

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Adam Batík**

Buněčná biologie transportu železa u rostlin

Cell biology of iron transport in plants

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: prof. RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Praha, 2022

**Charles University**  
**Faculty of Science**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 4.5.2022

Adam Batík

.....

## **Podakovanie**

Ďakujem svojmu školiteľovi prof. RNDr. Viktor Žárský, CSc. za trpezlivosť a ochotu pri tvorbe tejto práce.

## **Abstrakt**

Rastliny využívajú železo ako kofaktor proteínov fotosyntetických systémov, respiračného reťazca a mnohých ďalších. Železo je pre rastliny ťažko dostupné kvôli jeho výskytu v pôde v nerozpustných oxidovaných zlúčeninách. Rastliny si preto vyvinuli dve rozdielne mechanizmy zisku železa z pôdy. Kvôli toxicite železa spôsobenej produkciou kyslíkových radikálov Fentonovou reakciou, ako aj nešpecifitou transportérov kovov do bunky sa musí vnútorná koncentrácia železa v bunke prísne regulovať. Rastliny si vyvinuli komplexný systém signálnych regulácií ktorý sa v súčasnosti začal intenzívne odkrývať. Okrem regulácie príjmu železa z pôdy sa bunka vyrovnáva s toxicitou kovov ich sekvestráciou do zásobných organel a ich cheláciou. Železo má dôležitú úlohu pri klíčení semien ale v tejto práci sa bude venovať pozornosť predovšetkým transportu železa v rastline na úrovni príjmu z pôdy, transportu medzi bunkami, bunkovými organelami a transportu v celej rastline vodivými pletivami.

**Kľúčové slová:** rastlinná bunka; minerálna výživa; transport železa; vačkový transport; membránový transport; toxicita železa; ROS

## **Abstract**

Plants use iron as a cofactor of proteins used in photosynthetic systems, electron transport chain and many more. Iron bioavailability for plants in soil is low because it tends to oxidise and create insoluble compounds. For this reason plants have evolved two distinct iron uptake mechanisms. Because of the iron toxicity caused by production of reactive oxygen species via the Fenton reaction and the unspecific transport of metals other than iron, plants have to regulate cellular iron concentration tightly. They have evolved a complex system of signalling networks that has recently begun to uncover. In addition to the regulation of iron uptake, the plant cell combats iron toxicity by sequestering iron into storage organelles and by chelating it. Iron is essential for seed sprouting but this work is focused on transport of iron into the plant from the soil, subcellular transport and long distance transport of iron in the vasculature.

**Key words:** plant cell; mineral nutrition; iron transport; vesicle trafficking; membrane transport; iron toxicity; ROS

## Zoznam použitých skratiek

ABA	Kyselina abscisová
ABC	ATP-binding cassette
ABCI	ABC subfamily I
ABI	Abscisic acid-insensitive protein
AHA	<i>Arabidopsis</i> H <sup>+</sup> -ATPase
bHLH	Basic helix-loop-helix
BID	BTS interacting domain
BS	Bunková stena
BTS	Brutus
BTSL	Brutus-like
CCC	Ca <sup>2+</sup> -sensitive cross-complementer
CIPK	CBL-interacting protein kinase
CK	Cytokiníny
CO	Oxid uhoľnatý
CSN	COP9 signalosome
DMA	2-deoxy mugineová kyselina
DUB	Deubiquitinating enzyme
EAR	Ethylene response factor-associated amphiphilic repression
ECF	Energy-coupling factor
EE	Early endosome
EIL	Ethylene insensitive3-like
EIN	Ethylene insensitive
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport
ET	Etylén
FBP	FIT-binding protein
FER	Feritíny
FIT	FER-like iron-deficiency-induced transcription factor
FPN	Ferroportin
FRD	Ferric reductase defective
FRDL	FRD3 like
FRO	Ferric reduction oxidase
FYVE1/FREE1	FYVE domain protein required for endosomal sorting 1
GA	Giberelíny
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
HHE	Haemerythrin
HRZ	Haemerythrin motif-containing RING and zinc-finger protein

IBP	IDEF1-binding proteins
IDE	Iron deficiency-responsive cis-acting element
IDEF	IDE-binding factor
IDF	IRT1 degradation factor
ILR	laa leucine resistant
IMA	Iron man
IREG	Iron-regulated
IRO	Iron-related transcription factor
IRT	Iron regulated transporter
JA	Jasmonáty
LE	Late endosome
MAR	Multiple antibiotic resistance
MAs	Kyseliny mugineové
MIT	Mitochondrial iron transporter
MRS	Mitochondrial RNA splicing proteins
MVB	Multivesicular body
MYB	Myeloblastosis
NA	Nikotianamín
NAC	No apical meristem
NAS	Nicotianamine synthetase
NO	Oxid dusnatý
NRAMP	Natural resistance-associated macrophage protein
OPT	Oligopeptide transporter
PDR	Pleiotropic drug resistance
PIC	Permease in chloroplasts
PM	Plazmatická membrána
PRI	Positive regulator of iron deficiency response
PYE	Popeye
RE	Recycling endosome
RING	Really interesting new gene
ROS	Kyslíkový radikál
SA	Kyselina salicylová
SNP	Single nucleotide polymorphisms
SNX	Sorting nexin
TF	Transkripčné faktory
TGN	Trans-golgi network
TOM	Transporter of mugineic acid family phytosiderophores

TPL	Topless
TPR	Topless-related
URI	Upstream regulator of IRT1
VIT	Vacuolar membrane transporter
VP	Viviparous
VTL	Vacuolar-iron-transporter1-like
WT	Wild type
YS	Yellow stripe
YSL	Yellow stripe like
ZAT	Zinc finger of <i>Arabidopsis thaliana</i>
ZIF	Zinc induced facilitator



## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Príjem železa z pôdy do bunky.....	2
2.1. Stratégia I.....	2
2.2. Stratégia II.....	2
2.3. Signálna kaskáda Fe hladovania .....	3
2.3.1. Signalizácia v rastlinách so stratégiou I.....	4
2.3.2. Signalizácia v rastlinách so stratégiou II.....	5
2.3.3. Senzory nedostatku Fe .....	6
2.3.4. Fytohormóny a iné signálne molekuly ktoré ovplyvňujú transport Fe v rastline	7
2.4. Rozdiely a spojitosti oboch stratégií.....	9
3. Intracelulárny transport železa .....	10
3.1. Endocytóza IRT1.....	10
3.2. Vakuola .....	11
3.3. Plastidy.....	12
3.4. Mitochondrie .....	14
4. Transport Fe vodivými pletivami .....	16
4.1. Xylém .....	16
4.2. Floém .....	17
5. Záver.....	19
6. Použitá literatúra .....	20

## 1. Úvod

Železo (Fe) je esenciálny prvok ktorý sa vyskytuje ako kofaktor rôznych enzýmov, zohráva dôležitú úlohu v regulácii a fungovaní dýchacieho reťazca, fotosyntézy, syntézy a opravy nukleotidov, udržovaní homeostázy kovov a štrukturálnej integrity rôznych enzýmov (Mahender et al. 2019, review). Pri hladovaní na Fe vykazuje rastlina chlorózu, žlté sfarbenie fotosynteticky aktívnych pletív, ako následok nedostatku pigmentov ktorých syntéza vyžaduje Fe (Vaid et al. 2020, review). Avšak Fe dokáže byť vo vyšších koncentráciách toxické. Produktami Fentonovej reakcie, ktorú Fe katalyzuje, sú vysoko reaktívne kyslíkové radikály (ROS), ktoré poškodzujú membránové lipidy, proteíny a DNA (Connolly et al. 2002, review). Túto vlastnosť Fe využívajú Lipnicovité (*Poaceae*) rastliny vo svoj prospech pri obrane proti fungálnym/hubovým infekciám. Rastlina pri napadnutí aktívne transportuje cytoplazmatické Fe do apoplastu vo forme veziklov, kde ROS poškodzujú patogén a posilňujú bunkovú stenu (BS) rastliny (Liu et al. 2007).

Primárnym zdrojom Fe pre rastlinu je pôda. Fe sa v pôde môže vyskytovať ako súčasť nerozpustných železitých ( $\text{Fe}^{+3}$ ) zlúčenín alebo ako rozpustné železnaté ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ióny. Konkrétna forma a teda aj dostupnosť Fe pre organizmy závisí hlavne od pH pôdy, redoxného potenciálu, mikrobiálnej aktivity a hladiny kyslíku (Zhang et al. 2019, review). Aby rastliny dokázali využiť často prítomné ale biologicky nedostupné  $\text{Fe}^{+3}$ , vyvinuli si dve odlišné stratégie. A to stratégiu I, využívanú hlavne dvojkľúčolistovými a jednokľúčolistovými (okrem *Poaceae*) rastlinami, a stratégiu II využívanú *Poaceae* (Marschner et al. 1986, review).

V tejto práci budú prezentované poznatky o príjme, následnom transporte, lokalizácii a signálnej úlohe železa. Bude kladený dôraz na IRT1 (iron regulated transporter 1), vysoko afinitný transportér rôznych kovov do bunky.

## 2. Príjem železa z pôdy do bunky

### 2.1. Stratégia I

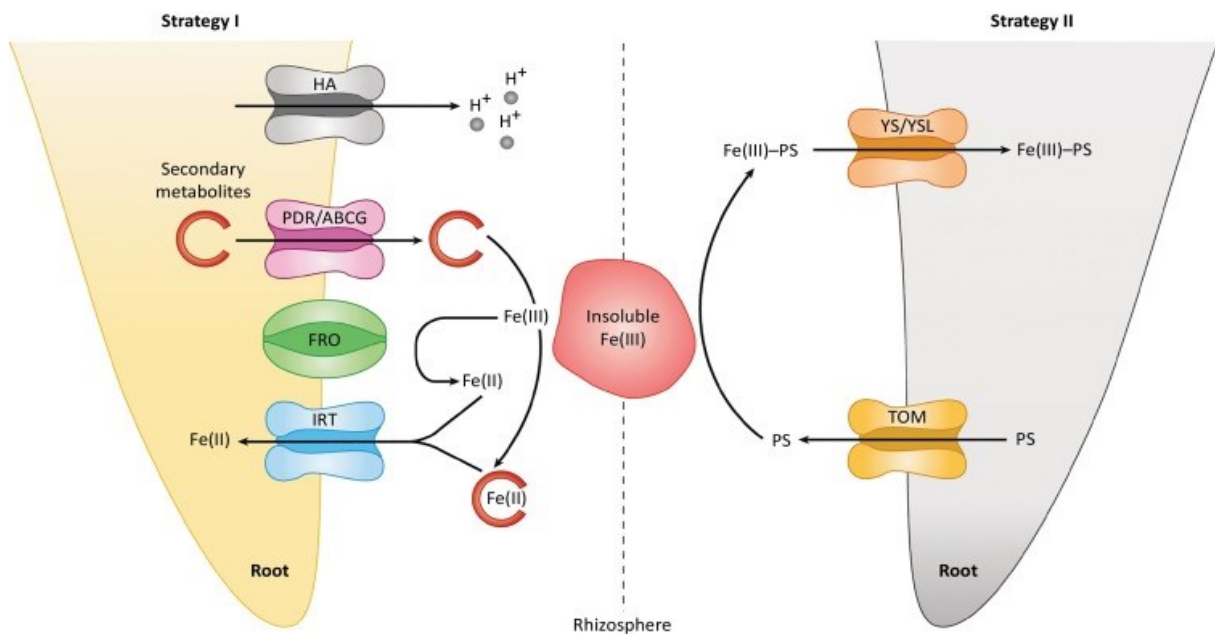
Rastliny so stratégiou I do rizosféry vylučujú fenolické látky, kumaríny, ktoré sú schopné chelátovať  $\text{Fe}^{+3}$  (Römheld a Marschner 1983). Tieto látky sú do apoplastu vylučované membránovým ABC (ATP-binding cassette) transportérom PDR9 (pleiotropic drug resistance 9) (Fourcroy et al. 2014). Na plazmatickej membráne (PM) sú  $\text{H}^+$ -ATPázy z rodiny AHA (*Arabidopsis*  $\text{H}^+$ -ATPase) ktoré okysľujú nielen bezprostredné okolie PM ale aj koreňa čím zvyšujú rozpustnosť  $\text{Fe}^{+3}$ . Proteíny rodiny AHA sú kódované viacerými génmi ale len jeden homológ – AHA2 vykazuje zvýšenú expresiu pri hladovaní na Fe (Santi a Schmidt 2009). Po rozpustení a naviazaní  $\text{Fe}^{+3}$  na chelát sa  $\text{Fe}^{+3}$  redukuje na  $\text{Fe}^{+2}$  pomocou membránovej  $\text{Fe}^{+3}$ -chelát reduktázy FRO2 (ferric reduction oxidase 2), a tým sa rozpadá komplex Fe-chelát (Robinson et al. 1999). Voľné  $\text{Fe}^{+2}$  je následne transportované do bunky membránovým proteínom IRT1 ktorý okrem Fe transportuje aj Zn, Mn a pravdepodobne aj kadmium (Cd) a kobalt (Co) (Eide et al. 1996, Vert et al. 2002).

Okrem IRT1 sa na príjme Fe a iných kovov z pôdy a apoplastu podieľa aj rodina proteínov NRAMP (natural resistance-associated macrophage protein), ktoré sú hlavné transportéry Mn do rastlinnej bunky (hlavne NRAMP1). IRT1 a NRAMP1 sú redundantné a môžu sa čiastočne nahradzovať, pričom výrazný chlorotický fenotyp dvojitého mutanta *irt1/nramp1* môže byť zachránený zvýšením hladiny Fe v médiu ale nie Mn (Castings et al. 2016).

### 2.2. Stratégia II

Rastliny využívajúce stratégiu II vylučujú do rizosféry kys. mugineové (MAs) ktoré chelátujú  $\text{Fe}^{+3}$  (Takagi et al. 1984). Rastliny využívajú hlavne 2-deoxy mugineovú kyselinu (DMA), ktorá je do rizosféry vylučovaná špecifickým transportérom TOM1 (transporter of mugineic acid family phytosiderophores 1) (Nozoye et al. 2010). MAs sú v bunke syntetizované z L-methionínu skrz nikotianamín (NA). Táto dráha syntézy je zaujímavá z evolučného hľadiska lebo NA sa vyskytuje vo všetkých vyšších rastlinách vrátane rastlín so stratégiou I, kde sa podieľa na chelácii a následnom transporte kovov v rastline, avšak rastliny so stratégiou I postrádajú MAs (Higuchi et al. 1999). Komplex MA a  $\text{Fe}^{+3}$  je do bunky transportovaný membránovým  $\text{H}^+$  symportérom YS1 (yellow stripe 1) alebo YSL (yellow stripe like) proteínmi (Curie et al. 2001, Schaaf et al. 2004, Lee et al. 2009).

Fytosiderofóry ako DMA chelatujú okrem Fe aj meď (Cu), mangán (Mn), zinok (Zn) a iné kovy (Treeby et al. 1989). Pri transporte týchto komplexov vykazujú YS proteíny značnú variabilitu naprieč jednotlivými druhmi rastlín. Kukuričný ZmYS1 transportuje rôzne kovy v chelátovom komplexe s DMA aj s NA vrátane NA-Fe<sup>+2</sup> ale jačmenný HvYS1 vykazuje vysokú afinitu k Fe<sup>+3</sup>-DMA komplexu a netransportuje iné DMA cheláty ani žiadne NA cheláty (Schaaf et al. 2004, Murata et al. 2006). Druhovú rozdiely existujú aj v množstve MAs vylučovaných do rizosféry, pričom väčšie množstvo MAs prispieva k lepšej tolerancii k hladovaniu na Fe (Marschner et al. 1986, review).



**Obrázok 1:** Oba mechanizmy príjmu železa rastlinami. Naľavo je zobrazená stratégia I. HA(AHA) okyseluje rizosféru, PDR transportuje kumaríny (Secondary metabolites) ktoré chelátujú nerozpustné Fe<sup>+3</sup>, FRO proteín redukuje chelátované Fe<sup>+3</sup> na voľné Fe<sup>+2</sup> ktoré je transportované do bunky IRT1. V strede obrázka je zobrazené nerozpustné železo v pôde. V pravej časti obrázka je vyobrazená stratégia II. TOM transportuje do rizosféry fytosiderofóry (PS) ako napríklad DMA, PS chelátujú Fe<sup>+3</sup> ktoré je potom transportované do bunky YS/YSL proteínmi. Prevzaté z review od Tsai a Schmitd, 2017. Skratky proteínov sú vysvetlené v texte vyššie.

### 2.3. Signálna kaskáda Fe hladovania

Keďže Fe je esenciálne ale aj toxické a transportéry nie sú špecifické, rastliny si vyvinuli zložitý signalizačný systém expresie génov zodpovedných za príjem kovov do bunky. Aj tu existujú rozdiely medzi stratégiou I a II, ale jadro signalizačnej kaskády je konzervované naprieč vyššími rastlinami.

### 2.3.1. Signalizácia v rastlinách so stratégiou I

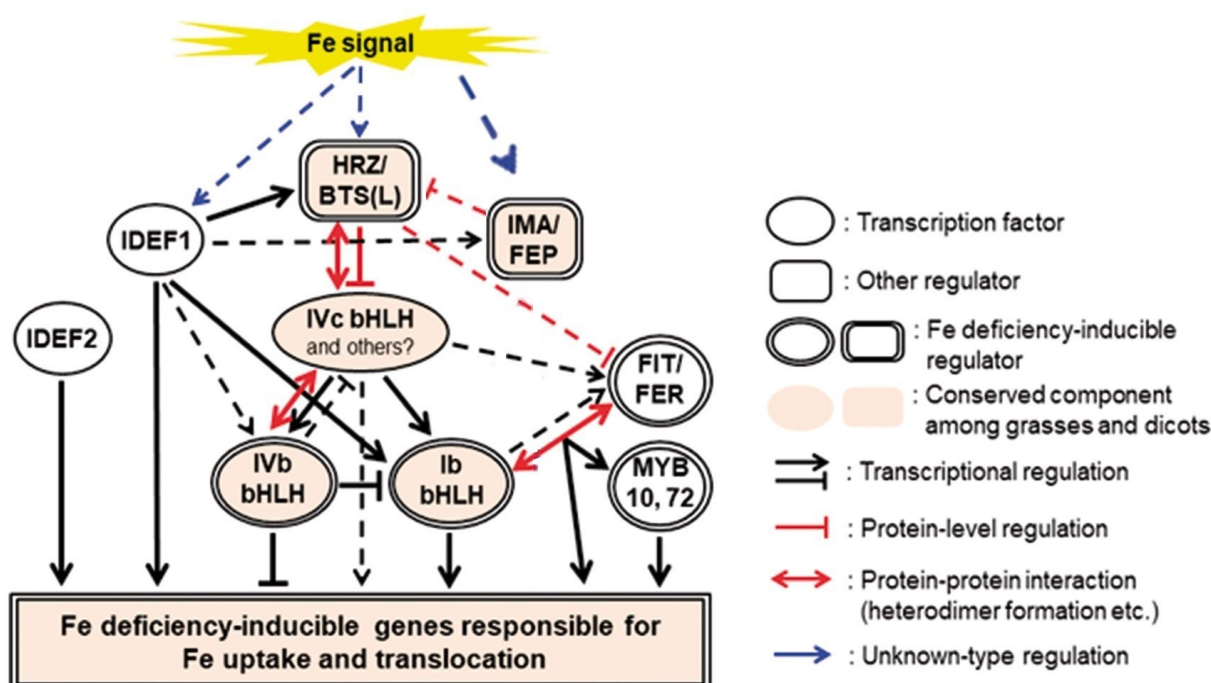
Na vrchole kaskády v *Arabidopsis thaliana* je E3 ubikvitín ligáza BTS (brutus) obsahujúca jednu RING (really interesting new gene) a tri HHE (haemerythrin) domény schopné viazať Fe a Zn (Kobayashi et al. 2013). BTS negatívne reguluje IVc bHLH (basic helix-loop-helix) TF (transkripčné faktory). Štyri TF skupiny IVc bHLH sa podieľajú na signálnej kaskáde homeostázy Fe - bHLH34/104/115 a 105/ILR3(iaa leucine resistant 3) ale len dve z nich (bHLH105 a 115) sú polyubikvitinované BTS a degradované v 26S proteazóme (Selote et al. 2015, Hindt et al. 2017). S BTS interaguje aj rodina malých signálnych peptidov IMA (iron man) ktoré majú BID (BTS interacting domain) doménu na C konci a kompetujú s bHLH105 a bHLH115 (ktoré majú taktiež BID na C konci) o väzbu s BTS. IMA peptidy, ktoré sú ubikvitinované BTS a následne degradované, touto kompetíciou pozitívne ovplyvňujú transkripciu génov zodpovedných za príjem Fe (Grillet et al. 2018, Li et al. 2021). TF skupiny IVc bHLH tvoria medzi sebou rôzne homodiméry a heterodiméry a pozitívne regulujú transkripciu BTS, IMA, PYE (popeye), skupinu Ib bHLH TF (bHLH38/39/100/101) a bHLH121/URI (upstream regulator of IRT1). S bHLH121 tvoria IVc bHLH proteíny heterodiméry a pozitívne regulujú transkripciu FIT (FER-like iron-deficiency-induced transcription factor) (Zhang et al. 2015, Li et al. 2016, Liang et al. 2017, Lei et al. 2020, Li et al. 2021). Aktivácia transkripcie skupiny Ib bHLH skupinou IVc bHLH je inhibovaná proteínom bHLH11. Pri dostatku Fe v živnom médiu bHLH11 tvorí heterodiméry so skupinou IVc bHLH, lokalizuje do jadra a za pomoci svojich dvoch EAR (ethylene response factor-associated amphiphilic repression) motívov regrutuje TPL/TPRs (topless/topless-related) korepresory. (Li et al. 2022). PYE je tiež bHLH TF ktorý tvorí heterodiméry s IVc bHLH proteínmi a negatívne reguluje transkripciu génov Ib bHLH TF, bHLH105, NAS4 (nicotianamine synthetase 4), FRO3 (ferric reduction oxydase 3) a ZIF1 (zinc induced facilitator 1) (Long et al. 2010, Selote et al. 2015, Samira et al. 2018). FIT, ďalší bHLH proteín, tvorí heterodiméry so skupinou Ib bHLH TF a pozitívne reguluje transkripciu rôznych génov zodpovedných za príjem a homeostázu Fe, medzi nimi aj IRT1 a FRO2, ale aj helix-turn-helix TF MYB10/72 (myeloblastosis) a E3 ubikvitín ligázy BTSL1/2 (brutus-like1/2) (Colangelo a Guerinot 2004, Yuan et al. 2008, Wang et al. 2013). MYB10/72 sú vo svojej funkcií zrejme redundantné a pozitívne regulujú transkripciu už zmieneného NAS4 proteínu ale aj proteínov zodpovedných za syntézu kumarínu skopoletínu ktorý mimo jeho funkcie ako chelátora Fe<sup>+3</sup> ovplyvňuje aj mikrobióm v rizosfére rastliny (Palmer et al. 2013, Stringlis et al. 2018).

BTSL1/2 pri navrátení sa do podmienok s dostačujúcim množstvom Fe v médiu zabezpečujú rýchlu ubikvitináciu a následnú degradáciu FIT v koreňovej kôre (cortex), aby sa predišlo nadbytočnej akumulácii Fe v koreni, kým v strednom valci (stele) túto funkciu zastáva BTS (Rodríguez-Celma et al. 2019).

### 2.3.2. Signalizácia v rastlinách so stratégiou II

V ryži je vyššie popísaná kaskáda do veľkej miery konzervovaná, avšak existujú isté rozdiely. Funkcia BTS je v *Oryza sativa* zastupovaná jeho ortológmi HRZ1/2 (haemerythrin motif-containing RING and zinc-finger protein1/2) ktoré majú podobne ako BTS vlastnosť viazať Fe a Zn a E3 ubikvitín ligázovú funkciu, ale na rozdiel od BTS sa javí že HRZ1/2 môže byť samotné degradované v26S proteazóme (Kobayashi et al. 2013). HRZ1 polyubikvitínuje OsPRI(positive regulator of iron deficiency response)1/2/3 a možno aj 4, ortológy IVc bHLH34/104/105/115, ktoré sú následne degradované v 26S proteázome. OsPRI1/2/3 pozitívne regulujú transkripciu OsIRO2/3 (iron-related transcription factor 2/3), ale aj iných génov zodpovedných za príjem a transport Fe ako NAS a YSL gény (Zhang et al. 2017, Zhang et al. 2020). OsIRO2 je ortológ skupiny Ib bHLH38/39/100/101 v *Arabidopsis thaliana*, zatiaľ čo OsIRO3 je ortológ PYE bHLH TF v *Arabidopsis thaliana* a ich funkcia ako pozitívneho regulátora (OsIRO2) resp. negatívneho regulátora (OsIRO3) je podobná ich ortológom (Ogo et al. 2007, Wang et al. 2020). OsbHLH061 je funkčne homologický k AtbHLH11 i keď vykazuje väčšiu zhodu aminokyselín s AtPYE a OsIRO3. OsbHLH061 interaguje s OsPRI1, lokalizuje do jadra kde regrutuje TPL/TPRs korepresory svojou EAR doménou a negatívne reguluje transkripciu OsIRO2/3 (Wang et al. 2022). OsbHLH156 je pravdepodobný ortológ AtFIT TF, pozitívne reguluje transkripciu génov zodpovedných za príjem Fe z pôdy, tvorí heterodiméry s OsIRO2 a lokalizuje ho pri hladovaní na Fe do jadra. Na rozdiel od AtFIT je OsbHLH156 schopný tvoriť homodiméry a jeho nadmerná expresia spôsobuje nadmernú akumuláciu Fe a Zn v rastline (Wang et al. 2020, Liang et al. 2020). Ortológ AtMYB10/72 zatiaľ nebol v ryži identifikovaný. IMA peptidy sú prítomné aj v ryži a sú funkčne homologické s IMA v *Arabidopsis* (Kobayashi et al. 2021). Ryža ale aj iné *Poaceae* disponujú aj ďalšími TF ktoré ovplyvňujú transkripciu génov indukovaných pri hladovaní na Fe. Homológy týchto TF neboli zatiaľ identifikované v *Arabidopsis thaliana*. Jedná sa o TF rodiny ABI3/VP1 (abscisic acid-insensitive protein 3/viviparous 1) IDEF1 (IDE-binding factor 1) a rodiny NAC (no apical meristem) IDEF2 ktoré sa špecificky viažu na IDE1/2 (iron deficiency-responsive cis-acting element 1/2) a sú

exprimované konštitutívne v celej rastline (Kobayashi et al. 2007, Ogo et al. 2008). Činnosť IDEF1 je regulovaná ubikvitináciou a následnou degradáciou v 26S proteázome, ubikvitináciu IDEF1 pozitívne ovplyvňuje CSN6 (COP9 signalosome 6) proteín ktorého expresia je negatívne regulovaná pri nástupe hladovaní na Fe (Tan et al. 2016). IBPs (IDEF1-binding proteins) sa viažu na IDEF1 a zabraňujú jeho degradácii v 26S proteázome, ich expresia je zvýšená pri hladovaní na Fe (Zhang et al. 2013).

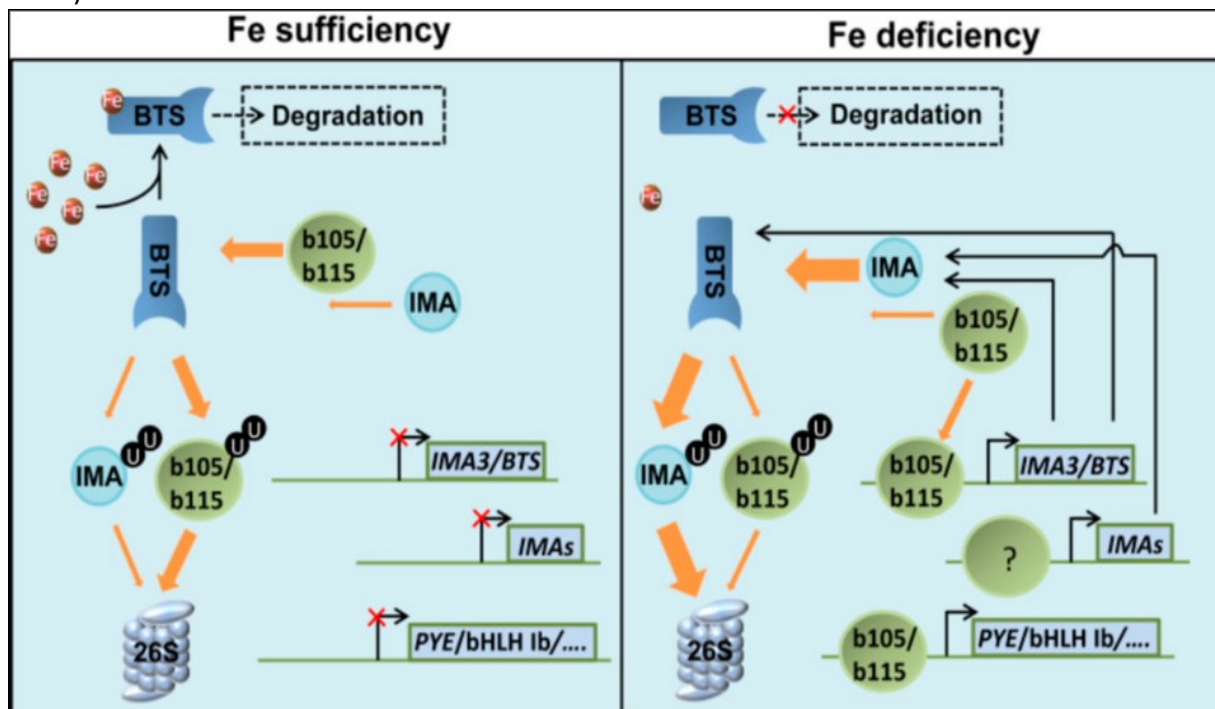


**Obrázok 2:** Zjednodušená schéma signálnej dráhy hladovania na Fe oboch stratégií. Prerušované čiary zobrazujú nepriame regulácie. Medzi „Fe deficiency-inducible genes responsible for Fe uptake and translocation“ patrí najmä IRT1, FRO v *Arabidopsis* a YS/YSL a TOM v ryži. Medzi IVb bHLH TF patrí PYE, URI/bHLH121 a bHLH11. Prevzaté a upravené z review od Kobayashi, 2019. Skratky a príslušnosť jednotlivých bHLH TF k skupinám sú vysvetlené v texte vyššie.

### 2.3.3. Senzory nedostatku Fe

Aby rastlina mohla vyššie popísané dráhy správne regulovať musí mať spôsob monitorovania bunkovej koncentrácie Fe. Ako bolo spomenuté BTS a HRZ proteíny sú schopné viazať Fe a Zn svojimi HHE doménami a preto sú vhodní kandidáti na senzory Fe v bunke (Kobayashi et al. 2013). So zvyšujúcou sa koncentráciou Fe in vitro sa znižuje stabilita BTS čo je v rozpore s predpokladom že BTS je negatívny regulátor odpovede rastliny na hladovanie na Fe (Selote et al. 2015). Tento paradox môže byť vysvetlený funkciou IMA peptidov ktorých expresia a stabilita sa zvyšuje pri nedostatku Fe (Grillet et al. 2018). Li et al. v článku z roku 2021 navrhujú model v ktorom je pri dostatku Fe síce degradovaný BTS ale expresia IMA je

malá a teda BTS dostatočne degraduje bHLH105/115 a pri nedostatku Fe nie je BTS degradovaný ale vysoká hladina IMA zabráni interakcií BTS s bHLH105/115. Tento model pravdepodobne platí aj v ryži kde sa javí že AtIMA a OsIMA sa správajú totožne avšak táto informácia pochádza zo štúdie ktorá ešte nebola podrobená recenznému hodnoteniu (peer review) (Peng et al. 2022). IDEF1 je tiež schopný viazať Fe, Ni, Zn a Cu vďaka regiónu na svojom N konci tvoreného z tandemových opakovaní histidínu a kys. asparágovej ohraničených úsekmi bohatými na prolín, pričom rastliny exprimujúce IDEF1 bez tohto regiónu vykazujú zníženú expresiu IDEF1 ovplyvňovaných génov na začiatku hladovania na Fe (Kobayashi et al. 2012).



**Obrázok 3:** Model vnímania koncentrácie Fe. Naľavo je zobrazená situácia pri dostatočnej koncentracii Fe v rastline kde nie sú transkribované cieľové gény. Na pravej strane obrázku je situácia pri nedostatku Fe v rastline kde sú cieľové gény transkribované. Šírka oranžových šípok zobrazuje kvantitu interakcie (širšia šípka znamená väčšiu kvantitu interakcie) Prevzaté z článku od Li et al., 2021. Skratky sú vysvetlené v texte vyššie.

### 2.3.4. Fytohormóny a iné signálne molekuly ktoré ovplyvňujú transport Fe v rastline

Okrem priameho naviazania Fe alebo iných kovov na senzory je transkripcia génov zodpovedných za homeostázu Fe ovplyvňovaná aj fytohormónmi a inými signálnymi molekulami. Funkcia IDEF1 ako včasného regulátora odpovede na Fe hladovanie je ovplyvňovaná jasmonátmi (JA). Gény zodpovedné za syntézu JA sú exprimované vo veľmi skoréj fáze nedostatku Fe. JA pozitívne regulujú expresiu samotného IDEF1 ale aj IBP proteínov



ktoré inhibujú degradáciu IDEF1, avšak táto indukcia je časovo limitovaná a JA majú skôr negatívny efekt na expresiu génov indukovaných pri nedostatku Fe (Kobayashi et al. 2016). Tento negatívny efekt JA, študovaný na *Arabidopsis thaliana*, spočíva v inhibícii expresie FIT a Ib bHLH TF a súčasnej indukcií transkripcie skupiny IVa bHLH proteínov bHLH18/19/20/25 ktoré tvoria heterodiméry s FIT a tak ho určujú na degradáciu v 26S proteazóme (Cui et al. 2018). Brassinosteroidy tiež negatívne ovplyvňujú odpoveď na Fe hladovanie rastliny zníženou expresiou génov zodpovedných transport Fe v cievnych zväzkoch z koreňa do výhonku v uhorky siatej (*Cucumis sativus*) a v ryži (Wang et al. 2012, Wang et al. 2015). Cytokiníny (CK) negatívne regulujú transkripciu hlavne IRT1, FRO2 a FIT čím negatívne regulujú príjem Fe z pôdy, táto regulácia súvisí aj s vlastnosťou CK inhibovať dlhší rast a teda aj so znížením nárokov rastliny na Fe (Séguéla et al. 2008). Kys. abscisová (ABA), ktorej hladina stúpa pri nedostatku Fe v médiu, naopak pozitívne reguluje odpoveď rastliny na nedostatok Fe a to zvýšením expresie génov zodpovedných za mobilizáciu zásobného Fe vo vakuole a apoplaste a génov podieľajúcich sa na transporte Fe z koreňa do výhonku (Lei et al. 2014). Transkripciu FIT a Ib bHLH TF inhibuje DELLA proteín, kľúčový negatívny regulátor signálnej kaskády gibberelínov (GA). DELLA má dvojitú funkciu v odpovedi rastliny na nedostatok Fe, akumuluje sa v meristémovej a elongačnej zóne koreňa kde spomaľuje rast a jeho množstvo v epidermis diferenciačnej zóny je znížené aby svojou negatívnou reguláciou neznižoval expresiu génov zodpovedných za príjem Fe z pôdy (Wild et al. 2016). Množstvo aktívnych GA, ktoré svojou interakciou s DELLA spôsobujú jeho ubikvitináciu a degradáciu, je v koreni pravdepodobne znížené pri nedostatku Fe (Matsuoka et al. 2014). Fytohormón etylén (ET) je produkovaný vo vyššej miere pri hladovaní na Fe, rovnako ako aj proteíny signálnej kaskády tohto hormónu a svojou činnosťou zvyšuje transkripciu rôznych génov podieľajúcich sa na transporte Fe v rastline ako aj FIT, Ib bHLH TF či MYB72 (García et al. 2010). Proteíny EIN3 (ethylene insensitive 3) a EIL1 (ethylene insensitive3-like 1) sú TF aktivované ET a svojou interakciou s FIT zabraňujú degradácii FIT v 26S proteazóme (Lingam et al. 2011). Ďalší podstatný regulátor odpovede rastliny na nedostatok Fe je oxid dusnatý (NO) ktorého signalizácia pozitívne reguluje transkripciu tej istej množiny génov ako ET a aj génov syntetickej dráhy ET, rovnako ako aj ET pozitívne reguluje syntézu NO (García et al. 2010, García et al. 2011). Upstream od tejto pozitívnej spätnej väzby ET a NO je fytohormón auxín ktorý pozitívne reguluje syntézu NO (Chen et al. 2010). Sacharóza svojou signálnou a nie metabolickou funkciou pozitívne reguluje hladinu auxínu pri nedostatku Fe v rastline, rovnako ako aj kyselina salicylová (SA),

a oxid uhoľnatý (CO), ktorého syntéza je zvýšená pri hladovaní na Fe, sa podieľa na transporte auxínu z nadzemnej časti rastliny do koreňa (Lin et al. 2016, Yang et al. 2016, Shen et al. 2016). Táto vyššie popísaná signálna kaskáda ET, NO, auxínu, sacharózy a CO je inhibovaná rastlinným Fe transportovaným vo floéme, o čom svedčí aj fakt že vonkajšia aplikácia prekursoru NO na rastlinu ktorá nie je obmedzená Fe nemá žiaden účinok na príjem alebo homeostázu Fe v rastline (García et al. 2011). FBP (FIT-binding protein) je proteín ktorého expresia je redukovaná pri vysokej koncentrácii Zn v bunke. Pri hladovaní na Fe rastie v bunke koncentrácia Zn ako dôsledok nešpecifického transportu kovov proteínom IRT1. FBP priamo interaguje s DNA väzobnou doménou FIT a tým zamedzuje transkripciu NAS génov v stele kde je FBP exprimovaný. Zvýšené množstvo NA, syntetizovaného NAS proteínmi, pozitívne ovplyvňuje sekvestráciu prebytočného Zn aj translokáciu Fe z koreňa do výhonku čím pozitívne ovplyvňuje hladinu Fe v nadzemnej časti rastliny pri hladovaní (Chen et al. 2018). Pri dlhšom hladovaní na Fe sa v koreni rastliny hromadí peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) - ROS, ktorý pozitívne reguluje transkripciu proteínu ZAT12 (zinc finger of *Arabidopsis thaliana* 12). ZAT12 interaguje s FIT a negatívne ovplyvňuje jeho funkciu ako hlavného pozitívneho regulátora transkripcie IRT1, FRO2 a ďalších génov, avšak aj zabraňuje degradácii FIT v 26S proteázome (Le et al. 2016).

#### **2.4. Rozdiely a spojitosti oboch stratégií**

Dve stratégie príjmu kovov sa líšia svojou citlivosťou voči pH pôdy. Stratégia I je veľmi citlivá na vyššie pH pôdy zatiaľ čo stratégia II nie (Marschner et al. 1986, review). I keď je vyššie uvedené že *Poaceae* využívajú stratégiu II a teda prijímajú  $Fe^{+3}$ -chelát komplex, *Oryza sativa* využíva ako stratégiu II tak čiastočne aj stratégiu I. V zaplavených ryžových poliach je  $Fe^{+2}$  ľahko dostupné, a teda ryža využíva OsIRT1 a OsIRT2 pre príjem  $Fe^{+2}$  (Ishimaru et al. 2006). Podobne ako ryža aj kukurica (*Zea mays*) pravdepodobne využíva obe stratégie príjmu Fe. Nadmerná expresia ZmIRT1 spôsobila nadmernú akumuláciu Fe v koreni a semenkách rastliny ale viedla k zníženiu koncentrácie Fe v listoch kukurice. Okrem ZmIRT1 boli identifikované aj ďalšie potencionálne homológy génov zo stratégie I, a to homológy FRO,  $H^+$ -ATP-ázy a FIT (Li et al. 2015). Rozdiely v príjme a homeostáze Fe nemusia byť len medzidruhové ale aj medzi jednotlivými odrodami jedného druhu. SNP (single nucleotide polymorphisms) v lokusoch génov zodpovedných za príjem a homeostázu Fe znamenajú odlišný fenotyp odrôd (Miller a Busch 2021, review).

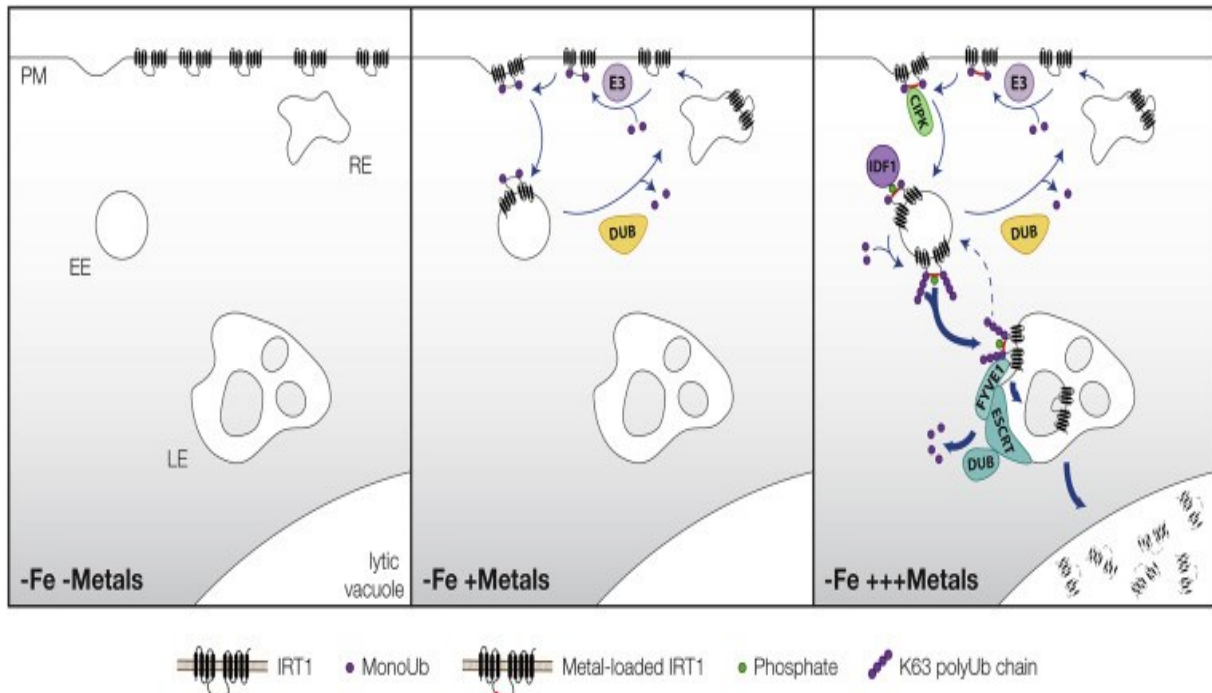
### 3. Intracelulárny transport železa

Po prijíme Fe z pôdy sa bunka musí postarať o bezpečné skladovanie a udržovanie koncentrácie Fe v protoplaste kvôli už spomínanej toxicite Fe a iných kovov ktoré sú do bunky transportované popri Fe. Je dôležité si uvedomiť že v bunke sa Fe a iné kovy vyskytujú v chelátových komplexoch najmä s NA aby sa predišlo tvorbe ROS Fentonovou reakciou. Pomer chelátovaných a voľných kovových iónov je závislý od pH a pri cytosolickom pH je väčšina Fe atómov chelátovaná NA (Hell a Stephan 2003, review).

#### 3.1. Endocytóza IRT1

IRT1 je membránový proteín s deviatimi transmembránovými doménami, medzi transmembránovou doménou č. 4 a č. 5 je väčšia cytosolická slučka na ktorej je okrem iného aj úsek bohatý na aminokyselinu histidín. Tento úsek je zodpovedný za schopnosť IRT1 vnímať prítomnosť kovových iónov ktoré viaže, a to hlavne Zn a Mn (Dubeaux et al. 2018). Po naviazaní mierneho množstva kovov iných ako Fe, teda Zn a Mn, sa na pozície K154 a K179 činnosťou neznámej E3 ubikvitín ligázy naviaže po jednom ubikvitíne. Táto modifikácia IRT1 spôsobí jeho endocytózu klatrínom do TGN/EE (trans-golgi network/early endosome) (Barberon et al. 2011). Po endocytóze sa monoubikvitinovaný IRT1 recykluje naspäť na PM, táto recyklácia je závislá od rodiny proteínov SNX (sorting nexin), hlavne SNX1 ktorého prítomnosť je kľúčová pre naviazanie ďalších SNX na membránu EE (Ivanov et al. 2014). Monoubikvitinovaný IRT1 je pri recyklácii pravdepodobne deubikvitinovaný v EE/TGN deubikvitinázou DUB (deubiquitinating enzyme). Pri vyššej koncentracii kovov ktoré sa viažu na histidínový úsek IRT1 je regrutovaná serín/treonín proteín kináza CIPK23 (CBL-interacting protein kinase 23) ktorá fosforyluje IRT1. Táto fosforylácia je rozoznávaná E3 ubikvitín ligázou IDF1 (IRT1 degradation factor 1), ktorá na už existujúce ubikvitíny pripojuje ďalšie cez pozíciu K63, a tak tvorí polyubikvitínové reťazce na IRT1 (Dubeaux et al. 2018). Tieto reťazce sú rozpoznávané proteínovým komplexom ESCRT (endosomal sorting complex required for transport), ktorý zabezpečuje triedenie a následný transport do LE/MVB (late endosome/multivesicular body), z LE sa vezikly s IRT1 dopravujú do vakuoly kde sú degradované (Dubeaux a Vert, 2017 review). Transport IRT1 z LE do vakuoly a jeho následná degradácia nemusí byť jediná cesta. Barberon et al. v článku z roku 2014 uvažujú nad modelom v ktorom je IRT1 triedený a recyklovaný naspäť na PM ešte v LE za pomoci proteínu ESCRT komplexu FYVE1/FREE1 (FYVE domain protein required for endosomal sorting 1),

ktorého nadmerná expresia spôsobuje hromadenie IRT1 na PM a zároveň narušenie polaritu rozmiestenia IRT1 na PM.



**Obrázok 4:** Modely endocytózy IRT1 v rôznych koncentráciách kovov. Naľavo je situácia v ktorej nie je v rizosfére prítomné Fe ani iné kovy. V strede je situácia kde je v rizosfére prítomná nižšia miera kovov bez prítomnosti Fe. IRT1 je v tejto situácii monoubikvitinované neznámou ligázou (E3), následne endocytované do EE kde je deubikvitinované DUB proteínom a recyklované naspäť na PM skrz RE (recycling endosome). Napravo je situácia v ktorej je prítomná veľká miera kovov bez prítomnosti Fe. Po monoubikvitinácii E3 je regrutovaná kináza CIPK, fosforylácia IRT1 je rozpoznávaná IDF1 ktorý sprostredkuje polyubikvitináciu IRT1 v EE. IRT1 je následne transportované do LE a väčšina je degradovaná vo vakuole. Časť IRT1 môže byť recyklovaná aj z LE čo zobrazuje prerušovaná šípka z LE do EE. Prevzaté z článku od Dubeaux et al., 2018. Skratky sú vysvetlené v texte vyššie.

### 3.2. Vakuola

Vakuola sa podieľa na homeostáze Fe ako zásobná organela. Transport Fe do vakuoly zabezpečuje proteín VIT1 (vacuolar membrane transporter 1), ortológ kvasinkového CCC1 ( $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive cross-complementer 1), a jeho homológy VTL1/2/5 (vacuolar-iron-transporter1-like) (Kim et al. 2006, Gollhofer et al. 2014). Transport z vakuoly pre mobilizovanie zásob Fe a Mn zabezpečujú proteíny NRAMP3/4, ktoré sú redundantné vo svojej funkcií. NRAMP3/4 sú exprimované hlavne v strednom valci koreňa a v cievnych zväzkoch nadzemnej časti rastliny (Thomine et al. 2003, Lanquar et al. 2005).

Vakuola ako zásobáreň Fe je mimoriadne dôležitá pri klíčení semien *Arabidopsis thaliana* skladuje drvivú väčšinu Fe vo vakuole v podobe inklúzií kyseliny fytovej. Dvojitý mutanti

nramp3/4 nemajú ako dospelé rastliny žiadny viditeľný fenotyp, avšak ich rast je zastavený skoro po vyklíčení na pôde s malým obsahom Fe alebo výrazne spomalený na kontrolnej pôde (Lanquar et al. 2005). Komplementácia dvojitého mutantu nramp3/4 je možná aj nadmernou expresiou VIT1 alebo VITL proteínov v materskej rastline kde ukladajú Fe do vakuoly vo zvýšenej miere, čo naznačuje prítomnosť ďalších exportných mechanizmov Fe z vakuoly (Gollhoffer et al. 2014).

### 3.3. Plastidy

Plastidy všeobecne a najmä aktívne fotosyntetizujúce chloroplasty majú vysoký dopyt po Fe keďže Fe figuruje ako kofaktor mnohých proteínov vo fotosystémoch a aj v proteínoch neutralizujúcich ROS. Tento dopyt je vyvážený vysokou zásobou Fe vo fotosynteticky aktívnych chloroplastoch listov. Keďže plastidy ako organely sú produktom endosymbiózy so sinicami, je pravdepodobné že budú mať podobné mechanizmy transportu Fe ako dnešné sinice ktoré využívajú na príjem Fe mechanizmy stratégie I aj stratégie II (Kroh a Pilon 2020, review).

Pre príjem Fe do plastidov v celej rastline slúži proteín PIC1 (permease in chloroplasts 1). Tento proteín je sinicového pôvodu, je konštitutívne exprimovaný a lokalizuje na vnútornú membránu plastidov kde zabezpečuje transport Fe do stroma. Dôležitosť tohto proteínu je demonštrovaná neschopnosťou pic1 mutantov rásť autotroficky aj s vysokou externou zásobou Fe, aj títo mutanti majú veľmi blede zelené listy. (Duy et al. 2007). Pre transport a homeostázu Fe a Mn v plastidoch sú dôležité aj ABC proteíny ABCI10/11/12 (ABC subfamily I), mutanti týchto proteínov vykazujú podobný fenotyp ako pic1 mutanti avšak ich presná molekulárna funkcia zostáva neznáma. Voith von Voithenberg et al. v článku z roku 2019 navrhujú model pre ABCI10 a ABCI12 ktorý má fungovať ako ECF (energy-coupling factor) - ABC komplex transportujúci Fe a Mn známy z baktérií. Ďalší proteín napomáhajúci transportu Fe tentoraz len do chloroplastov mladých listov je FRO7, homológ FRO2 s homologickou funkciou a to redukcia Fe<sup>+3</sup>-chelát komplexu na Fe<sup>+2</sup>. I keď je tento proteín dôležitý pre vývoj mladých chloroplastov, fenotyp fro7 mutantov je zvrátiteľný pridaním externého Fe<sup>+2</sup>, na rozdiel od pic1 mutantov (Jeong et al. 2008). Čo sa týka exportu Fe z plastidov sú možný kandidáti YSL4/6 ktorí môžu fungovať ako exportéri Na-Fe komplexov z plastidu, hlavne počas senescencie listov. Problém s YSL4/6 je jeho nejasná lokalizácia buď na tonoplast, vnútornú membránu plastidov alebo na membránu telies podobných endoplazmatickému retikulu (Mari et al. 2013, Conte et al. 2013). MAR1/FPN3/IREG3 (multiple antibiotic resistance 1/

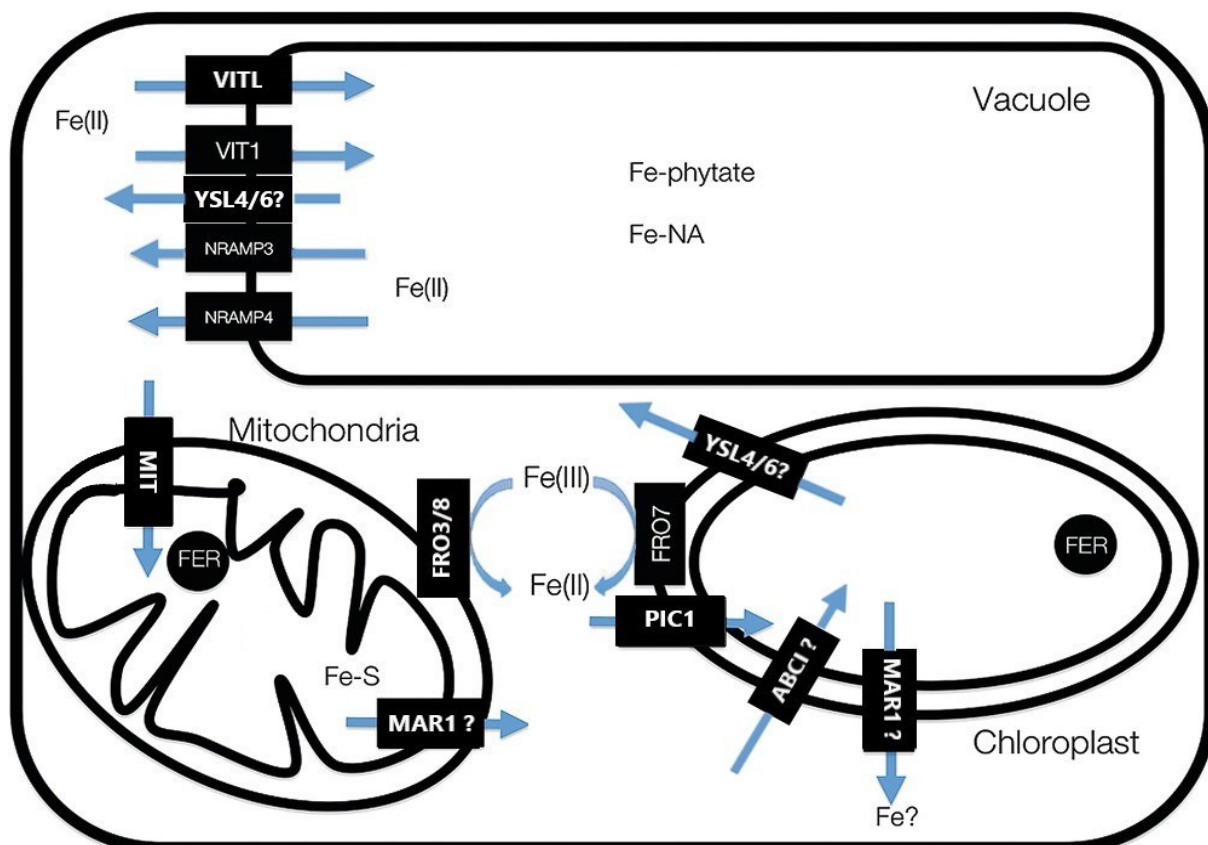
ferroportin 3/ iron-regulated 3) je proteín lokalizovaný na vnútornej plastidovej membráne ktorý transportuje antibiotiká – aminoglykosidy - do stroma (Conte et al. 2009). Táto jeho funkcia je pravdepodobne len oportunistická a primárne slúži na export Fe z chloroplastu alebo aj z mitochondrie. Podobne ako PIC1 je MAR1 exprimovaný v celej rastline ale na rozdiel od PIC1 jeho expresia podlieha regulácií Fe. Expresia MAR1 je v koreni zvýšená pri hladovaní na Fe, pričom v nadzemnej časti rastliny zostáva konštantná bez ohľadu na stav Fe v rastline (Kim et al. 2021).

Feritíny (FER) sú bielkoviny ktoré sú konzervované vo všetkých doménach života a dokážu bezpečne skladovať veľké množstvo Fe. Rozdiely medzi zvieracími a rastlinnými feritínmi sú v štruktúre N a C koncov jednotlivých podjednotiek, ktoré sa skladajú do nativných 24-mérov, ale hlavne v bunkovej lokalizácii. Kým zvieracie feritíny sú cytosolické, rastlinné sú výhradne lokalizované v semiautonómnych organelách (Briat et al. 2010, review). Genóm *Arabidopsis thaliana* kóduje štyri izoformy feritínu a to FER1/2/3/4. Jednotlivé izoformy feritínu sa líšia svojou lokalizáciou v rastline počas jej ontogenézy, FER1 a FER3 sú dominantne transkribované v nadzemnej časti rastliny už v skorej fáze klíčenia, v listoch, v kvetoch a FER1 je jediný transkribovaný v koreni. FER 2 je ako jediný feritín exprimovaný v semienkach rastliny a FER4 je transkribovaný len v kvetoch rastliny s maximom po opelení (Petit et al. 2001). Feritíny v rastlinách fungujú prevažne ako pufre nadmerného množstva Fe a nie ako skladisko Fe. Táto funkcia je podporovaná faktom že fer mutanti vykazujú zvýšenú mieru aktivity ROS neutralizujúcich proteínov a to bez pridania nadmerného množstva Fe do média (Ravet et al. 2009). Vyššie popísaná funkcia feritínu nemusí byť taká v prípade semienok hrachu siateho (*Pisum sativum*), kde sa drvivá väčšina Fe v semienkach skladuje vo feritíne v plastidoch na rozdiel od vakuol ako v *Arabidopsis thaliana* (Lobreaux a Briat 1991).

Keďže chloroplasty sú kľúčové pre život rastliny a vyžadujú ku svojej metabolickej funkcii množstvo Fe ako súčasti kofaktorov proteínov, ale príjem Fe sa odohráva v koreni, je potrebné signalizovať nedostatok Fe v chloroplastoch v listoch do jadra a následne do koreňa, kde sa zvýši transkripcia génov zodpovedných za príjem Fe do rastliny. V tejto retrográdnej signálnej dráhe sa môžu uplatňovať enzýmy a medziprodukty tetrapyrrolevej dráhy alebo Fe-S dráhy (Kroh a Pilon 2020, review).

### 3.4. Mitochondrie

Podobne ako v chloroplastoch aj v mitochondriách je vysoký dopyt pre Fe kvôli jeho funkcií ako kofaktoru proteínov v respiračnom reťazci (Jain a Connolly 2013, review). Import do mitochondrií rastlín zabezpečujú proteíny MIT (mitochondrial iron transporter), ktoré boli najprv popísané v ryži a neskôr v *Arabidopsis thaliana*, ktorá má na rozdiel od ryže dve funkčne redundantné kópie MIT1/2. MITs sú homologické kvasinkovým mitoferitínom MRS3/4 (mitochondrial RNA splicing proteins). Knockout mutanti MITs sú v rastlinách letálny a knockdown mutanti majú problém s rastom, nízky obsah Fe v mitochondriách a zvýšenú koncentráciu kovov ako Zn, Mn a Co v nadzemnej časti rastliny ako známku hladovania na Fe (Bashir et al. 2011, Jain et al. 2019). Podobne ako chloroplasty aj mitochondrie využívajú FRO proteíny, avšak v prípade mitochondrií sa lokalizujú na vnútornú membránu dva FRO homológy FRO3 a FRO8. Presná funkcia týchto proteínov nie je zatiaľ známa avšak vykazujú rozdielnu reguláciu Fe. Kým expresia FRO3 je zvýšená pri hladovaní na Fe, expresia FRO8 nie je regulovaná Fe (Mukherjee et al. 2006). Exportér Fe z mitochondrií rastlín je zatiaľ neznámy, avšak túto úlohu môže spĺňať spomínaný proteín MAR1/FPN3/IREG3 ktorý lokalizuje do vnútornej membrány ako chloroplastov, tak aj mitochondrií (Kim et al. 2021). Feritín ako bol popísaný v kapitole o chloroplastoch sa vyskytuje aj v mitochondriách, avšak len izoforma FER4 ktorá sa nachádza v oboch semiautonómnych organelách (Tarantino et al. 2010).



**Obrázok 5:** Vnútrobnkové transportéri železa. Šípky znázorňujú smer transportu alebo redukciu Fe pri FRO proteínoch. FRO gény pravdepodobne lokalizujú do vnútorných membrán semiautónomných organel ale pre lepšie zobrazenie sú na obrázku vo vonkajšej membráne. Otázniky znázorňujú neistotu pri presnej lokalizácii, smere transportu alebo podobe transportovaného substrátu. Prevzaté a upravené z review od Morrissey a Guerinot, 2009. Skratky a činnosť aktérov je vysvetlená vyššie.



## 4. Transport Fe vodivými pletivami

Po príjme koreňom sa musí Fe dopraviť do nadzemnej časti rastliny kde sú najmä mladé listy najväčším spotrebiteľom. Túto úlohu samozrejme spĺňajú vodivé pletivá rastliny, avšak xylém je prvý kanál ktorý je napĺňaný Fe získaným koreňovým systémom (Conte a Walker 2011, review). Floém hrá tiež dôležitú úlohu v transporte Fe a pri signalizácii nedostatku Fe v listoch koreňu, čím spúšťa signálnu kaskádu v koreni vrcholiacu transkripciou génov zodpovedných za príjem Fe z pôdy (Kobayashi et al. 2019, review).

Na transporte Fe v cievnych zväzkoch sa podieľa aj IRT1. V nedávnej štúdií bolo ukázané že *irt1* mutanti stále akumulujú koncentrácie Fe v koreni porovnateľné s wild type (WT) rastlinami, pričom koncentrácie Fe v nadzemnej časti rastliny boli v *irt1* mutantovi nižšie ako vo WT. Fenotyp *irt1* mutantov bol prekvapivo komplementovaný aj expresiou upraveného IRT1 proteínu ktorý nemal schopnosť transportovať Fe cez membránu. Autori sa zamýšľajú nad ďalšou funkciou IRT1 v radiálnom transporte Fe z koreňovej kôry do stredného valca, kde by IRT1 slúžil ako interakčný partner neznámeho proteínu (Quintana et al. 2022). Navyše ako bolo spomenuté v kapitole o endocytóze IRT1, narušenie polarizácie rozmiestnenia IRT1 nadmernou expresiou FYVE1/FREE1 narušuje radiálny transport Fe a tieto rastliny sú oproti WT viac citlivé na nedostatok Fe v médiu (Barberon et al. 2014). Ako bolo spomenuté v kapitole o signalizácii fytohormónov, nedostatok Fe zapríčiňuje v rastline produkciu etylénu. Etylén svojou signalizačnou činnosťou zapríčiňuje výraznú inhibíciu akumulácie suberínu, čím narúša apoplastickú bariéru v endodermis a uľahčuje radiálny transport Fe apoplastom do vodivých pletív (Barberon et al. 2016).

### 4.1. Xylém

V xyléme je drvivá väčšina Fe v chelátovom komplexe s kyselinou citrónovou (i keď v xyléme sa vyskytuje aj NA ktorá skôr chelátuje iné kovy ako napríklad Cu) ktorá je do xylému transportovaná proteínom FRD3 (ferric reductase defective 3) v *Arabidopsis thaliana* a jeho homológom FRDL1 (FRD3 like 1) v ryži (White et al. 1981, Durrett et al. 2007, Yokosho et al. 2009, Irtelli et al. 2009, Rellán-Alvarez et al. 2010). FRD3 aj FRDL1 sú exprimované v pericykli a v bunkách v okolí xylému (Green a Rogers 2004, Yokosho et al. 2009). Nakladanie xylému samotným Fe má pravdepodobne za úlohu proteín FPN1 (ferroportin 1) lokalizovaný na PM buniek stele (Morrissey et al. 2009). Vhodný kandidát na export zo xylému je YSL2. YSL2 je proteín na PM buniek v okolí vodivých pletív a v nižšej miere u buniek mimo nich. Jeho

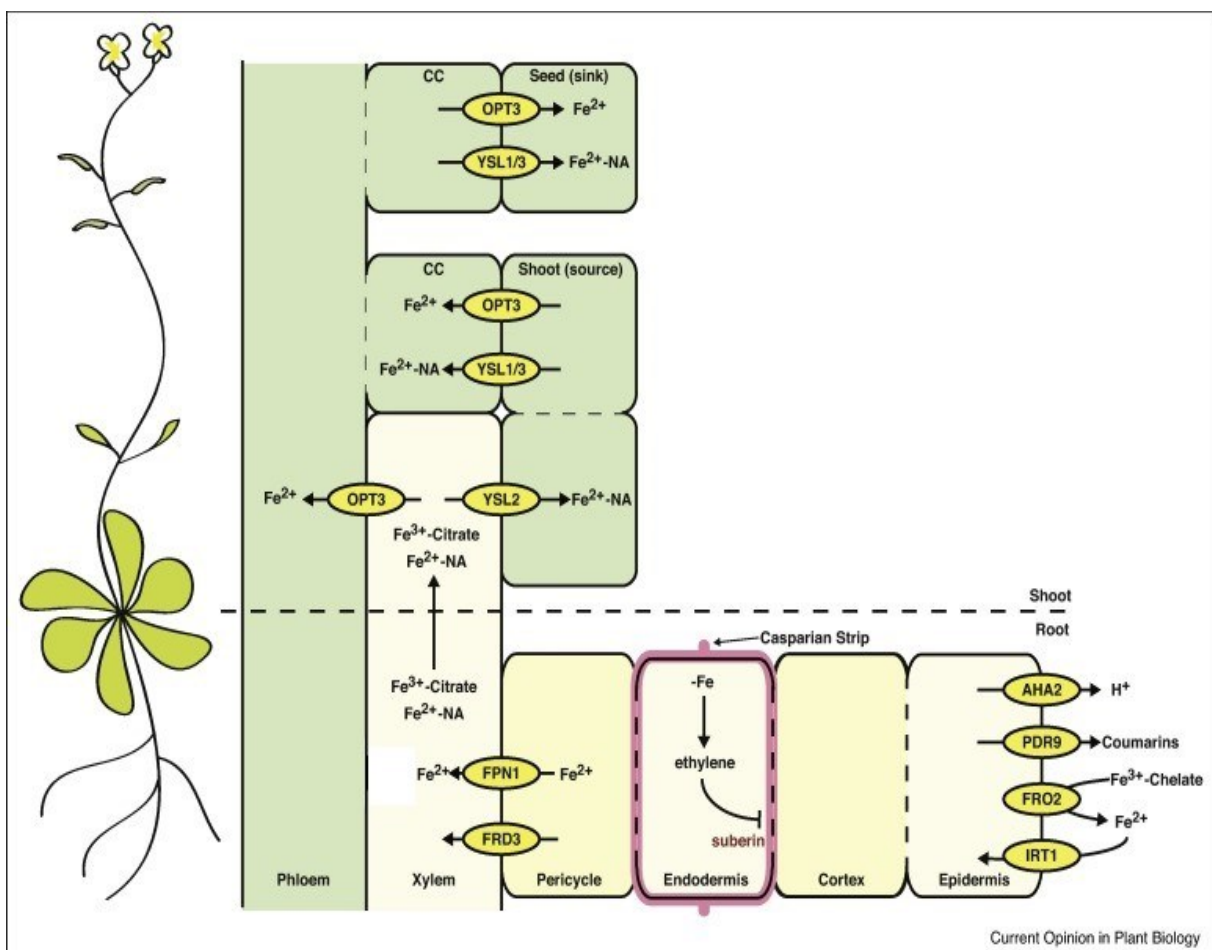
expresia je ovplyvnená Fe, a to tak že pri hladovaní naň sa znižuje. YSL2 nie je jediný transportér Fe z vodivých pletív do buniek keďže ysl2 mutant vykazuje fenotyp identický s WT (DiDonato et al. 2004).

## 4.2. Floém

Na rozdiel od xylému sú Fe a iné kovy ako Zn alebo Cu vo floéme chelátované NA, poprípade DMA v rastlinách so stratégiou II, i keď malá časť Fe môže byť aj vo floéme chelátovaná kys. citrónovou ako v xyléme (Schmidke et al. 1999, Nishiyama et al. 2012). Dôležitosť NA v transporte Fe vo floéme je ilustrovaná vo štvoritom mutantovi nas4x ktorý nedokáže syntetizovať NA. Tieto rastliny vykazujú chlorózu žiliek v mladých listoch, sú neplodné a vykazujú známky hladovania na Fe i keď rastú na dostatočnom množstve Fe. Fe sa však v týchto mutantoch akumuluje vo vodivých pletivách listov, čo naznačuje že NA je viac dôležité pre export z vodivých pletív do spotrebiteľských orgánov. Rovnako zaujímavé je, že chloróza postihuje len mladé listy, a tak transport Fe do starších pletív je pravdepodobne dostačujúci xylémom (Schuler et al. 2012). Nakladanie floému Fe zabezpečuje proteín OPT3 (oligopeptide transporter 3) ktorý, napriek názvu, transportuje samotné rozpustené ióny Fe. OPT3 je exprimovaný v malých žilkách listov a v uzloch stonky, avšak nie v koreni. OPT3 nakladá floém z apoplastu ale aj zo xylému, čo podporuje fakt že opt3 mutanti majú zníženú koncentráciu Fe vo floéme ale zvýšenú v xyléme. Mutant opt3 demonštruje aj fakt, že pre prenos signálu nedostatku Fe z nadzemnej časti rastliny do koreňa je potrebný floém. Títo mutanti podobne ako nas4x mutanti exprimujú gény ako IRT1 a FRO2 i keď je Fe v médiu dostatok, avšak na rozdiel od nas4x mutantov externá zásoba Fe tento fenotyp nezvráti. Opt3 mutanti navyše akumulujú zvýšenú koncentráciu toxického Cd a zníženú koncentráciu Fe v semenách. (Zhai et al. 2014). Kandidáti na transport Fe z floému sú YSL1/3. Dvojité mutanti ysl1ysl3 vykazujú chlorózu žiliek listov, problém s fertilitou, problém s mobilizáciou Fe zo senescentných listov, zníženú koncentráciu Fe v listoch, zvýšenú koncentráciu iných kovov ako Fe v listoch a problém s prenosom signálu hladovania na Fe z listov do koreňa. Podobne ako aj iné YSL proteíny v rastlinnej bunke YSL1/3 transportujú Fe-NA cheláty cez plazmatickú membránu. Ich lokalizácia do parenchýmu v okolí vodivých pletív listov a zvrátenie mutantného fenotypu externým pridaním Fe na listy naznačuje ich funkciu ako transportérov Fe z vodivých pletív do buniek. Ich zvýšená expresia v senescentných listoch naopak naznačuje

ich funkciu ako transportérov zo starnúceho pletiva skrz floém do novších pletív. (Waters et al. 2006).

Pre správnu signalizáciu nedostatku Fe z listov do koreňa je potrebný jak OPT3 tak YSL1/3, signálne peptidy IMA, a NA resp. NAS gény. Pri hladovaní na Fe je expresia OPT3 výrazne zvýšená v listoch, kým expresia YSL1/3 je znížená (Waters et al. 2006, Stacey et al. 2008). Autori Kumar et al. v článku z roku 2017 preto navrhujú model signalizácie hladovania na Fe v ktorom sa pri dostatku Fe exprimujú YSL1/3 vo vyššej miere a Fe je dopravované do potrebných pletív. Pri hladovaní sa expresia YSL1/3 utlmí a expresia OPT3 naopak zvýši čo zapríčiní nedostatok Fe vo fotosyntetických pletivách a spustí sa signalizácia nedostatku Fe do koreňa. Funkcia IMA peptidov v signalizácii z listov do koreňa vyplýva zo zvýšenej expresie IMA v listoch, koreňoch a bunkách floému pri hladovaní na Fe a štepových experimentoch na *Arabidopsis thaliana* a ryži (Grillet et al. 2018, Kobayashi et al. 2021).



**Obrázok 6:** Transport železa z koreňa do nadzemnej časti rastliny. Na obrázku je znázornený nielen transport v cievnych zväzkoch ale aj príjem Fe stratégie I a radiálny transport Fe k stele v koreni. Bunka v nadzemnej časti označená ako Source sú staršie listy a Sink sú semenka aj mladé listy. Prevzaté a upravené z review od Jeong et al., 2017. Skratky a činnosť aktérov je vysvetlená vyššie.

## 5. Záver

V tejto práci boli popísané dva hlavné mechanizmy akými sa dopravuje Fe z pôdy do tiel rastlín, ktoré sú pomerne dobre známe i keď všetky funkcie proteínov ako napr. IRT1 sú stále otázkou výskumu. V nedávnej dobe bol spravený veľký pokrok v odhaľovaní jednotlivých aktérov signálnej kaskády nedostatku Fe a ich vzájomnej interakcií. S identifikáciou signálnych peptidov IMA sa poznatky o zdroji signálu hladovania na Fe a modely vnímania koncentrácie Fe posunuli dopredu, napriek tomu presný mechanizmus vnímania koncentrácie Fe v bunke je stále neznámy. Mimoriadne málo informácií je o skladovaní Fe v semenách rastlín. Autori článku z roku 2005 Lanquar et al., o NRAMP3/4 ako vakuolárnych exportérov Fe dôležitých pri klíčení semien, priniesli teóriu že jednotlivé druhy rastlín môžu mať rôzne skladiská Fe v semenách ako napríklad hrach vo feritíne v plastidoch. Avšak odvtedy sa táto teória neskúmala a stále nie je známe skladisko a tým pádom podoba skladovaného Fe v semenách rastlín významných pre výživu a poľnohospodárstvo. Rovnako tak aj homeostáza Fe v bunke na úrovni organel je neznáma s problematickým určením transportérov Fe z organel do cytoplazmy a mechanizmu veziklového exportu Fe z bunky do apoplastu. V budúcnosti bude zaujímavé zistiť presnú rolu IRT1 v radiálnom transporte Fe v koreni, ako aj model signálnej kaskády nedostatku Fe a jej začiatok vnímaním bunkovej koncentrácie Fe.

## 6. Použitá literatura

Literatúra označená \* je review.

Barberon M, Dubeaux G, Kolb C, Isono E, Zelazny E, Vert G. Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(22):8293-8298. doi:10.1073/pnas.1402262111

Barberon M, Vermeer JE, De Bellis D, et al. Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell*. 2016;164(3):447-459. doi:10.1016/j.cell.2015.12.021

Barberon M, Zelazny E, Robert S, et al. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(32):E450-E458. doi:10.1073/pnas.1100659108

Bashir K, Ishimaru Y, Shimo H, et al. The rice mitochondrial iron transporter is essential for plant growth. *Nat Commun*. 2011;2:322. doi:10.1038/ncomms1326

Briat JF, Duc C, Ravet K, Gaymard F. Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1800(8):806-814. doi:10.1016/j.bbagen.2009.12.003 \*

C. Curie, Z. Panaviene, C. Loulergue, S.L. Dellaporta, J.-F. Briat, E.L. Walker, Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe (III) uptake, *Nature* 409 (6818) (2001) 346–349.

Castaings, L., Caquot, A., Loubet, S. et al. The high-affinity metal Transporters NRAMP1 and IRT1 Team up to Take up Iron under Sufficient Metal Provision. *Sci Rep* 6, 37222 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep37222>

Connolly, E.L., Guerinot, M.L. Iron stress in plants. *Genome Biol* 3, reviews1024.1 (2002). <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-8-reviews1024> \*

Conte S, Stevenson D, Furner I, Lloyd A. Multiple antibiotic resistance in Arabidopsis is conferred by mutations in a chloroplast-localized transport protein. *Plant Physiol*. 2009;151(2):559-573. doi:10.1104/pp.109.143487

Conte SS, Chu HH, Rodriguez DC, et al. Arabidopsis thaliana Yellow Stripe1-Like4 and Yellow Stripe1-Like6 localize to internal cellular membranes and are involved in metal ion homeostasis. *Front Plant Sci*. 2013;4:283. Published 2013 Jul 26. doi:10.3389/fpls.2013.00283

Conte SS, Walker EL. Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Mol Plant*. 2011;4(3):464-476. doi:10.1093/mp/ssr015 \*

Cui Y, Chen CL, Cui M, Zhou WJ, Wu HL, Ling HQ. Four IVa bHLH Transcription Factors Are Novel Interactors of FIT and Mediate JA Inhibition of Iron Uptake in Arabidopsis. *Mol Plant*. 2018;11(9):1166-1183. doi:10.1016/j.molp.2018.06.005

DiDonato RJ Jr, Roberts LA, Sanderson T, Eisley RB, Walker EL. Arabidopsis Yellow Stripe-Like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes. *Plant J*. 2004;39(3):403-414. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02128.x

Dubeaux G, Neveu J, Zelazny E, Vert G. Metal Sensing by the IRT1 Transporter-Receptor Orchestrates Its Own Degradation and Plant Metal Nutrition. *Mol Cell*. 2018;69(6):953-964.e5. doi:10.1016/j.molcel.2018.02.009

Dubeaux G, Vert G. Zooming into plant ubiquitin-mediated endocytosis. *Curr Opin Plant Biol*. 2017;40:56-62. doi:10.1016/j.pbi.2017.07.005 \*

Durrett TP, Gassmann W, Rogers EE. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol*. 2007;144(1):197-205. doi:10.1104/pp.107.097162

Duy D, Wanner G, Meda AR, von Wirén N, Soll J, Philippar K. PIC1, an ancient permease in Arabidopsis chloroplasts, mediates iron transport. *Plant Cell*. 2007;19(3):986-1006. doi:10.1105/tpc.106.047407

Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinot ML. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(11):5624-5628. doi:10.1073/pnas.93.11.5624

Elizabeth P. Colangelo, Mary Lou Guerinot, The Essential Basic Helix-Loop-Helix Protein FIT1 Is Required for the Iron Deficiency Response, *The Plant Cell*, Volume 16, Issue 12, December 2004, Pages 3400–3412, <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024315>

Fourcroy P, Sisó-Terraza P, Sudre D, et al. Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency. *New Phytol*. 2014;201(1):155-167. doi:10.1111/nph.12471

García MJ, Lucena C, Romera FJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R. Ethylene and nitric oxide involvement in the up-regulation of key genes related to iron acquisition and homeostasis in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 2010;61(14):3885-3899. doi:10.1093/jxb/erq203

García MJ, Suárez V, Romera FJ, Alcántara E, Pérez-Vicente R. A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants. *Plant Physiol Biochem.* 2011;49(5):537-544. doi:10.1016/j.plaphy.2011.01.019

Gollhofer J, Timofeev R, Lan P, Schmidt W, Buckhout TJ. Vacuolar-Iron-Transporter1-Like proteins mediate iron homeostasis in Arabidopsis. *PLoS One.* 2014;9(10):e110468. Published 2014 Oct 31. doi:10.1371/journal.pone.0110468

Green LS, Rogers EE. FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2004;136(1):2523-2531. doi:10.1104/pp.104.045633

Grégory Vert, Natasha Grotz, Fabienne Dédaldéchamp, Frédéric Gaymard, Mary Lou Guerinot, Jean-François Briat, Catherine Curie, IRT1, an Arabidopsis Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and for Plant Growth , *The Plant Cell*, Volume 14, Issue 6, June 2002, Pages 1223–1233, <https://doi.org/10.1105/tpc.001388>

Grillet L, Lan P, Li W, Mokkaapati G, Schmidt W. IRON MAN is a ubiquitous family of peptides that control iron transport in plants. *Nat Plants.* 2018;4(11):953-963. doi:10.1038/s41477-018-0266-y

Guosheng Liu, David L. Greenshields, Ramaswami Sammynaiken, Rozina N. Hirji, Gopalan Selvaraj, Yangdou Wei; Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses. *J Cell Sci* 15 February 2007; 120 (4): 596–605. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.001362>

H. Marschner, V. Römheld & M. Kissel (1986) Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron, *Journal of Plant Nutrition*, 9:3-7, 695-713, DOI: 10.1080/01904168609363475 \*

Hell R, Stephan UW. Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta.* 2003;216(4):541-551. doi:10.1007/s00425-002-0920-4 \*

Hindt MN, Akmakjian GZ, Pivarski KL, et al. BRUTUS and its paralogs, BTS LIKE1 and BTS LIKE2, encode important negative regulators of the iron deficiency response in Arabidopsis thaliana. *Metallomics.* 2017;9(7):876-890. doi:10.1039/c7mt00152e

Chen CL, Cui Y, Cui M, Zhou WJ, Wu HL, Ling HQ. A FIT-binding protein is involved in modulating iron and zinc homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 2018;41(7):1698-1714. doi:10.1111/pce.13321

Chen WW, Yang JL, Qin C, et al. Nitric oxide acts downstream of auxin to trigger root ferric-chelate reductase activity in response to iron deficiency in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2010;154(2):810-819. doi:10.1104/pp.110.161109

Irtelli B, Petrucci WA, Navari-Izzo F. Nicotianamine and histidine/proline are, respectively, the most important copper chelators in xylem sap of Brassica carinata under conditions of copper deficiency and excess. *J Exp Bot.* 2009;60(1):269-277. doi:10.1093/jxb/ern286

Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsubashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K. (2006), Rice plants take up iron as an Fe<sup>3+</sup>-phytosiderophore and as Fe<sup>2+</sup>. *The Plant Journal*, 45: 335-346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02624.x>

Ivanov R, Brumbarova T, Blum A, Jantke AM, Fink-Straube C, Bauer P. SORTING NEXIN1 is required for modulating the trafficking and stability of the Arabidopsis IRON-REGULATED TRANSPORTER1. *Plant Cell.* 2014;26(3):1294-1307. doi:10.1105/tpc.113.116244

Jain A, Connolly EL. Mitochondrial iron transport and homeostasis in plants. *Front Plant Sci.* 2013;4:348. Published 2013 Sep 6. doi:10.3389/fpls.2013.00348 \*

Jain A, Dashner ZS, Connolly EL. Mitochondrial Iron Transporters (MIT1 and MIT2) Are Essential for Iron Homeostasis and Embryogenesis in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci.* 2019;10:1449. Published 2019 Nov 25. doi:10.3389/fpls.2019.01449

Jeong J, Cohu C, Kerkeb L, Pilon M, Connolly EL, Guerinot ML. Chloroplast Fe(III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10619-10624. doi:10.1073/pnas.0708367105

Jeong J, Merkovich A, Clyne M, Connolly EL. Directing iron transport in dicots: regulation of iron acquisition and translocation. *Curr Opin Plant Biol.* 2017;39:106-113. doi:10.1016/j.pbi.2017.06.014 \*

K. Higuchi, K. Suzuki, H. Nakanishi, H. Yamaguchi, N.-K. Nishizawa, S. Mori, Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores, *Plant Physiol.* 119 (2) (1999) 471–480.



Kim LJ, Tsuyuki KM, Hu F, et al. Ferroportin 3 is a dual-targeted mitochondrial/chloroplast iron exporter necessary for iron homeostasis in Arabidopsis. *Plant J.* 2021;107(1):215-236. doi:10.1111/tpj.15286

Kim SA, Punshon T, Lanzirotti A, et al. Localization of iron in Arabidopsis seed requires the vacuolar membrane transporter VIT1. *Science.* 2006;314(5803):1295-1298. doi:10.1126/science.1132563

Kobayashi T, Itai RN, Aung MS, Senoura T, Nakanishi H, Nishizawa NK. The rice transcription factor IDEF1 directly binds to iron and other divalent metals for sensing cellular iron status. *Plant J.* 2012;69(1):81-91. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04772.x

Kobayashi T, Itai RN, Senoura T, et al. Jasmonate signaling is activated in the very early stages of iron deficiency responses in rice roots. *Plant Mol Biol.* 2016;91(4-5):533-547. doi:10.1007/s11103-016-0486-3

Kobayashi T, Nagano AJ, Nishizawa NK. Iron deficiency-inducible peptide-coding genes OsIMA1 and OsIMA2 positively regulate a major pathway of iron uptake and translocation in rice. *J Exp Bot.* 2021;72(6):2196-2211. doi:10.1093/jxb/eraa546

Kobayashi T, Nagasaka S, Senoura T, Itai RN, Nakanishi H, Nishizawa NK. Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat Commun.* 2013;4:2792. doi:10.1038/ncomms3792

Kobayashi T, Nozoye T, Nishizawa NK. Iron transport and its regulation in plants. *Free Radic Biol Med.* 2019;133:11-20. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.439 \*

Kobayashi T, Ogo Y, Itai RN, et al. The transcription factor IDEF1 regulates the response to and tolerance of iron deficiency in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(48):19150-19155. doi:10.1073/pnas.0707010104

Kobayashi T. Understanding the Complexity of Iron Sensing and Signaling Cascades in Plants [published correction appears in *Plant Cell Physiol.* 2019 Jun 1;60(6):1400]. *Plant Cell Physiol.* 2019;60(7):1440-1446. doi:10.1093/pcp/pcz038 \*

Kroh GE, Pilon M. Regulation of Iron Homeostasis and Use in Chloroplasts. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9):3395. Published 2020 May 11. doi:10.3390/ijms21093395\*

Kumar RK, Chu HH, Abundis C, et al. Iron-Nicotianamine Transporters Are Required for Proper Long Distance Iron Signaling. *Plant Physiol.* 2017;175(3):1254-1268. doi:10.1104/pp.17.00821

Lanquar V, Lelièvre F, Bolte S, et al. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *EMBO J.* 2005;24(23):4041-4051. doi:10.1038/sj.emboj.7600864

Le CT, Brumbarova T, Ivanov R, et al. ZINC FINGER OF ARABIDOPSIS THALIANA12 (ZAT12) Interacts with FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT) Linking Iron Deficiency and Oxidative Stress Responses. *Plant Physiol.* 2016;170(1):540-557. doi:10.1104/pp.15.01589

Lee S, Chiecko JC, Kim SA, et al. Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant Physiol.* 2009;150(2):786-800. doi:10.1104/pp.109.135418

Lei GJ, Zhu XF, Wang ZW, Dong F, Dong NY, Zheng SJ. Abscisic acid alleviates iron deficiency by promoting root iron reutilization and transport from root to shoot in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* 2014;37(4):852-863. doi:10.1111/pce.1220

Lei R, Li Y, Cai Y, et al. bHLH121 Functions as a Direct Link that Facilitates the Activation of FIT by bHLH IVc Transcription Factors for Maintaining Fe Homeostasis in Arabidopsis. *Mol Plant.* 2020;13(4):634-649. doi:10.1016/j.molp.2020.01.006

Li S, Zhou X, Li H, et al. Overexpression of ZmIRT1 and ZmZIP3 Enhances Iron and Zinc Accumulation in Transgenic Arabidopsis. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136647. Published 2015 Aug 28. doi:10.1371/journal.pone.0136647

Li X, Zhang H, Ai Q, Liang G, Yu D. Two bHLH Transcription Factors, bHLH34 and bHLH104, Regulate Iron Homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 2016;170(4):2478-2493. doi:10.1104/pp.15.01827

Li Y, Lu CK, Li CY, et al. IRON MAN interacts with BRUTUS to maintain iron homeostasis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118(39):e2109063118. doi:10.1073/pnas.2109063118

Liang G, Zhang H, Li X, Ai Q, Yu D. bHLH transcription factor bHLH115 regulates iron homeostasis in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot.* 2017;68(7):1743-1755. doi:10.1093/jxb/erx043

Liang G, Zhang H, Li Y, et al. Oryza sativa FER-LIKE FE DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (OsFIT/OsbHLH156) interacts with OsIRO2 to regulate iron homeostasis. *J Integr Plant Biol.* 2020;62(5):668-689. doi:10.1111/jipb.12933

Lin XY, Ye YQ, Fan SK, Jin CW, Zheng SJ. Increased Sucrose Accumulation Regulates Iron-Deficiency Responses by Promoting Auxin Signaling in Arabidopsis Plants. *Plant Physiol.* 2016;170(2):907-920. doi:10.1104/pp.15.01598

Lingam S, Mohrbacher J, Brumbarova T, et al. Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2011;23(5):1815-1829. doi:10.1105/tpc.111.084715

Lobreaux S, Briat JF. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. *Biochem J.* 1991;274 ( Pt 2)(Pt 2):601-606. doi:10.1042/bj2740601

Long TA, Tsukagoshi H, Busch W, Lahner B, Salt DE, Benfey PN. The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots. *Plant Cell.* 2010;22(7):2219-2236. doi:10.1105/tpc.110.074096

Mahender A, Swamy BPM, Anandan A, Ali J. Tolerance of Iron-Deficient and -Toxic Soil Conditions in Rice. *Plants.* 2019; 8(2):31. <https://doi.org/10.3390/plants8020031> \*

Mari S, Curie C. The Arabidopsis YELLOW STRIPE LIKE4 and 6 transporters control iron release from the chloroplast. *Plant Cell.* 2013;25(3):1040-1055. doi:10.1105/tpc.112.107672

Matsuoka K, Furukawa J, Bidadhi H, Asahina M, Yamaguchi S, Satoh S. Gibberellin-induced expression of Fe uptake-related genes in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 2014;55(1):87-98. doi:10.1093/pcp/pct160

Miller CN, Busch W. Using natural variation to understand plant responses to iron availability. *J Exp Bot.* 2021;72(6):2154-2164. doi:10.1093/jxb/erab012 \*

Morrissey J, Baxter IR, Lee J, et al. The ferroportin metal efflux proteins function in iron and cobalt homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2009;21(10):3326-3338. doi:10.1105/tpc.109.069401

Morrissey J, Guerinot ML. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chem Rev.* 2009;109(10):4553-4567. doi:10.1021/cr900112r \*

Mukherjee I, Campbell NH, Ash JS, Connolly EL. Expression profiling of the Arabidopsis ferric chelate reductase (FRO) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta.* 2006;223(6):1178-1190. doi:10.1007/s00425-005-0165-0

Murata Y, Ma JF, Yamaji N, Ueno D, Nomoto K, Iwashita T. A specific transporter for iron(III)-phytosiderophore in barley roots [published correction appears in Plant J. 2010 Jan;61(1):188]. Plant J. 2006;46(4):563-572. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02714.x

Nishiyama R, Kato M, Nagata S, Yanagisawa S, Yoneyama T. Identification of Zn-nicotianamine and Fe-2'-Deoxymugineic acid in the phloem sap from rice plants (*Oryza sativa* L.). Plant Cell Physiol. 2012;53(2):381-390. doi:10.1093/pcp/pcr188

Nozoye T, Nagasaka S, Kobayashi T, et al. Phytosiderophore efflux transporters are crucial for iron acquisition in graminaceous plants. J Biol Chem. 2011;286(7):5446-5454. doi:10.1074/jbc.M110.180026

Ogo Y, Itai RN, Nakanishi H, et al. The rice bHLH protein OsIRO2 is an essential regulator of the genes involved in Fe uptake under Fe-deficient conditions. Plant J. 2007;51(3):366-377. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03149.x

Ogo Y, Kobayashi T, Nakanishi Itai R, et al. A novel NAC transcription factor, IDEF2, that recognizes the iron deficiency-responsive element 2 regulates the genes involved in iron homeostasis in plants. J Biol Chem. 2008;283(19):13407-13417. doi:10.1074/jbc.M708732200

Palmer CM, Hindt MN, Schmidt H, Clemens S, Guerinot ML. MYB10 and MYB72 are required for growth under iron-limiting conditions. PLoS Genet. 2013;9(11):e1003953. doi:10.1371/journal.pgen.1003953

Peng F, Li C, Lu C, Li Y, Xu P, Liang G. IRONMAN interacts with OsHRZ1 and OsHRZ2 to maintain Fe homeostasis. Published online March 12, 2022. doi:10.1101/2022.03.11.483574

Petit JM, Briat JF, Lobréaux S. Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. Biochem J. 2001;359(Pt 3):575-582. doi:10.1042/0264-6021:3590575

Quintana J, Bernal M, Scholle M, et al. Root-to-shoot iron partitioning in *Arabidopsis* requires IRON-REGULATED TRANSPORTER1 (IRT1) protein but not its iron(II) transport function. Plant J. 2022;109(4):992-1013. doi:10.1111/tpj.15611

Ravet K, Touraine B, Boucherez J, Briat JF, Gaymard F, Cellier F. Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. Plant J. 2009;57(3):400-412. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03698.x

Rellán-Alvarez R, Giner-Martínez-Sierra J, Orduna J, et al. Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant Cell Physiol.* 2010;51(1):91-102. doi:10.1093/pcp/pcp170

Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature.* 1999;397(6721):694-697. doi:10.1038/17800

Rodríguez-Celma J, Connorton JM, Kruse I, et al. Arabidopsis BRUTUS-LIKE E3 ligases negatively regulate iron uptake by targeting transcription factor FIT for recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(35):17584-17591. doi:10.1073/pnas.1907971116

S. Takagi, K. Nomoto, T. Takemoto, Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants, *J. Plant Nutr.* 7 (1–5) (1984) 469–477.

Samira R, Li B, Kliebenstein D, et al. The bHLH transcription factor ILR3 modulates multiple stress responses in Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 2018;97(4-5):297-309. doi:10.1007/s11103-018-0735-8

Santi, S. and Schmidt, W. (2009), Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots. *New Phytologist*, 183: 1072-1084. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02908.x>

Séguéla M, Briat JF, Vert G, Curie C. Cytokinins negatively regulate the root iron uptake machinery in Arabidopsis through a growth-dependent pathway. *Plant J.* 2008;55(2):289-300. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03502.x

Selote D, Samira R, Matthiadis A, Gillikin JW, Long TA. Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Physiol.* 2015;167(1):273-286. doi:10.1104/pp.114.250837

Shen C, Yang Y, Liu K, et al. Involvement of endogenous salicylic acid in iron-deficiency responses in Arabidopsis. *J Exp Bot.* 2016;67(14):4179-4193. doi:10.1093/jxb/erw196

Schaaf G, Ludewig U, Erenoglu BE, Mori S, Kitahara T, von Wirén N. ZmYS1 functions as a proton-coupled symporter for phytosiderophore- and nicotianamine-chelated metals. *J Biol Chem.* 2004;279(10):9091-9096. doi:10.1074/jbc.M311799200

Schmidke, I., Krüger, C., Frömmichen, R., Scholz, G. and Stephan, U., 1999. Phloem loading and transport characteristics of iron in interaction with plant-endogenous ligands in castor bean seedlings. *Physiologia Plantarum*, 106(1), pp.82-89.

Schuler M, Rellán-Álvarez R, Fink-Straube C, Abadía J, Bauer P. Nicotianamine functions in the Phloem-based transport of iron to sink organs, in pollen development and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2012;24(6):2380-2400. doi:10.1105/tpc.112.099077

Stacey MG, Patel A, McClain WE, et al. The *Arabidopsis* AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. *Plant Physiol*. 2008;146(2):589-601.

Stringlis IA, Yu K, Feussner K, et al. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(22):E5213-E5222. doi:10.1073/pnas.1722335115

Tan S, Liu F, Pan XX, et al. CSN6, a subunit of the COP9 signalosome, is involved in early response to iron deficiency in *Oryza sativa*. *Sci Rep*. 2016;6:25485. Published 2016 May 3. doi:10.1038/srep25485

Tarantino D, Casagrande F, Soave C, Murgia I. Knocking out of the mitochondrial AtFer4 ferritin does not alter response of *Arabidopsis* plants to abiotic stresses. *J Plant Physiol*. 2010;167(6):453-460. doi:10.1016/j.jplph.2009.10.015

Thomine S, Lelièvre F, Debarbieux E, Schroeder JI, Barbier-Brygoo H. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency. *Plant J*. 2003;34(5):685-695. doi:10.1046/j.1365-313x.2003.01760.x

Treeby, M., Marschner, H. & Römheld, V. Mobilization of iron and other micronutrient cations from a calcareous soil by plant-borne, microbial, and synthetic metal chelators. *Plant Soil* 114, 217–226 (1989). <https://doi.org/10.1007/BF02220801>

Tsai HH, Schmidt W. Mobilization of Iron by Plant-Borne Coumarins. *Trends Plant Sci*. 2017;22(6):538-548. doi:10.1016/j.tplants.2017.03.008 \*

Vaid N, Ishihara H, Plötner B, Sageman-Furnas K, Wiszniewski A, Laitinen RAE. Leaf chlorosis in *Arabidopsis thaliana* hybrids is associated with transgenerational decline and imbalanced ribosome number. *New Phytol*. 2020;228(3):989-1000. doi:10.1111/nph.16752 \*

Voith von Voithenberg L, Park J, Stübe R, Lux C, Lee Y, Philippar K. A Novel Prokaryote-Type ECF/ABC Transporter Module in Chloroplast Metal Homeostasis. *Front Plant Sci.* 2019;10:1264. Published 2019 Oct 29. doi:10.3389/fpls.2019.01264

Volker Römheld, Horst Marschner, Mechanism of Iron Uptake by Peanut Plants : I. Fe<sup>III</sup> Reduction, Chelate Splitting, and Release of Phenolics, *Plant Physiology*, Volume 71, Issue 4, April 1983, Pages 949–954, <https://doi.org/10.1104/pp.71.4.949>

Wang B, Li G, Zhang WH. Brassinosteroids are involved in Fe homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot.* 2015;66(9):2749-2761. doi:10.1093/jxb/erv079

Wang B, Li Y, Zhang WH. Brassinosteroids are involved in response of cucumber (*Cucumis sativus*) to iron deficiency. *Ann Bot.* 2012;110(3):681-688. doi:10.1093/aob/mcs126

Wang N, Cui Y, Liu Y, et al. Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant.* 2013;6(2):503-513. doi:10.1093/mp/sss089

Wang S, Li L, Ying Y, et al. A transcription factor OsbHLH156 regulates Strategy II iron acquisition through localising IRO2 to the nucleus in rice. *New Phytol.* 2020;225(3):1247-1260. doi:10.1111/nph.16232

Wang W, Ye J, Ma Y, Wang T, Shou H, Zheng L. OsIRO3 Plays an Essential Role in Iron Deficiency Responses and Regulates Iron Homeostasis in Rice. *Plants (Basel).* 2020;9(9):1095. Published 2020 Aug 25. doi:10.3390/plants9091095

Wang W, Ye J, Xu H, et al. OsbHLH061 links TOPLESS/TOPLESS-RELATED Repressor Proteins with POSITIVE REGULATOR OF IRON HOMEOSTASIS 1 to Maintain Iron Homeostasis in Rice [published online ahead of print, 2022 Mar 15]. *New Phytol.* 2022;10.1111/nph.18096. doi:10.1111/nph.18096

Waters BM, Chu HH, Didonato RJ, et al. Mutations in *Arabidopsis* yellow stripe-like1 and yellow stripe-like3 reveal their roles in metal ion homeostasis and loading of metal ions in seeds. *Plant Physiol.* 2006;141(4):1446-1458. doi:10.1104/pp.106.082586

White MC. Metal Complexation in Xylem Fluid : II. THEORETICAL EQUILIBRIUM MODEL AND COMPUTATIONAL COMPUTER PROGRAM. *Plant Physiol.* 1981;67(2):301-310. doi:10.1104/pp.67.2.301

Wild M, Davière JM, Regnault T, et al. Tissue-Specific Regulation of Gibberellin Signaling Fine-Tunes Arabidopsis Iron-Deficiency Responses. *Dev Cell*. 2016;37(2):190-200. doi:10.1016/j.devcel.2016.03.022

Yang L, Ji J, Wang H, et al. Carbon Monoxide Interacts with Auxin and Nitric Oxide to Cope with Iron Deficiency in Arabidopsis. *Front Plant Sci*. 2016;7:112. Published 2016 Mar 7. doi:10.3389/fpls.2016.00112

Yang Li, Rihua Lei, Mengna Pu, Yuerong Cai, Chengkai Lu, Zhifang Li, Gang Liang, bHLH11 inhibits bHLH IVc proteins by recruiting the TOPLESS/TOPLESS-RELATED corepressors, *Plant Physiology*, Volume 188, Issue 2, February 2022, Pages 1335–1349, <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab540>

Yokosho K, Yamaji N, Ueno D, Mitani N, Ma JF. OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol*. 2009;149(1):297-305. doi:10.1104/pp.108.128132

Yuan Y, Wu H, Wang N, et al. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis. *Cell Res*. 2008;18(3):385-397. doi:10.1038/cr.2008.26

Zhai Z, Gayomba SR, Jung HI, et al. OPT3 Is a Phloem-Specific Iron Transporter That Is Essential for Systemic Iron Signaling and Redistribution of Iron and Cadmium in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2014;26(5):2249-2264. doi:10.1105/tpc.114.123737

Zhang H, Li Y, Pu M, Xu P, Liang G, Yu D. *Oryza sativa* POSITIVE REGULATOR OF IRON DEFICIENCY RESPONSE 2 (OsPRI2) and OsPRI3 are involved in the maintenance of Fe homeostasis. *Plant Cell Environ*. 2020;43(1):261-274. doi:10.1111/pce.13655

Zhang H, Li Y, Yao X, Liang G, Yu D. POSITIVE REGULATOR OF IRON HOMEOSTASIS1, OsPRI1, Facilitates Iron Homeostasis. *Plant Physiol*. 2017;175(1):543-554. doi:10.1104/pp.17.00794

Zhang J, Liu B, Li M, et al. The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2015;27(3):787-805. doi:10.1105/tpc.114.132704

Zhang X, Zhang D, Sun W, Wang T. The Adaptive Mechanism of Plants to Iron Deficiency via Iron Uptake, Transport, and Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10):2424. Published 2019 May 16. doi:10.3390/ijms20102424 \*



Zhang, L., Nakanishi Itai, R., Yamakawa, T., Nakanishi, H., Nishizawa, N.K., & Kobayashi, T. (2013). The Bowman–Birk Trypsin Inhibitor IBP1 Interacts with and Prevents Degradation of IDEF1 in Rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32, 841-851.