykazano, że odmiany tolerancyjne na suszę mają większą siłę i wigor kiełkowania, a siewki mają dłuższe korzenie i pędy.** Właściwości te pozytywnie korelują z wyższą zawartością wody w nasionach, większą powierzchnią i objętością nasion. Do dalszych analiz wybrano 2 odmiany tolerancyjne i 2 odmiany wrażliwe na suszę. Analiza tych odmian wykazała, że odmiany tolerancyjne zachowują wyższy poziom asymilacji CO₂, przewodnictwa szparkowego i barwników fotosyntetycznych w czasie trwania stresu suszy w porównaniu do odmian wrażliwych. Ponadto, analiza metabolitów wykazała, że zarówno u odmian tolerancyjnych jak i wrażliwych dochodzi do zwiększonej akumulacji metabolitów związanych z odpowiedzią na stres suszy jak cukry czy prolina, jednakże odmiany tolerancyjne cechują się znacznie większym poziomem akumulacji tych właśnie metabolitów. Te badania zaowocowały dwiema publikacjami w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Chekol H, Bezuyaehu Y, Warkineh B, Shimber T, Mierek-Adamska A, Dąbrowska GB, Degu A (2023) Unraveling drought tolerance and sensitivity in coffee genotypes: insights from seed traits, germination, and growth-physiological responses. *Agriculture* 13: 1754.

Chekol H, Warkineh B, Shimber T, Mierek-Adamska A, Dąbrowska GB, Degu A (2024) Drought stress responses in Arabica coffee genotypes: physiological and metabolic insights. *Plants* 13: 828.

Ponadto w ramach tej współpracy prowadzone są badania dotyczące molekularnych mechanizmów adaptacji kawy do stresu suszy. **W toku badań przeprowadzono kompleksową analizę *in silico* genów (sekwencji kodujących oraz promotorowych) kodujących akwaporyny (AQP) oraz analizę białek.** AQP to transbłonowe białka odpowiedzialne za transport wody i innych małych cząsteczek (np. glicerol, amoniak, nadtlenek wodoru) przez błony biologiczne. W oparciu o sekwencję, strukturę i subkomórkową lokalizację wyróżnia się 5 typów roślinnych AQP: PIP (*plasma membrane intrinsic proteins*), TIP (*tonoplast membrane intrinsic proteins*), NIP (*nodulin26-like major intrinsic proteins*), SIP (*small and basic intrinsic proteins*) oraz XIP (AQP specyficzne dla roślin). Oprócz błony komórkowej i tonoplastu AQP są zlokalizowane także w innych błonach wewnętrznych. Białka te są związane ze wzrostem i rozwojem rośliny oraz odpowiedzią na różnorodne warunki stresowe, nie tylko stres suszy, ale także obecność metali ciężkich czy stres solny (Dąbrowska & Głowacka, 2004; Li, Santoni & Maurel, 2014). Analiza tetraploidalnego genomu kawy wykazała występowanie 58 genów kodujących AQP. W sekwencjach promotorowych ponad połowy genów AQP kawy wykazano występowanie elementu regulatorowego MYB, jednego z najlepiej poznanych elementów związanych z odpowiedzią na suszę. Ponadto, w ponad 80% analizowanych promotorów występuje element odpowiedzi na ester metylowy kwasu jasmonowego (MeJA). Te wstępne badania zostały przedstawione na konferencji o zasięgu międzynarodowym (szczegóły dotyczące konferencji w załączniku 4). Obecnie badania są kontynuowane tj. analizowana jest ekspresja wybranych genów AQP kawy w odmianach wrażliwych i opornych na suszę hodowanych w warunkach optymalnego nawodnienia i w stresie suszy. W przyszłości planowana jest analiza transkryptomów, która pozwoli na identyfikację genów związanych z adaptacją kawy do suszy. Ponadto prowadzone są badania, których celem jest selekcja mikroorganizmów zdolnych do promowania wzrostu i plonowania kawy.

Jestem również zaangażowana w **badania dotyczące odpowiedzi ścisłej u roślin.** Odpowiedź ścisła została po raz pierwszy opisana u bakterii jako mechanizm umożliwiający adaptację do warunków głodu. W warunkach stresowych u bakterii akumulacja alarmonów (nietypowych nukleotydów – tetra- (ppGpp) i pentaforanów (pppGpp) guanozyny) prowadzi do zahamowania ekspresji tRNA, rRNA i białek rybosomalnych, a indukowana jest ekspresja genów umożliwiających adaptację do warunków stresowych. Odpowiedź ścisła to mechanizm umożliwiający adaptację także roślin do warunków stresowych poprzez zmianę poziomu alarmonów, pełniących rolę cząsteczek sygnałowych (Masuda, 2012). Obecność alarmonów najpierw potwierdzono u *Chlamydomonas reinhardtii*, a następnie geny

homologiczne do bakteryjnych *RelA/SpoT* - *RSH* (*RelA/SpoT* homologs) zostały zidentyfikowane u *A. thaliana* i u innych gatunków roślin. Roślinne RSH podzielono na 3 grupy – RSH1 wykazujące aktywność hydrolazy alarmonów, RSH2/3 posiadających obie aktywności oraz CRSH będących syntetazami alarmonów, a do swojej aktywności wymagających jonów Ca^{2+} . Wykazano, że odpowiedź ścisła u roślin steruje fizjologią roślin. Efektory odpowiedzi ścisłej (alarmony) regulują globalne zmiany metabolizmu w najważniejszych procesach rozwojowych jak kwitnienie, rozwój nasion czy starzenie się organów. Ponadto, mechanizm ten odpowiada za adaptację do zmieniających się lub niekorzystnych warunków środowiskowych, jak nadmierne zasolenie, susza, zranienie, atak patogenów czy niedobór związków odżywczych (Maekawa i in., 2015). Mój udział w tych badaniach rozpoczął się w jeszcze w roku 2013, kiedy to byłam opiekunką magistrantki przygotowującej pracę magisterską dotyczącą udziału odpowiedzi ścisłej w odpowiedzi na stres solny i obecność bakterii ryzosferowych u rzepaku. Analiza sekwencji promotorowych wybranych 4 genów *RSH* rzepaku wykazała istnienie licznych elementów regulatorowych związanych z odpowiedzią na stresy abiotyczne, elicytory grzybowe czy fitohormony. Ponadto, wykazano wzrost ekspresji genów *BnRSH1-3* w korzeniach roślin innokulowanych *Pseudomonas stutzeri* w stresie solnym, natomiast ekspresja *BnCRSH* ulegała w tych warunkach obniżeniu. W ramach tej pracy powstało jedno doniesienie przedstawione na konferencji krajowej (szczegóły dotyczące konferencji w załączniku 4).

Po powrocie ze stypendium MSCA w Wielkiej Brytanii do tego tematu wróciłam w roku 2021, kiedy zostałam **powołana na promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej dr Seny Turkan** (obrona rozprawy doktorskiej 13.10.2023) pt. „The role of plant stringent response in *Brassica napus* L. in response to biotic and abiotic factors and during seed development”. **Mój udział w tych badaniach i realizacji pracy doktorskiej polegał na współopracowaniu koncepcji publikacji, bezpośredniej opiece nad doktorantką w czasie wykonywania eksperymentów, pomocy w opracowywaniu i analizowaniu wyników, przygotowywaniu rycin i tabel oraz pisaniu i edycji manuskryptów.** Celem pracy była analiza rodziny genów *RSH* u *B. napus* oraz określenie potencjalnej roli odpowiedzi ścisłej w adaptacji tej rośliny do warunków środowiskowych. W genomie *B. napus* zidentyfikowano 12 genów *RSH* oraz 2 pseudogeny. Analiza organizacji intronowo-eksonowej tych genów wykazała, że geny *BnRSH1* cechują się bardzo skomplikowaną strukturą i posiadają ponad 20 intronów i eksonów. Analiza sekwencji aminokwasowej oraz analiza filogenetyczna wykazała, że podobnie jak u innych roślin RSH rzepaku można podzielić na 3 grupy: RSH1, RSH2/3 i CRSH. W sekwencji RSH1 występuje substytucja glicyna-seryna odpowiedzialna za utratę aktywności syntetazy alarmonów, natomiast w sekwencji CRSH rzepaku stwierdzono występowanie substytucji odpowiedzialnych za utratę aktywności hydrolazowej tego białka. Białko BnCRSH, podobnie jak inne białka tej grupy, zawiera domeny EF odpowiedzialne za wiązania jonów Ca^{2+} . Wszystkie analizowane białka BnRSH potencjalnie zawierają peptyd sygnałowy skierowujący do chloroplastów. Analiza sekwencji promotorowych genów *BnRSH* wykazała

występowanie wielu elementów regulatorowych związanych z odpowiedzią roślin na światło, hormony oraz stresy biotyczne i abiotyczne. W genomie rzepaku występuje tylko jeden gen kodujący CRSH (dla porównania jest 6 genów kodujących RSH1 i 5 genów kodujących RSH2/3), dlatego wybrano go do dalszych badań. Ekspresja *BnCRSH* wzrastała w czasie dojrzewania nasion rzepaku, osiągając maksymalny poziom 70 dni po kwitnieniu. Po 80 dniach od kwitnienia była natomiast ponad 4-krotnie niższa. Podobny trend wykazywał poziom jonów Ca^{2+} - maksymalna zawartość obserwowana była 70 dni po kwitnieniu, a następnie spadała. Wzrost poziomu wapnia w czasie dojrzewania nasion prowadzi prawdopodobnie do wzrostu aktywności *BnCRSH* i tym samym wzrostu poziomu alarmonów. **Powoduje to obniżenie ekspresji genów jądrowych i plastydowych, co jest niezbędne do dostosowania metabolizmu nasion do ich wejścia w fazę dojrzałości (odwodnienie i zahamowanie metabolizmu).** Analiza poziomu mRNA *BnRSH* w siewkach rzepaku traktowanych NaCl wykazała, że ekspresja tych genów nie była indukowana przez stres solny. Co ciekawe, wykazano natomiast wzrost ekspresji *BnRSH1* i *BnRSH2* w liściach i korzeniach siewek, które wyrosły z nasion inokulowanych *Serratia liquefaciens* i *Serratia plymuthica*. Efektu takiego nie obserwowano w przypadku bakterii *Massilia timonae*. Badane w tym doświadczeniu bakterie należą do bakterii PGPR, a ich zdolność do promowania wzrostu różnych gatunków roślin również w stresie solnym została potwierdzona we wcześniejszych badaniach (Hrynkiewicz, Baum & Leinweber, 2010; Hrynkiewicz i in., 2015). **Wyniki poniższych badań wskazują, że przynajmniej niektóre bakterie PGPR mogą wspomagać wzrost i rozwój roślin także w warunkach stresowych poprzez indukcję roślinnej odpowiedzi ściślej.** W trzeciej publikacji analizowano grzyby *Trichoderma viride* i potwierdziliśmy, że badany szczep grzyba hamuje wzrost *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea* i *Colletotrichum* sp. Otoczkowanie nasion jest uznawane za jeden z najskuteczniejszych sposobów aplikacji mikroorganizmów promujących wzrost roślin (Rocha i in., 2019), dlatego za cel postawiliśmy sobie uzyskanie otoczki nasiennej zawierającej spory *T. viride*. Jako wypełniacz otoczki zastosowano chitynę, a jako substancję odpowiedzialną za adhezję otoczki do nasion rzepaku wykorzystano metylocelulozę. Nasiona otoczkowane nie kiełkowały lepiej niż nasiona nieotoczkowane, ale siewki, które wyrosły z otoczkowanych nasion cechowały się zwiększoną biomasą oraz długością pędów i korzeni w porównaniu do roślin kontrolnych. Ponadto stwierdziliśmy, że otoczkowanie nie powoduje wzrostu ekspresji genów *RSH* oraz poziomu aktywności SOD. **Uzyskana otoczka jest przyjazna dla środowiska, promuje wzrost siewek rzepaku oraz nie powoduje stresu u roślin. Otoczka została opatentowana (numer Pat. 248336, data patentu 14.10.2025).** W ramach tej pracy doktorskiej powstały 3 publikacje w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. W jednej z publikacji jestem autorem korespondencyjnym.

Dąbrowska GB, Turkan S, Tylman-Mojżesz W, Mierek-Adamska A (2021) *In silico* study of the RSH (*RelA/SpoT* Homologs) gene family and expression analysis in response to PGPR bacteria and salinity in *Brassica napus*. International Journal of Molecular Sciences 22: 10666.

Turkan S, Mierek-Adamska A, Głowacka K, Szydłowska-Czerniak A, Rewers M, Jędrzejczyk I, Dąbrowska GB (2023) Localization and expression of *CRSH* transcript, level of calcium ions, and cell cycle activity during *Brassica napus* L. seed development. *Industrial Crops & Products* 195: 116439.

Turkan S, Mierek-Adamska A, Kulasek M, Konieczna WB, Dąbrowska GB (2023) New seed coating containing *Trichoderma viride* with anti-pathogenic properties. *PeerJ* 11: e15392.

Analiza ekspresji genów *BnRSH1-3* oraz poziomu alarmonów w dojrzewających nasionach rzepaku w połączeniu z analizą poziomu białek, lipidów, cukrów, oleju, barwników fotosyntetycznych oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych sugeruje udział odpowiedzi ścisłej w dojrzewaniu nasion rzepaku. **Uzyskane wyniki wskazują, że odpowiedź ścisła reguluje proces odwodnienia nasion i degradację chlorofilu poprzez kontrolowanie systemów antyoksydacyjnych.** Wyniki te zostały opublikowane już po obronie pracy doktorskiej dr Turkan w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Turkan S, Kulasek M, Zienkiewicz A, Mierek-Adamska A, Skrzypek E, Warchoń M, Szydłowska-Czerniak A, Bartoli J, Field B, Dąbrowska GB (2024) Guanosine tetraphosphate (ppGpp) is a new player in *Brassica napus* L. seed development. *Food Chemistry* 436: 137648.

W trakcie swojej kariery pracowałam w projektach związanych z **zastosowaniem mikroorganizmów w rolnictwie**. Zainteresowanie tym tematem zaowocowało publikacją przeglądową w czasopiśmie o charakterze międzynarodowym, w której jestem autorem korespondencyjnym. W publikacji tej dokonano kompleksowego przeglądu literatury opisującej molekularne mechanizmy leżące u podstaw interakcji roślina-mikroorganizmy. Przedstawiono liczne przykłady mikroorganizmów promujących wzrost i rozwój roślin, skupiając się na publikacjach, w których analizowano również jaki mechanizm leży u podstaw tego pozytywnego oddziaływania. W publikacji tej poruszamy również problem rozbieżności pomiędzy pozytywnymi efektami działania mikroorganizmów na roślinę, kiedy interakcje są testowane w warunkach laboratoryjnych lub szklarniowych, a brakiem tego pozytywnego efektu, kiedy testy są przeprowadzone w warunkach polowych. Dyskutujemy również interakcje pomiędzy mikroorganizmami tworzącymi mikrobiom danej rośliny oraz koncepcję holobiontu. W szczególności przedstawiamy udział mechanizmów antyoksydacyjnych, fitohormonów oraz odpowiedzi ścisłej w interakcjach roślina-mikroorganizm. Zwłaszcza ten ostatni mechanizm jest interesujący i stosunkowo mało poznany. Wydaje się, że rośliny mogą manipulować poziomem alarmonów w mikroorganizmach tworzących ich własny mikrobiom, ale także w potencjalnie patogennych bakteriach.

Antoszewski M, Mierek-Adamska A, Dąbrowska GB (2022) The importance of microorganisms for sustainable agriculture – a review. *Metabolites* 12: 1100.

Część badań związanych z możliwością zastosowania mikroorganizmów w rolnictwie była realizowana w ramach **projektów badawczo-rozwojowych**. W roku 2021 brałam udział w badaniach finansowanych przez Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko-Pomorskiego „**Więcej wiedzy na hektar, mniej chemii na hektar – wstępne badania**

biologicznych rozwiązań dla rolnictwa". Badania dotyczyły **hydrożeli i ich potencjalnego zastosowania w uprawach rzepaku**. Mój udział w projekcie polegał na opracowaniu metod aplikacji hydrożeli bezpośrednio na nasiona lub do gleby oraz analizie parametrów wzrostu siewek rzepaku. Wyniki badań pokazały, że **w stosowaniu komercyjnie dostępnych hydrożeli niezwykle istotna jest ich odpowiednia aplikacja**. Nieprawidłowe stosowanie (tj. nieodpowiednie stężenie czy forma podania do gleby) może mieć negatywny wpływ na kiełkowanie i dalszy wzrost siewek. W późniejszej fazie badań projekt dotyczący hydrożeli został uzupełniony o badania pokazujące efekt jednoczesnego zastosowania hydrożeli i inokulacji nasion bakteriami należącymi do PGPM. W badaniu polowym wykazano potencjał *S. plymuthica* do promowania wzrostu i rozwoju rzepaku, przy jednoczesnym obniżeniu nawożenia w warunkach suszy. **W badaniu polowym wykazano również brak skuteczności hydrożelu w poprawianiu wzrostu roślin rzepaku oraz jego negatywny efekt na działanie *S. plymuthica***. Badania te zaowocowały publikacją o zasięgu międzynarodowym.

Dąbrowska GB, Krauklis D, Kulasek M, Nocny M, Antoszewski M, Mierek-Adamska A, Kaliska B (2025) Synthetic hydrogel dilutes *Serratia plymuthica* growth-promoting effect on *Brassica napus* L. under drought conditions. Agriculture 15: 142.

W latach 2021-2023 byłem członkiem zespołu projektowego kierowanego przez prof. dr hab. Grażynę Dąbrowską w projekcie finansowanym przez NCBR w ramach konkursu Szybka ścieżka pt. „**Innowacyjne, płynne nawozy azotowe z krzemem i mikroelementami wzbogacone w mikroorganizmy oraz dodatki funkcjonalne**” (POIR.01.01.01-00-1313/20), którego beneficjentem była Grupa Azoty Zakłady Chemiczne „Police” S.A. W ramach zadania badawczego pt. „Badanie nad opracowaniem sposobu wprowadzania mikroorganizmów do formuł nawozów płynnych o ustalonych składach chemicznych” prowadzone były badania w celu selekcji mikroorganizmów (bakterii z rodzaju *Bacillus*, *Serratia* i *Pseudomonas* oraz grzybów z rodzaju *Trichoderma*) zdolnych do promowania wzrostu i rozwoju roślin, które jednocześnie mogłyby przeżyć w nawozach mineralnych. Mój udział w projekcie polegał na określaniu przynależności rodzajowej/gatunkowej analizowanych mikroorganizmów, opracowaniu metody określenia liczebności i składu gatunkowego mikroorganizmów na roślinach traktowanych nawozami z dodatkiem wybranych mikroorganizmów. Brałem również udział w analizowaniu wyników, przygotowaniu raportu końcowego oraz formułowaniu rekomendacji dla zlecającego badanie. **Efektem realizacji projektu było wyselekcjonowanie kolekcji mikroorganizmów zdolnych do przeżywania w nawozie mineralnym o określonym składzie i promowania wzrostu roślin**. Ponadto opracowano protokoły długoterminowego przechowywania mikroorganizmów oraz ich namnażania na skalę półtechniczną.

W latach 2022-2023 uczestniczyłam w realizacji projektu pt. „**Żywność zwiększająca odporność organizmu na wirusy**” finansowany przez MEiN oraz Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego w ramach programu „Inkubator innowacyjności UMK_4.0”. Projekt zakładał pozyskanie siewek popularnych roślin warzywnych i ziół jak *Anethum graveolens* L. (koper

ogrodowy), *Raphanus sativus* L. var. *sativus* (rzodkiewka) i *Lepidium sativum* L. (pieprzyca siewna pot. rzeżucha) cechujących się zwiększoną zawartością cynku. Mój udział w projekcie polegał na opracowaniu parametrów procesu kondycjonowania (stężenia, czas, forma chemiczna jonów cynku) oraz sprawdzeniu czy ekspresja metalotionein oraz genów odpowiedzi ścisłej jest zależna od warunków kondycjonowania. Kondycjonowanie nasion ZnSO_4 prowadziło do poprawy parametrów kiełkowania oraz wzrostu siewek, a także prowadziło do zwiększonej zawartości jonów Zn w siewkach. Do kondycjonowania zastosowaliśmy również mieszaninę ZnSO_4 oraz bakterii *Lactobacillus*, co nie skutkowało jednak lepszymi parametrami kiełkowania i wzrostu czy zwiększoną zawartością cynku. Na poziomie molekularnym obecność bakterii *Lactobacillus* powodowała obniżenie ekspresji genów *MT* i *RSH* w siewach w porównaniu do siewek, które wyrosły z nasion kondycjonowanych samym cynkiem. **Wyniki wykorzystano do przygotowania zgłoszenia patentowego** (szczegóły dotyczące zgłoszeń patentowych w załączniku 4).

Kolejne badania związane z tematem mikroorganizmów w rolnictwie dotyczyły **grzybów z rodzaju *Trichoderma***. Analiza szczepów *T. viride* pozyskanych z różnych środowisk wykazała, że szczepy różnią się zdolnością do syntezy IAA, aktywnością celulolityczną i pektynolityczną. W doświadczeniu *in vitro* testowane szczepy różniły się też zdolnością do promowania wzrostu siewek rzepaku, a co ciekawe niektóre szczepy wykazywały negatywny wpływ na rośliny. Ekspresja *MT* rzepaku wzrastała w odpowiedzi na inokulację *T. viride*, chociaż efekt był zależy od typu MT, organu rośliny oraz szczepu grzyba. Ekspresja genów *RSH* generalnie spadała w korzeniach i liścieniach siewek, które wyrosły z nasion inokulowanych sporami grzyba, tylko w przypadku *RSH3* ekspresja wzrastała w korzeniach. Jeden z badanych szczepów został również przetestowany w warunkach polowych i wykazano, że inokulacja sporami grzyba prowadzi do statystycznie istotnego wzrostu plonowania. Ciekawym zagadnieniem jest również mechanizm kolonizacji korzeni rzepaku przez *T. viride*. Analiza mikroskopowa wykazała, że strzępki grzyba formują „sieć” wokół korzenia głównego, a następnie włóśników. Uzyskane wyniki wskazują również na możliwość penetracji apoplastu endodermy korzenia przez strzępki grzyba. Ta hipoteza jest obecnie weryfikowana poprzez analizy kolonizacji korzenia przez *T. viride* w mikroskopie elektronowym. Mój udział w tym projekcie polegał na hodowli materiału do badań, analizie wzrostu roślin w warunkach *in vitro*, analizie ekspresji, edycji manuskryptu oraz nadzorowania pracy doktorantów biorących udział w projekcie. Wyniki te zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz przedstawione na dwóch międzynarodowych oraz jednej krajowej konferencji (szczegóły konferencji w załączniku 4).

Garstecka Z, Antoszewski M, Mierek-Adamska A, Krauklis D, Niedojadło K, Kaliska B, Hrynkiewicz K, Dąbrowska GB (2023) *Trichoderma viride* colonizes the roots of *Brassica napus* L., alters the expression of stress-responsive genes, and increases the yield of canola under field conditions during drought. International Journal of Molecular Sciences 24: 15349.

Projektem, który pośrednio łączy się z opisanymi powyżej jest **zastosowanie ekstraktu z jemioty w rolnictwie**. Ekstrakty roślinne są bogate w różnorodne substancje i mają potencjał do stosowania w rolnictwie zrównoważonym w celu ograniczenia zużycia agrochemikaliów (Godlewska, Ronga & Michalak, 2021). W ekstrakcie z jemioty znajdują się liczne substancje biologicznie czynne jak lektyny, wiskotoksyny, flawonoidy czy aminokwasy. Jednakże skład takiego ekstraktu jest zależny od części rośliny, z której został przygotowany, pory roku w której zebrano rośliny czy wreszcie metody ekstrakcji. Ekstrakt z jemioty jest znany ze swoich właściwości antybakteryjnych (Pietrzak & Nowak, 2021). Jest także stosowany jako czynniki wspomagający działanie układu immunologicznego w czasie klasycznej chemioterapii, jednakże wielu autorów wskazuje, że istniejące doniesienia są niewystarczające do potwierdzenia skuteczności stosowania tego ekstraktu (Horneber i in., 2008; Pelzer i in., 2022). Możliwości zastosowania ekstraktu z jemioty w rolnictwie nie są powszechnie badane. Mój udział w projekcie polegał na opracowaniu metody aplikacji ekstraktu na nasiona, napisaniu i edycji manuskryptu. Aplikacja wodnego ekstraktu z jemioty na nasiona nie powodowała wzrostu biomasy oraz długości hypocotyli i korzeni siewek rzepaku, natomiast obserwowano **statystycznie istotny wzrost chlorofilu i karotenoidów**. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz planowane jest napisanie projektu dotyczącego dalszych badań nad potencjałem ekstraktu z jemioty do stosowania w rolnictwie.

Michalak M, Antoszewski M, Kamiński D, Mierek-Adamska A, Dąbrowska GB (2024) Priming of *Brassica napus* L. seeds with aqueous extract from mistletoe (*Viscum album* L.) boosts the content of photosynthetic pigments. Ecological Questions 35: 4.

Oprócz badań nad zastosowaniem mikroorganizmów w rolnictwie w Katedrze Genetyki prowadzone są badania zapoczątkowane przez prof. dr hab. Grażynę Dąbrowską dotyczące **degradacji materiałów polimerowych przez mikroorganizmy**. Jednym z badanych mikroorganizmów była bakteria *Serratia plymuthica* szczep IV-11-34. Genom tej bakterii został zsekwencjonowany i zdeponowany w banku genów NCBI (NZ_JAAQRN010000000). Analiza genomu tej bakterii wykazała istnienie 155 genów, których produkty mogą być zaangażowane w degradację i metabolizm ksenobiotyków. Zdolność do degradacji polilaktydu (PLA) i poli(tereftalau etylenu) (PET) została oszacowana na podstawie analizy biochemicznego zapotrzebowania na tlen (BOD). Zaobserwowano wyraźny wzrost BOD, kiedy bakterie hodowano w pożywkach zawierających PLA lub PET jako jedyne źródło węgla w porównaniu do pożywek kontrolnych. Ponadto wykazano, że bakterie formują biofilm na powierzchni tworzywa, który był obecny zarówno na PLA jak i PET. W celu zbadania molekularnych mechanizmów leżących u podstaw obserwowanej biodegradacji zbadano ekspresję genów kodujących białka odpowiedzi ścisłej. Za metabolizm alarmonów u bakterii odpowiadają białka RelA (syntetaza alarmonów) i SpoT (przede wszystkim hydrolaza alarmonów, chociaż może wykazywać również niską aktywność syntetazy). U większości bakterii występuje jeden

bifunkcyjny enzym Rel (Durfee i in., 2008; Boutte & Crosson, 2013). W obecności PLA obserwowano wzrost ekspresji *relA*, a w obecności PET spadek ekspresji *spoT*. **Wzrost bakterii w pożywkach zawierających polimer jako jedyne źródło węgla powoduje stres spowodowany brakiem składników odżywczych.** Adaptacja metabolizmu do takich warunków odbywa się poprzez wzrost poziomu alarmonów. Mój udział w przygotowaniu publikacji opisującej te wyniki polegał na nadzorowaniu doświadczeń dotyczących analizy genomu *S. plymuthica*, przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz jego edycji po recenzjach, kuratorstwie danych. Wykazano również możliwość biodegradacji PLA i PET przez grzyby *T. viride*. Do badań wybrano szczep, który charakteryzował się wysokimi zdolnościami hydrolitycznymi. Po 3 miesiącach inkubacji fragmentów polimerów w hodowli grzyba wykazano, że strzępki grzyba bardzo ściśle przylegają do powierzchni polimerów. Analiza właściwości polimerów po inkubacji w hodowli grzyba poprzez skaningową kalorymetrię różnicową oraz spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera dostarczyła dowodów na biodegradację PLA przez *T. viride*. **W proces biodegradacji tworzyw sztucznych przez grzyby są zaangażowane małe białka bogate w reszty cysteinowe – hydrofobiny.** Białka te wydzielane z komórki umożliwiają adhezję strzępek grzyba do hydrofobowych powierzchni np. powierzchni tkanek roślinnych. Białka te mają zdolność do spontanicznego formowania amfipatycznej monowarstwy umożliwiającej interakcję pomiędzy hydrofobowym a hydrofilowym środowiskiem (Scholtmeijer, Wessels & Wösten, 2001; Wu i in., 2017; Cicatiello i in., 2017). W badaniach wykazano obecność hydrofobin w podłożu pohodowlanym oraz hydrofobinowego filmu na powierzchni PET i PLA. Film ten jest kluczowym etapem umożliwiającym przyleganie strzępek grzyba do powierzchni tworzywa. Mój udział w publikacji opisującej te wyniki polegał na hodowli grzyba oraz przygotowaniu polimerów do badań, przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu oraz jego edycji po recenzjach, kuratorstwie danych. W obu tych publikacjach jestem autorem korespondencyjnym.

Dąbrowska GB, Tylman-Mojżesz W, Mierek-Adamska A, Richert A, Hryniewicz K (2021) Potential of *Serratia plymuthica* IV-11-34 strain for biodegradation of polylactide and poly(ethylene terephthalate). International Journal of Biological Macromolecules 193: 145-153.

Dąbrowska G, Garstecka Z, Olewnik-Kruszkowska E, Szczepańska G, Ostrowski M, Mierek-Adamska A (2021) Changes in the structure of polylactide and poly(ethylene terephthalate) in the presence of *Trichoderma viride*. International Journal of Molecular Sciences 22: 3491.

W trakcie swojej pracy zawodowej zajmowałam się również **metalotioneinami z innych grup organizmów niż rośliny**. Brałam udział w opisanych powyżej (rozdział 5) badaniach dotyczących MT ryby *C. gariepinus*. Ponadto jestem współautorem pracy przeglądowej dotyczącej **MT bakteryjnych**. MT bakteryjne stanowią bardzo ciekawą, zróżnicowaną grupę białek. Jak dotąd białka te opisano u cyjanobakterii, bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i *Mycobacterium*. Najlepiej poznana SmtA z *Synechococcus* PCC 7942 to białko o długości 56 aminokwasów z 9 resztami cysteinowymi oraz 3 resztami histydynowymi.

MT występujące u *Pseudomonas* (PmtA) zbudowane są zwykle z ponad 70 aminokwasów z 10 resztami cysteinowymi i zawierają od 1 do 3 reszt histydynowych. MymT występujące u *Mycobacterium* 7 reszt cysteinowych i 2 histydynowe, a całkowita długość białka to 56 aminokwasów. MymT wykazują bardzo niski stopień homologii do SmtA i PtmA. Ten niski stopień homologii pomiędzy sekwencjami MT u różnych grup bakterii znacznie utrudnia identyfikację nowych członków rodziny bakteryjnych metalotionein.

Mierek-Adamska A, Tylman-Mojżesz W, Znajewska Z, Dąbrowska GB (2017) Metalotioneiny bakteryjne. *Postępy Mikrobiologii* 56: 171-179.

Nadal kontynuuję badania roślinnych metalotionein. Większość badań dotyczących tego tematu została opisana powyżej. **Byłam promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej dr Wiktorii Koniecznej pt. „Rola metalotionein owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) w odpowiedzi na czynniki środowiskowe”** (obrona rozprawy doktorskiej 4.02.2025). Wyniki badań opisanych w tej rozprawie doktorskiej zostały uwzględnione w opisie powyżej (rozdział 4.3).

Obecnie jestem **promotorem pomocniczym rozprawy doktorskiej mgr Marcela Antoszewskiego** (planowana obrona rozprawy doktorskiej - II połowa 2026 roku). Celem projektu doktorskiego mgr Antoszewskiego jest analiza roli odpowiedzi ścisłej w adaptacji do warunków niedoboru mikroelementów u rośliny modelowej *A. thaliana*. Wiadomo, że niedobór składników odżywczych indukuje odpowiedź ścisłą u bakterii. W przypadku roślin odpowiedź ścisła była indukowana u *A. thaliana* (Honoki i in., 2018) i ryżu (Li i in., 2022) w odpowiedzi na niedobór azotu. **Rola odpowiedzi ścisłej w adaptacji do niedoboru mikroelementów jest zupełnie nowym kierunkiem badań nad tym mechanizmem.** Wstępne wyniki pokazują wyraźny wzrost ekspresji genów kodujących syntetazy alarmonów (RSH2, RSH3 i CRSH) na pożywkach pozbawionych mikroelementów. Nawiązana współpraca z prof. Benem Fieldem z Aix Marseille University (Francja) umożliwiła wykorzystanie w tym projekcie mutantów *A. thaliana*, wytworzonych przez prof. Fielda tj. niewytwarzających alarmonów (mutant z delecją w genach *RSH2*, *RSH3* i *CRSH*) oraz produkujących większe ilości alarmonów (mutant z nadekspresją genu *RSH3*). Rośliny typu dzikiego (ekotyp Col-0) oraz mutanty hodowano na pożywce MS, MS bez Zn, MS bez Fe, MS bez Mn, MS bez Cu oraz MS bez wszystkich tych czterech pierwiastków. Rośliny nie wytwarzające alarmonów i produkujące większą ich ilość rosły gorzej na wszystkich analizowanych pożywkach niż rośliny typu dzikiego. Obecnie w trakcie są analizy transkryptomu, poziomu alarmonów, barwników fotosyntetycznych, fitohormonów i zawartości mikroelementów, których wstępne wyniki wskazują na udział odpowiedzi ścisłej w adaptacji do niedoboru mikroelementów. Planowane są również badania struktury ściany komórkowej oraz ultrastruktury komórki. Na realizację projektu mgr Antoszewski uzyskał **grant NCN Preludium** (nr 2024/53/N/NZ1/01374) **„Adapt or starve - exploring alarmones signaling pathway in metal starvation in *Arabidopsis thaliana*”**, w którym pełnię rolę opiekuna naukowego mgr Antoszewskiego.

Mgr Antoszewski bierze również udział w rozpoczętych przeze mnie badaniach nad **mutantem *A. thaliana MT4a/MT4b***, którego wytworzyłam w trakcie pobytu na stypendium MSCA w Wielkiej Brytanii. Wstępne badania kiełkowania i wczesnego wzrostu siewek nie wykazały różnic pomiędzy mutantem a roślinami typu dzikiego na pożywkach MS. Ze względu na rolę MT typu 4 w akumulacji cynku w nasionach w czasie kiełkowania postawiłam hipotezę, że różnice fenotypowe będą widoczne, kiedy rośliny będą kiełkowały i rosły na pożywkach pozbawionych cynku. Jednakże żaden z testowanych parametrów kiełkowania i wczesnego wzrostu roślin (m. in. siła kiełkowania, długość korzeni, świeża i sucha masa) nie różnił się pomiędzy roślinami typu dzikiego a mutantem. Mutanty miały natomiast mniej chlorofilu niż rośliny typu dzikiego. W związku z postulowaną przeze mnie wcześniej rolą MT4 jako białek zdolnych do rozróżniania pomiędzy Zn a Cd sprawdzony został również wzrost roślin w pożywkach zawierających Cd (10, 30, 60, 100 μM). Co ciekawe, na pożywkach z 10 μM Cd, mutanty miały większą suchą i świeżą biomasę niż rośliny typu dzikiego. W związku z wykazaną przeze mnie wcześniej możliwością regulacji MT przez fitohormony sprawdzono zawartość fitohormonów (IAA, JA, ABA, GA7, SA) w roślinach typu dzikiego i mutantach na różnych podłożach. Najbardziej istotne zmiany zaobserwowano dla JA – na podłożach MS mutanty zawierały znacznie mniej JA niż rośliny typu dzikiego, podczas gdy odwrotną sytuację obserwowano dla podłoży bez Zn i z Cd. Obserwowaliśmy również wzrost ekspresji bardzo wielu genów związanych z biosyntezą JA na podłożach z Cd i bez Zn u mutantów w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Wskazuje to na udział JA w homeostazie cynku oraz detoksyfikacji kadmu oraz na regulację MT4 przez ten fitohormon. Bardzo ciekawa jest również obserwacja, że w mutantach zwłaszcza na podłożu bez Zn bardzo intensywnie wzrasta ekspresja licznych genów kodujących transportery jonów metali ciężkich zwłaszcza z rodziny ZIP, COPT i NRAMP w porównaniu z roślinami typu dzikiego na tym samym podłożu. Brak MT4 powoduje zwiększanie ilości białek zaangażowanych m. in. w pobieranie cynku z podłoża, co sugeruje **rolę MT4 jako swoistego sensora statusu cynku w roślinach**. Z tych wyników przygotowywana jest właśnie publikacja do czasopisma o zasięgu międzynarodowym (planowane przesłanie do czasopisma Q1 w marcu 2026 roku). Część z wyników przedstawiono w czasie międzynarodowej konferencji (szczegóły dotyczące konferencji w załączniku 4).

Badania nad roślinnymi MT kontynuowane są również w obecnie trwającym projekcie **doktorskim mgr Magdaleny Michalak, w którym jestem promotorem pomocniczym** (planowana obrona rozprawy doktorskiej – II połowa 2028 roku). Celem projektu doktorskiego mgr Michalak jest analiza funkcji MT badając mutanty wytworzone na drodze edycji genomu metodą CRISPR/Cas. Mgr Michalak kontynuuje analizy mutantu *AtMT4a/MTb* skupiając się na analizie roli MT typu 4 w warunkach wysokiego, toksycznego dla roślin stężenia cynku. Obecnie mgr Michalak analizuje kiełkowanie i wzrost roślin w pożywkach MS zawierających Zn w stężeniach 100-500 μM (klasyczna pożywka MS zawiera Zn w stężeniu około 30 μM). Wstępne wyniki pokazują, że przy wysokim stężeniu cynku mutanty kiełkują i rosną gorzej niż rośliny typu dzikiego. W kolejnych etapach sprawdzone zostaną parametry biochemiczne

roślin i odpowiedź antyoksydacyjna oraz zostaną wybrane warianty, dla których zostanie wykonane sekwencjonowanie RNA. Równocześnie mgr Michalak pracuje nad uzyskaniem wektorów umożliwiających wprowadzenie delecji w genach kodujących MT typu 1-3. Dla każdego genu projektowane są przynajmniej cztery gRNA, które następnie klonowane są do wektorów pEN-Chimera oraz pEN-2xChimera. Zastosowanie dwóch gRNA jednocześnie do jednego genu znacznie usprawnia późniejszą identyfikację roślin, u których występuje delecja. Po potwierdzeniu obecności gRNA poprzez sekwencjonowanie, kasetę zawierającą gRNA oraz elementy regulatorowe jest przenoszona do wektorów docelowych z nukleazą Cas9 poprzez rekombinację umiejscowioną. Wydajność uzyskanych wektorów jest obecnie testowana w protoplastach. W planie pracy doktorskiej mgr Michalak jest również kontynuacja rozpoczętego przeze mnie projektu dotyczącego możliwości wprowadzenia w sekwencji kodującej MT substytucji stosując technologię CRISPR/Cas. **Ta część projektu doktorskiego jest kontynuacją grantu NCN Miniatura „Udział histydyn w metalotioneinach typu 4 w odróżnianiu pomiędzy cynkiem a kadmem” (nr 2023/07/X/NZ1/00987), którego byłam kierownikiem.** W ramach realizacji tego projektu zaprojektowałam gRNA, tak aby docelowo modyfikować nukleotydy w kodonach kodujących histydynę w MT4. Te gRNA wklonowałam następnie do wektora pJY-RpABE (Addgene), zawierającego gen kodujący SpCas9 z substytucją D10A (enzym ma aktywność nikazy) oraz gen kodujący ABE (edytor adeniny). Efektywność tych wektorów do wprowadzania substytucji w kodonie CAC kodującym histydynę w MT4 testowałam w protoplastach. Z niewielką wydajnością uzyskiwałam pożądaną substytucję, częściej obserwowałam substytucję w kodonie obok. Jest to spowodowane tym, że w celu wprowadzenia substytucji w określonym miejscu kluczowa jest odległość gRNA od docelowego nukleotydu. Z drugiej strony, umiejscowienie gRNA jest uwarunkowane obecnością sekwencji PAM w docelowym fragmencie DNA. W projekcie doktorskim mgr Michalak planowane jest więc wykorzystanie Cas z innych gatunków bakterii, dzięki czemu będzie możliwe precyzyjniejsze wprowadzenie substytucji do docelowego kodonu. W oparciu o wyniki uzyskane przez mgr Michalak nie zostały przygotowane jeszcze żadne publikacje, natomiast część wyników przedstawionych zostało na konferencjach krajowych (szczegóły dotyczące konferencji w załączniku 4).

W latach 2020-2025 byłam członkiem **Wyłaniającego się pola badawczego (Emerging Field) „Nauki o glebie, mikrobiologia, genetyka w rolnictwie i jakość pożywienia”** utworzonego na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu w ramach konkursu MNiSW „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza”. Wyłaniające się pola badawcze zostały wyłonione w ramach konkursu na UMK w Toruniu, a ich celem było zwiększenie umiędzynarodowienia badań, pozyskiwania środków na badania oraz realizacja innowacyjnych badań. Moja badania skupiające się na badaniu genetycznych podstaw interakcji mikroorganizmów z roślinami wpisują się w działalność naukową zespołu. Udział w tym zespole będzie kontynuowany w latach 2026-2028 – projekt **„Organiczne rozwiązania dla bioróżnorodności napędzające innowacje w rolnictwie i żywieniu (OBSIDIAN)”** otrzymał

dofinansowanie w ramach konkursu na wybór zespołów badawczych prowadzących badania w priorytetowych obszarach badawczych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Literatura:

- BOUTTE, C.C. & CROSSON, S. (2013) Bacterial lifestyle shapes the regulation of stringent response activation. *Trends Microbiol* 21, 174–180.
- CICATIELLO, P., DARDANO, P., PIROZZI, M., GRAVAGNUOLO, A.M., DE STEFANO, L. & GIARDINA, P. (2017) Self-assembly of two hydrophobins from marine fungi affected by interaction with surfaces. *Biotechnol Bioengineer* 114, 2173–2186.
- DaMatta FM & Ramalho JDC (2006) Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Braz J Plant Physiol* 18: 55–81.
- DĄBROWSKA, G. & GŁOWACKA, B. (2004) Aquaporins - new entry into plants water movement. *Adv Biochem* 50, 383–387.
- DURFEE, T., HANSEN, A.M., ZHI, H., BLATTNER, F.R. & DING, J.J. (2008) Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190, 1084–1096.
- GODLEWSKA, K., RONGA, D. & MICHALAK, I. (2021) Plant extracts - importance in sustainable agriculture. *It J Agronom* 16, 1851.
- GUINAN, K.J. (2012) Worldwide distribution of type II diabetes-associated TCF7L2 SNPs: evidence for stratification in Europe. *Biochem Gen* 50, 159–179.
- HONOKI, R., ONO, S., OIKAWA, A., SAITO, K. & MASUDA, S. (2018) Significance of accumulation of the alarmone (p)ppGpp in chloroplasts for controlling photosynthesis and metabolite balance during nitrogen starvation in *Arabidopsis*. *Photosynth Res* 135, 299–308.
- HORNEBER, M., VAN ACKEREN, G., LINDE, K. & ROSTOCK, M. (2008) Mistletoe therapy in oncology. CDSR 2020, CD003297.
- HRYNKIEWICZ, K., BAUM, C. & LEINWEBER, P. (2010) Density, metabolic activity, and identity of cultivable rhizosphere bacteria on *Salix viminalis* in disturbed arable and landfill soils. *J Plant Nutr Soil Sci* 173, 747–756.
- HRYNKIEWICZ, K., ZŁOCH, M., KOWALKOWSKI, T., BAUM, C., NIEDOJADŁO, K. & BUSZEWSKI, B. (2015) Strain-specific bioaccumulation and intracellular distribution of Cd²⁺ in bacteria isolated from the rhizosphere, ectomycorrhizae, and fruitbodies of ectomycorrhizal fungi. *Environ Sci Poll Res* 22, 3055–3067.
- LI, G., SANTONI, V. & MAUREL, C. (2014) Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *BBA - General Subjects* 1840, 1574–1582.
- LI, H., NIAN, J., FANG, S., GUO, M., HUANG, X., ZHANG, F., WANG, Q., ZHANG, J., BAI, J., DONG, G., XIN, P., XIE, X., CHEN, F., WANG, G., WANG, Y., ET AL. (2022) Regulation of nitrogen starvation responses by the alarmone (p)ppGpp in rice. *J Gen Genom* 49, 469–480.
- MAEKAWA, M., HONOKI, R., IHARA, Y., SATO, R., OIKAWA, A., KANNO, Y., OHTA, H., SEO, M., SAITO, K. & MASUDA, S. (2015) Impact of the plastidial stringent response in plant growth and stress responses. *Nature Plants* 2015 1, 15167.
- MASUDA, S. (2012) The stringent response in phototrophs. In *Advances in Photosynthesis — Fundamental Aspects*. (ed M. NAIFFOUR), pp. 487–500.
- PELZER, F., LOEF, M., MARTIN, D.D. & BAUMGARTNER, S. (2022) Cancer-related fatigue in patients treated with mistletoe extracts: a systematic review and meta-analysis. *Support Care Cancer* 30, 6405–6418.
- PIETRZAK, W. & NOWAK, R. (2021) Impact of harvest conditions and host tree species on chemical composition and antioxidant activity of extracts from *Viscum album* L. *Molecules* 26, 3741.
- ROCHA, I., MA, Y., SOUZA-ALONSO, P., VOSÁTKA, M., FREITAS, H. & OLIVEIRA, R.S. (2019) Seed coating: a tool for delivering beneficial microbes to agricultural crops. *Frontiers Plant Sci* 10, 1357.
- SCHOLTMEIJER, K., WESSELS, J.G.H. & WÖSTEN, H.A.B. (2001) Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 1–8.
- WU, Y., LI, J., YANG, H. & SHIN, H.-J. (2017) Fungal and mushroom hydrophobins: a review. *J Mushroom* 15, 1–7.

Kursy i szkolenia:

- Szkolenie „Molekularne metody w diagnostyce medycznej i weterynaryjnej” organizowane przez „MBS Serwis dla Biologii Molekularnej” i Uniwersytet Medyczny w Łodzi (21-23.11.2011).
- Szkolenie „Raising article quality” organizowane przez Academic Development Centre, Warwick University (15.05.2019).
- Szkolenie „Przygotowanie do Szybkich Randek Naukowo-Dziennikarskich” organizowane przez Stowarzyszenie Rzecznicy Nauki finansowane ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki (16.11.2022).

- Szkolenie „Rozwijanie kompetencji dydaktycznych nauczycieli akademickich. Zastosowanie wybranych rozwiązań dydaktycznych.” organizowane przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika (październik-grudzień 2022).
- Szkolenia „Persuasive grant writing” i „Writing a research paper” w ramach Nature Masterclasses (marzec, wrzesień 2023).
- Szkolenie „How to write a competitive proposal for Horizon Europe” organizowane w ramach programu „Inicjatywa doskonałości – uczelnia badawcza” (IDUB) UMK (4.10.2023).
- Szkolenie „Komunikacja z osobą z zaburzeniem psychicznym” organizowane przez samodzielne Stanowisko ds. Zarządzania Zasobami Ludzkimi oraz Uniwersytecki Ośrodek Wsparcia i Rozwoju Osobistego UMK (7.06.2024).
- Szkolenia e-learningowe CBA „Korupcja w biznesie”, „Korupcja w administracji publicznej”, „Przeciwdziałanie korupcji” (lipiec-sierpień 2024).
- Szkolenia Narodowego Centrum Badań i Rozwoju „Kim jest ekspert NCBR” (5.08.2024), „Jak przygotować recenzję wniosku o zmianę lub recenzję raportu?” (21.10.2024), „Ocena wniosków o dofinansowanie w konkursach krajowych, strategicznych i międzynarodowych” (4.11.2024).
- Szkolenie podnoszące kompetencje z zakresu zielonej transformacji „Ryzyka klimatyczne” (styczeń 2025), szkolenie podnoszące kompetencje cyfrowe „Test na MOODLE nie tylko do egzaminowania. Różne sposoby wykorzystanie platformy” (październik-listopad 2024), szkolenie podnoszące kompetencje dydaktyczne „Gry i kreatywne ćwiczenia w aktywnym uczeniu się studentów” oraz „Wyzwania w pracy ze studentami” (grudzień 2024 - styczeń 2025) organizowane w ramach projektu MODULE4NCU Poniesienie kompetencji kadry dydaktycznej UMK w Toruniu w latach 2024-2026 (styczeń 2025).
- Szkolenie „Sztuczna inteligencja (AI) na uczelni” (3.06.2025) oraz warsztaty „Sztuczna inteligencja w dydaktyce akademickiej” (13.06.2025) organizowane przez ADD i Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.
- Szkolenia „Transformacja energetyczna” (11.06.2025, 18.06.2025), „System ankietowy Lime Survey” (24.09.2025), „System wideokonferencyjny Rally Plus” (30.09.2025) w ramach projektu pt. „Integralny Program Wsparcia Kompetencji Kluczowych dla Gospodarki 4.0 studentów i kadry UMK w Toruniu”.

Nagrody i wyróżnienia:

- Grant od Federacji Europejskich Towarzystw Biologii Roślin umożliwiający uczestnictwo w XVI Kongresie FESPB (18-22.08.2008, Tampere, Finlandia).
- Wyróżnienie zespołowe JM Rektora UMK za osiągnięcia naukowe w roku 2019 i 2021.
- Wyróżnienie w ramach Nagrody Specjalnej: Zespół badawczy Katedry Genetyki Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych – Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu za rozwiązanie pod nazwą: „Bio-otoczka nasienna i technologia jej wytwarzania”, Liderzy Innowacji Pomorza i Kujaw 2022.
- Nagroda za najlepszy plakat w czasie Second Edition of Virtual International Conference “Plant productivity and food safety: Soil science, Microbiology, Agricultural genetics and Food quality.” 15-16.09.2022, Online.
- Srebrny Medal za rozwiązanie „Ochrona biootoczka nasion rzepaku”, XVI Międzynarodowe Targi Wynalazków i Innowacji, Intrag 2023, 24-25. 05.2023, Katowice.

- Medal Brązowy za Długoletnią Służbę (2024).
- Stypendia JM Rektora UMK za publikacje w prestiżowych czasopismach naukowych (8).
- Nagroda Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin za najlepszą pracę przeglądową w języku angielskim w latach 2023-2025 za publikację „Type 4 plant metallothioneins – players in zinc biofortification?”.

Plany na przyszłość

Moje plany na przyszłość są bezpośrednio związane z opisywanymi powyżej badaniami i zastosowaniem **techniki CRISPR/Cas9 do badania funkcji roślinnych metalotionein**. Chciałabym uzyskać roślinę *A. thaliana* z delecją we wszystkich aktywnie ekspresjonowanych genach *MT*. Rozpoczęta współpraca z prof. Fieldem umożliwi wykorzystanie w tym celu wektorów umożliwiających multipleks CRISPR/Cas, co znacznie przyspieszy pozyskanie pożądanych mutantów. Ponadto planuję wykorzystać technologię CRISPR/Cas do modyfikacji nukleotydów w celu uzyskania roślin ekspresujących **MT o zmienionej sekwencji**, zwłaszcza MT4 z substytucją histydyn. Badania te będą kontynuacją badań przedstawionych w publikacjach P1 i P6. W tych badaniach chciałabym kontynuować współpracę z prof. Gutierrez-Marcos. Kontynuując analizę transgeniczných linii *A. thaliana* ekspresujących SbMT4 oraz mutanty tego białka (P6) chciałabym sprawdzić czy obecność/brak histydyn zmienia **subkomórkową lokalizację kadmu/cynku oraz ich chemiczną specjację**. W tym celu kontynuując współpracę z prof. Blindauer chciałabym opracować metodologię umożliwiającej ustalenie chemicznej specjacji cynku i kadmu w tkankach roślinnych. Brakującym ogniwem w zrozumieniu roli roślinnych metalotionein jest również brak badań pokazujących **interakcje MT z innymi białkami**, dlatego planuję podjęcie próby opracowania metodologii to umożliwiającej. Ponadto będę kontynuować badania związane z roślinnymi metalotioneinami oraz reaktywnymi formami tlenu. W ramach kontynuacji współpracy z dr Cardenas-Perez wykorzystując uzyskane już wyniki sekwencjonowania RNA *S. europaea*, **planuję analizę MT u tej rośliny**. Jest to bardzo interesujący temat badawczy, ponieważ wiadomo, że halofity wykształciły mechanizmy umożliwiające im adaptację do wysokich stężeń metali ciężkich, a bardzo niewiele wiadomo o MT w tej grupie roślin.

Mam również zamiar kontynuować badania niezwiązane bezpośrednio z metalotioneinami w tym badania nad **rolą odpowiedzi ścisłej w adaptacji roślin do warunków stresowych oraz molekularnych mechanizmów leżących u podstaw interakcji roślin z mikroorganizmami**. W ramach tego ostatniego tematu szczególnie interesują mnie mechanizmy dzięki którym mikroorganizmy zwiększają biodostępność mikroelementów zawartych w glebie dla roślin. Ponadto, będę kontynuować współpracę z prof. dr hab. Edytą Skrzypek i dr hab. Marzeną Warchoł z Instytutu Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie **nad liniami hybrydowymi owsa i kukurydzy**.