

Załącznik nr 2

dr Ewa Maciaszczyk-Dziubińska

**Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytetu Wrocławskiego**

Autoreferat

Spis treści

I. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.....	3
II. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
III. Opis merytoryczny osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny	3
A) Tytuł osiągnięcia naukowego.....	3
B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego	4
C) Omówienie osiągnięcia naukowego.	4
1. Istniejący stan wiedzy.	4
2. Drożdżowa akwagliceroporyna Fps1 jest dwukierunkowym kanałem arsenowym... 6	
3. Drożdżowe białko Acr3 zlokalizowane jest w błonie komórkowej i transportuje zarówno As(III) jak i Sb(III).	7
4. Transporter Acr3 katalizuje antyport As(III)/H ⁺ i Sb(III)/H ⁺	8
5. Identyfikacja reszt cysteinowych w białku Acr3 niezbędnych do transportu arsenu.8	
6. Identyfikacja reszt aminokwasowych istotnych dla struktury i funkcji białka Acr3.. 9	
7. Podsumowanie najważniejszych wyników będących przedmiotem niniejszego wniosku habilitacyjnego.....	11
IV. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.....	11
A) Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej i staży poddoktorskich.....	11
B) Wybrane inne badania prowadzone w ramach pracy naukowej na Uniwersytecie Wrocławskim.....	12
V. Plany na przyszłość	19
VI. Literatura	19

I. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe:

- a) 1996 – licencjat z biologii w zakresie mikrobiologii, tytuł uzyskany na Uniwersytecie Wrocławskim, w Zakładzie Genetyki, Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Nauk Biologicznych). Temat pracy „mtDNA a ewolucja człowieka”, opiekun naukowy: Prof. dr hab. Stanisław Ułaszewski.
- b) 1998 – magister biologii w zakresie mikrobiologii, dyplom uzyskany na Uniwersytecie Wrocławskim, w Zakładzie Genetyki, Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Nauk Biologicznych). Temat pracy „Poszukiwanie czynników indukujących i zastosowanie testu na aktywność β -galaktozydazy do badania ekspresji genów: *PDR5*, *ACR3* i *YDL100c* na poziomie transkrypcji”, promotor: Prof. dr hab. Stanisław Ułaszewski.
- c) 2002 – doktor nauk biologicznych w zakresie biologii, dyplom uzyskany na Uniwersytecie Wrocławskim, w Zakładzie Genetyki, Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Nauk Biologicznych). Tytuł rozprawy doktorskiej „Mechanizmy molekularne oporności komórek drożdży *Saccharomyces douglasii* na związki arsenu”. Promotor: Prof. dr hab. Stanisław Ułaszewski, recenzenci: Prof. dr hab. Joanna Rytko, Prof. dr hab. Stanisław Cebrat oraz honorowy recenzent zagraniczny: Prof. Jaga Łazowska. Obrona z wyróżnieniem.

II. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

2010 – obecnie: Adiunkt w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej (dawny Instytut Biologii Roślin), Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

2009 – 2010: Adiunkt w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

2004 – 2009: Adiunkt w Zakładzie Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Nauk Biologicznych), Uniwersytet Wrocławski

2003 – 2004: Asystent w Zakładzie Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii (dawny Instytut Mikrobiologii), Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Nauk Biologicznych), Uniwersytet Wrocławski

1998 – 2002: studia doktoranckie w Zakładzie Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii (dawny Instytut Mikrobiologii), Wydział Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Nauk Biologicznych), Uniwersytet Wrocławski

III. Opis merytoryczny osiągnięcia naukowego przedstawionego do oceny; wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

A) Osiągnięciem w myśl ww. Ustawy jest wskazany poniżej jednotematyczny cykl pięciu publikacji, dołączony do dokumentacji jako Załącznik nr 6, objęty tytułem:

„Molekularne mechanizmy transportu arsenu i antymonu w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego^{1,2}:

1. **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Migdal I., Migocka M., Bocer T., Wysocki R. (2010) The yeast aquaglyceroporin Fps1p is a bidirectional arsenite channel. *FEBS Letters* 584(4):726-732.

IF 5-letni: **3.372**; MNiSW – **30 pkt**; udział własny: **70%**

2. **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Wawrzycka D., Sloma E., Migocka M., Wysocki R. (2010) The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798(11):2170-2175.

IF 5-letni: **3.881**; MNiSW - **35 pkt**; udział własny: **80%**

3. **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Migocka M., Wysocki R. (2011) Acr3p is a plasma membrane antiporter that catalyzes As(III)/H⁺ and Sb(III)/H⁺ exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1808(7):1855-1859.

IF 5-letni: **3.881**; MNiSW - **35 pkt**; udział własny: **80%**

4. **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Migocka M., Wawrzycka D., Markowska K., Wysocki R. (2014) Multiple cysteine residues are necessary for sorting and transport activity of the arsenite permease Acr3p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838(3):747-755.

IF 5-letni: **3.881**; MNiSW - **35 pkt**; udział własny: **70%**

5. Markowska K., **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Migocka M., Wawrzycka D., Wysocki R. (2015) Identification of critical residues for transport activity of Acr3p, the *Saccharomyces cerevisiae* As(III)/H⁺ antiporter. *Molecular Microbiology* 98(1):162-174.

IF 5-letni: **4.764**; MNiSW - **40 pkt**; udział własny: **20%**

Sumaryczny *Impact Factor* wyżej wymienionych publikacji wynosi **19.779**. Sumaryczna liczba punktów MNiSW (zgodnie z aktualną punktacją wg wykazu MNiSW z dnia 31 grudnia 2014 r. oraz rozporządzenia MNiSW z dnia 13 lipca 2012 r.) wynosi **175**.

¹ Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 5

² Punkty MNiSW zgodnie z Załącznikiem do komunikatu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 31 grudnia 2014 r.

C) Omówienie osiągnięcia naukowego

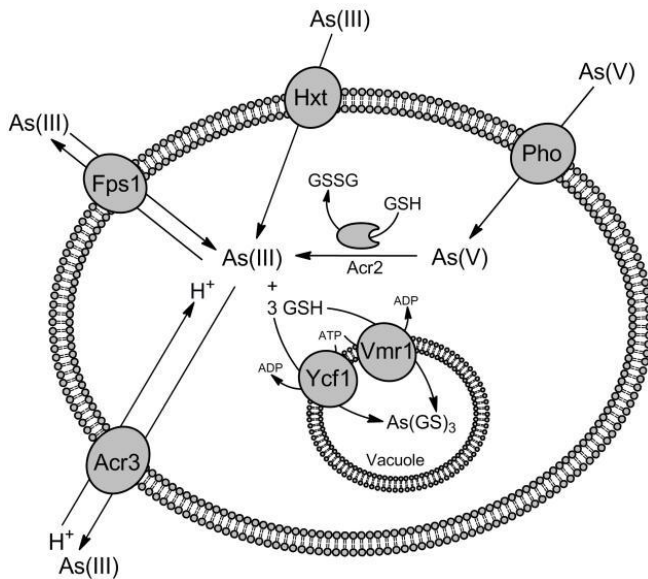
1. Istniejący stan wiedzy

Arsen i antymon to toksyczne metaloidy występujące w środowisku. Skażenie wód i gleby arsenem pochodzenia naturalnego jak i antropogenicznego jest poważnym problemem zdrowotnym dla milionów ludzi na świecie (Martinez *et al.*, 2011). Szacuje się, że około 40 mln ludzi jest chronicznie narażonych na kontakt i ekspozycję na niebezpieczne dawki arsenu, co prowadzi do poważnych problemów zdrowotnych, w tym do licznych typów nowotworów (Nordstrom, 2002; Garelick *et al.*, 2008; Tapio and Grosche, 2006; Sharma *et al.*, 2014). Z drugiej strony toksyczne właściwości związków arsenu i antymonu wykorzystywane są w nowoczesnych chemioterapiach przeciwnowotworowych i przeciwprzewodniakowych (Litwin *et al.*, 2009). Trójtlenek arsenu (arszenik) jest obecnie rutynowo i z powodzeniem stosowanym związkiem w klinicznym leczeniu ostrej białaczki promielocytowej. Zastosowanie arszeniku w

połączeniu z innymi związkami arsenu, nieorganicznymi (np. realgar) lub organicznymi (np. Melarsoprol), daje też szanse na wykorzystanie tych substancji w leczeniu innych nowotworów krwi oraz guzów litych (Dilda and Hogg, 2007). Chemioterapeutyki zawierające arsen i antymon są od dawna używane do leczenia tropikalnych chorób pasożytniczych. Terapeutyki zawierające pięciwartościowe związki antymonu (Pentostam) są nadal istotnym lekiem pierwszego rzutu przeciwko częstej tropikalnej chorobie – leiszmaniozie (czarna febra) (Frezard *et al.*, 2010), zaś lek Melarsoprol (zawierający trójwartościowy arsen) przed wprowadzeniem antybiotyku eflornitiny, był podstawowym lekiem stosowanym w drugiej neurologicznej fazie tryposomatozy (śpiączki afrykańskiej) (Chappuis, 2007). Niestety terapia arsenikowa nie jest skuteczna u wszystkich pacjentów, co wynika głównie z aktywacji mechanizmów oporności na arsen (Zhu *et al.*, 2014). Podobnie u pierwotniaków występuje powszechnie zjawisko oporności na związki arsenu (Baker *et al.*, 2013), co stanowi poważny problem medyczny. Zrozumienie molekularnych mechanizmów oporności komórek eukariotycznych na związki arsenu jest zatem niezbędne i kluczowe do opracowania skuteczniejszych metod terapeutycznych, a także określania wrażliwości ludzi narażonych na długotrwałą ekspozycję na arsen. Stąd znaczenia nabrały badania nad drogami wnikania i usuwania związków arsenu i antymonu, obejmujące identyfikację i dokładne zbadanie funkcji, ekspresji i regulacji białek zaangażowanych w transport metaloidów.

Dogodnym organizmem do badania zjawiska oporności na arsen i antymon okazały się być drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*, które od wielu lat z powodzeniem używane są jako organizm modelowy w biologii molekularnej. Wieloletnie badania grupy naukowej, której jestem członkiem od 1998 roku, nad mechanizmami oporności komórek drożdży na związki arsenu i antymonu prowadzone w Instytucie Genetyki i Mikrobiologii, a następnie w Instytucie Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Wrocławskiego pozwoliły na poznanie specyficznych mechanizmów nabywania oporności, w tym na identyfikację białek odpowiedzialnych za akumulację arsenu i antymonu w komórce, jak i za usuwanie tych metaloidów z cytoplazmy (Rycina 1.) (Wysocki *et al.*, 1999; Tamás and Wysocki, 2001; Tamás *et al.*, 2005, Rosen and Tamás, 2010, Lis *et al.*, 2010, Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2012). Intensywnie badamy też mechanizm regulacji ekspresji białek zaangażowanych w detoksykację komórek drożdży ze związków arsenu i antymonu.

W 1996 roku dzięki badaniom na drożdżach zostało zidentyfikowane zgrupowanie trzech genów: *ACR1*, *ACR2*, *ACR3*, które w wielu kopiach nadaje komórkom wysoką oporność na As(III) i As(V) (Bobrowicz *et al.*, 1997; Wysocki *et al.*, 1997). Gen *ACR1/YAP8* koduje czynnik transkrypcyjny pozytywnie regulujący transkrypcję genów *ACR2* i *ACR3* w odpowiedzi na stres arsenowy. Gen *ACR2* koduje pierwszą zidentyfikowaną reduktazę arsenianową u eukariotów, a jej obecność niezbędna jest do redukcji As(V) do As(III), który jest usuwany na zewnątrz komórki przez błonowy transporter arsenowy Acr3 (Mukhopadhyay *et al.*, 2000; Wysocki *et al.*, 1997). System usuwania As(III) z cytoplazmy przy pomocy transportera Acr3 wspomagany jest przez dwa wakuolarnie ABC transportery - Ycf1 i Vmr1, które transportują As(III) w formie koniugatów z glutationem do wakuoli (Rycina 1.) (Ghosh *et al.*, 1999; Wysocki *et al.*, 2004, Wawrzycka *et al.*, 2010; Maciaszczyk-Dziubinska *et al.*, 2012).



Rycina 1. Drogi wnikania i usuwania związków arsenu u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Główną drogę wnikania As(III) u drożdży stanowi akwagliceroporyna Fps1, jednakże przy braku glukozy w podłożu As(III) może wnikać dzięki permeazom heksozowym Hxt (Hxt1-Hxt17, Gal2). As(V) wnika do komórek poprzez transportery fosforanowe Pho (Pho84 i Pho87); w komórce ulega redukcji do As(III) dzięki reduktazie arsenianowej Acr2. As(III) jest transportowany na zewnątrz komórki wbrew gradientowi stężeń przez transporter Acr3 na zasadzie antyportu As(III)/H⁺ lub poprzez akwagliceroporynę Fps1 zgodnie z gradientem stężeń, np. w czasie ekspozycji na As(V). Skonjugowane formy As(III) z glutationem są sekwestrowane do wakuoli dzięki ABC transporterom Ycf1 i Vmr1 (Maciaszczyk-Dziubińska *et al.*, 2012)

2. Drożdżowa akwagliceroporyna Fps1 jest dwukierunkowym kanałem arsenowym

W 2001 roku prof. Robert Wysocki we współpracy z prof. Markusem Tamásem z Uniwersytetu w Gothenborgu odkryli drogę i opisać mechanizm akumulacji As(III) do komórek drożdżowych przez kanał glicerolowy Fps1p, należący do nadrodziny akwagliceroporyn (Rycina 1; Wysocki *et al.* (2001). Kanały glicerolowy Fps1 należy do licznej rodziny MIP (Major Intrinsic Proteins), które występują począwszy od bakterii do człowieka włącznie. Wśród tych transporterów wyróżnia się dwie grupy: akwaporyny – transportują wodę, akwagliceroporyny transportują: wodę, glicerol, mocznik i inne poliole (polihydroksyalkohole). Odkrycie, iż kanał glicerolowy Fps1 transportuje arsen i antymon w postaci As(OH)₃ i Sb(OH)₃ – związki, które stanowią nieorganiczny odpowiednik polioli, pozwoliło wykazać, iż ssacze akwagliceroporyny AQP9 i AQP7 mogą także transportować As(OH)₃ i Sb(OH)₃ (Liu *et al.*, 2002). Co istotne, udowodnienie roli AQP7 i AQP9 w akumulacji metaloidów było możliwe dzięki zastosowaniu drożdżowego mutantu delecyjnego *fps1* jako gospodarza do heterologicznej ekspresji ssaczych akwagliceroporyn (Liu *et al.*, 2002). Jest to także bardzo dobry przykład ukazujący olbrzymią rolę badań na organizmie modelowym w zrozumieniu metabolizmu komórek ssaków.

Jednym ze sposobów uniknięcia toksycznego działania metali ciężkich i metaloidów jest ograniczenie ich akumulacji do komórek drożdży poprzez zahamowanie aktywności odpowiednich transporterów lub usuwanie ich z błony komórkowej i kierowanie do degradacji w wakuoli na drodze ubikwitynozależnej endocytozy (Wysocki and Tamás, 2010). Regulacja kanału glicerolowego obejmuje oba te sposoby w zależności od rodzaju toksycznego substratu. W obecności kwasu octowego transporter Fps1 zlokalizowany w błonie komórkowej ulega szybkiej endocytozie i degradacji w wakuoli, aby zahamować akumulację tego kwasu do komórek (Mollapour and Piper, 2007). Natomiast w obecności As(III) lub Sb(III) kanał Fps1 regulowany jest na poziomie transkrypcji i aktywności transportowej (Wysocki *et al.*, 2001; Thorsen *et al.*, 2006; Maciaszczyk-Dziubińska *et al.*, 2010). Wysocki i współpracownicy (2001) wykazali, że synteza mRNA *FPS1* ulega zahamowaniu po dodaniu As(III) lub Sb(III) do hodowli drożdży, co prawdopodobnie ma zmniejszyć ilość tego białka w błonie komórkowej. Stwierdzono ponadto, że w odpowiedzi na stres arsenowy białko Fps1 fosforylowane jest na treoninie 231 przez kinazę MAP Hog1, co prowadzi do redukcji akumulacji As(III) przez kanał Fps1 (Thorsen *et al.*, 2006). Hog1 może także hamować aktywność Fps1

pośrednio poprzez fosforylację białek Rgc1 i Rgc2, które są pozytywnymi modulatorami Fps1 (Beese *et al.*, 2009). Co ciekawe, kinaza Hog1 jest również aktywowana w obecności As(III) i Sb(III) (Thorsen *et al.*, 2006) i modyfikuje oprócz Fps1 także inne białka zaangażowane w adaptację do stresu arsenowego (Migdal *et al.*, 2008).

Pierwsza z przedstawionego do oceny cyklu prac (**Maciaszczyk-Dziubińska E.**, Migdal I., Migocka M., Bocer T., Wysocki R. (2010) *FEBS Letters* 584(4):726-732) zawiera wyniki badań nad poszukiwaniem multikopijnych supresorów mutacji delecyjnej *hog1Δ* nadającej wzrost wrażliwości drożdży na związki arsenu trójwartościowego. Ku zaskoczeniu wyizolowaliśmy gen *FPS1*, który paradoksalnie stanowi także główną drogę wnikania As(III) do komórki. Wykazaliśmy, że nadekspresja Fps1 zwiększa oporność komórek drożdży na As(III). Opracowując technikę pomiaru transportu arsenu wykazaliśmy, że obecność wielu kopii *FPS1* obniża wewnątrzkomórkowe stężenie As(III) w komórkach drożdży nawet przy braku antyportera Acr3. Ponadto podczas stresu arsenowego ilość transkryptu genu *FPS1* wykazuje początkowy spadek, ale po 2h inkubacji z As(III) następuje wzrost ilości mRNA *FPS1*, błonowa lokalizacja oraz ilość białka zaś nie zmieniają się do 4h inkubacji z As(III). Ze względu na zwiększoną wrażliwość szczepu delecyjnego *fps1Δ* na As(V) i transport arsenu przez kanał Fps1 zgodnie z gradientem stężeń zaproponowaliśmy, że kanał Fps1 bierze udział w usuwaniu As(III) powstałego na drodze redukcji As(V) przez reduktazę arsenianową Acr2. Natomiast podczas długotrwałej ekspozycji na As(III), Fps1 stanowiłby alternatywną drogą detoksykacji As(OH)₃, który nie jest rozpoznawany i usuwany przez antyporter Acr3, dopiero w sytuacji, gdy jego stężenie wzrasta wewnątrz komórki i spada na zewnątrz, co może się odbywać dzięki kompleksacji z eksportowanym do środowiska glutationem (Thorsen *et al.*, 2012).

Istotą tej publikacji było wykazanie, że akwagliceroporyna Fps1 bierze nie tylko udział w akumulacji arsenu do komórki drożdżowej, ale również pełni rolę w usuwaniu tego metaloidu z komórki, zwłaszcza formy trójwartościowej powstałej w wyniku redukcji w cytoplazmie arsenu pięciwartościowego.

Podsumowując uzyskane wyniki zaproponowaliśmy następujący model oporności na arsen z udziałem MAP kinazy Hog1 i akwagliceroporyny Fps1: po dostaniu się arsenu do komórki drożdżowej aktywowana jest kinaza Hog1, której zadaniem jest m.in. fosforylacja i zamknięcie kanału Fps1, aby zahamować wpływ arsenu do komórki. Po około dwóch godzinach adaptacji Hog1 jest inaktywowany, a kanał Fps1 jest ponownie otwarty, aby pozwolić na wypływ arsenu z komórki w sytuacji wyraźnej różnicy stężeń arsenu pomiędzy wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym.

Uzyskane wyniki zaprezentowaliśmy także w postaci plakatu na 24th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Manchester w UK.

3. Drożdżowy białko Acr3 zlokalizowane jest w błonie komórkowej i transportuje zarówno As(III) jak i Sb(III)

Jednym z podstawowych i najbardziej wydajnych mechanizmów detoksykacji u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych jest usuwanie arsenu na zewnątrz komórki przez specyficzne dla tego metaloidu transportery. Najlepiej scharakteryzowanym transporterem arsenowym u niższych organizmów eukariotycznych jest transporter Acr3, odkryty i opisany po raz pierwszy u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w naszym laboratorium (Bobrowicz *et al.*, 1997; Wysocki *et al.*, 1997). Homologii białka Acr3 występują licznie u archeonów, bakterii, grzybów, a także mchów i paproci, ale brak ich u roślin wyższych, tworząc rodzinę białek Acr3 (Arsenical Compounds Resistance) o wysokiej identyczności (Wysocki *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2009; Achour *et al.*, 2007; Indriolo *et al.*, 2010). Białka Acr3 zaliczane są także do nadrodziny transporterów kwasów żółciowych/arsenu/ryboflawiny (BART; bile/arsenite/riboflavin) (Mansour *et al.*, 2007). Transportery należące do rodziny Acr3 charakteryzują się zróżnicowaniem pod względem specyficzności substratowej, np. Acr3 z *Corynebacterium glutamicum* czy *Alkaliphilus metalliredigens* nadają oporność tylko na As(III) (Fu *et al.*, 2009), podczas gdy Acr3 z *Schewanella oneidensis* nadaje oporność na As(V) (Xia *et al.*,

2008), a Acr3 z *Synechocystis sp.* (Lopez-Maury *et al.*, 2003) zarówno na As(III) jak i Sb(III).

Kolejna praca włączona do cyklu habilitacyjnego dotyczy kontynuacji badań nad zjawiskiem oporności na arsen u drożdży *S. cerevisiae*, gdzie skoncentrowaliśmy się nad charakterystyką mechanizmu usuwania arsenu z komórki za pośrednictwem białka Acr3 (**Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Wawrzycka D., Sloma E., Migocka M., Wysocki R. (2010) *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1798, 2170-2175). W pracy tej skupiliśmy się na określeniu specyficzności substratowej, lokalizacji i regulacji białka Acr3. W naszych wcześniejszych badaniach pokazaliśmy, iż drożdżowy transporter Acr3 odgrywa podstawową rolę w oporności na As(III), podczas gdy za detoksykację Sb(III) odpowiada przede wszystkim Ycf1 (Wysocki *et al.*, 1997). Następnie zaobserwowaliśmy, iż fuzja promotora genu *ACR3* z genem reporterowym *lacZ* może być aktywowana przez Sb(III) (Wysocki *et al.*, 2004). Badania przeprowadzone w ramach tej publikacji z wykorzystaniem mutantów delecyjnych *acr3Δ* i *ycf1Δ* oraz nadekspresji genu *ACR3* wykazały, że **Acr3 może współuczestniczyć w nadawaniu oporności na Sb(III) poprzez jego usuwanie na zewnątrz komórki, co potwierdziliśmy pomiarami akumulacji i wyrzutu Sb(III) w komórkach drożdży. Analiza białka fuzyjnego Acr3-GFP pozwoliła na pokazanie po raz pierwszy lokalizacji białka Acr3 w błonie komórkowej drożdży *S. cerevisiae*.** Wykazaliśmy także, że ekspresja Acr3 jest indukowana w obecności obu metaloidów i regulowana na poziomie transkrypcji, a poziom mRNA po indukcji As(III) jest pięciokrotnie większy niż po Sb(III) i rośnie wraz z wydłużaniem czasu indukcji, co korelowało z ilością białka obserwowanego w preparatach mikroskopowych oraz wykrywanego metodą Western blot. Jednocześnie nie wykazaliśmy wpływu metaloidów na stabilność białka Acr3 czy jego subkomórkową lokalizację.

Powyższe badania przeprowadzono w ramach projektu badawczego MNiSW N301/05931/1785. Wyniki tego projektu zostały zaprezentowane także w formie plakatu na 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology w Olsztynie.

4. Drożdżowy transporter Acr3 katalizuje antyport As(III)/H⁺ i Sb(III)/H⁺

W kolejnej pracy włączonej do dorobku habilitacyjnego (**Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Migocka M., Wysocki R. (2011) *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1808(7):1855-1859) wykorzystując metodę pomiaru transportu w preparatach pęcherzyków błonowych o odwróconej orientacji wykazaliśmy, iż **Acr3 funkcjonuje jako As(III)/H⁺ i Sb(III)/H⁺ antyporter błonowy używający do transportu energię pochodzącą z gradientu elektrochemicznego generowanego przez błonową H⁺-ATPazę Pma1.** Ponadto pokazaliśmy, że **Acr3 jest transporterem o takich samym powinowactwie zarówno do As(III) jak i Sb(III)**, ale jednak As(III) jest około trzy razy szybciej transportowany w porównaniu do Sb(III), co jest kolejnym dowodem na drugorzędą rolę Acr3 w nadawaniu tolerancji komórek drożdży na Sb(III).

Powyższe badania przeprowadzono w ramach projektu badawczego MNiSW N301/0493/39. Wyniki tych badań zaprezentowałam także podczas 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology w Olsztynie.

5. Identyfikacja reszt cysteinowych w białku Acr3 niezbędnych do transportu arsenu

Zadaniem transportera Acr3 jest usuwanie toksycznego arsenu z cytoplazmy na zewnątrz komórki. Charakterystyka homologicznego transportera Acr3 z bakterii *Alkaliphilus metalliredigens* i *Corynebacterium glutamicum* pokazała, że wysoce konserwatywna reszta cysteinowa zlokalizowana w środku czwartego regionu transbłonowego (TM4) jest niezbędna do translokacji As(III) przez te białka (Fu *et al.*, 2009). Skłoniło to nas do sprawdzenia, które reszty aminokwasowe w białku Acr3 mogą odpowiadać za jego aktywność transportową, a wyniki tych analiz znalazły się w mojej kolejnej publikacji z dorobku habilitacyjnego (**Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Migocka M.,

Wawrzycka D., Markowska K., Wysocki R. (2014) *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838(3):747-755. Badania te realizowałam jako główny wykonawca w ramach projektu NCN nr 2012/07/B/NZ1/02804 i zaprezentowałam je w postaci plakatu konferencyjnego na 22nd IUBMB and 37th FEBS Congress – From Single Molecules to Systems Biology, Sevilla w Hiszpanii oraz na 26nd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Frankfurt/Main w Niemczech.

Drożdżowe białko Acr3 zawiera dziewięć reszt cysteinowych w pozycjach: 90, 151, 169, 193, 283, 333, 344, które poddano ukierunkowanej mutagenezie w celu zamiany reszt cysteinowych w walinę lub alaninę. Analiza fenotypowa i funkcjonalna obejmująca określenie poziomu ekspresji i lokalizację zmutowanych wersji białka Acr3 oraz badanie zdolności do transportu As(III) *in vivo* oraz protonów w odwróconych pęcherzykach błonowych, pozwoliły na wysnucie wniosku, że **reszta cysteiny 151, leżąca w środku czwartego regionu transbłonowego (TM4), jest niezbędna do translokacji As(III) i Sb(III) przez antyporter Acr3 i być może pełni rolę miejsca przyłączenia metaloidu**. Mutacja C151V nie powodowała zmiany ilości czy lokalizacji białka Acr3 w błonie komórkowej, jednakże prowadziła do całkowitej inaktywacji funkcji transporterowej. Co ważne reszta C151 jest wysoce konserwatywna i występuje u wszystkich znanych członków rodziny białek Acr3, a jej odpowiednik w białku Acr3 z *C. glutamicum* również niezbędny jest do transportu As(III). Ponadto wykazaliśmy, że reszta C90, która prawdopodobnie zlokalizowana jest w pętli cytoplazmatycznej białka Acr3 tuż za końcem regionu TM2, potrzebna jest do prawidłowego sortowania transportera z błony retikulum endoplazmatycznego (ER) do błony komórkowej. Postawiliśmy hipotezę, że reszta C90 mogą podlegać modyfikacjom post-translacyjnym w postaci np. palmitoilacji, która może ułatwiać składanie białka Acr3 w błonie, a także blokować ubiquitytację sąsiedniej reszty lizyny (K91), która prowadziłyby do retencji Acr3 w błonie i późniejszej degradacji. Zgodnie z tym założeniem wprowadzenie kolejnej mutacji K91A w mutancie C90A skutkowało prawidłowym sortowaniem transportera do błony komórkowej i odtworzeniem fenotypu dzikiej formy białka Acr3. Oprócz mutacji C90A i C151V tylko zamiana reszty cysteiny 169 na alaninę prowadziła do znacznego upośledzenia funkcji Acr3. Potwierdza to dodatkowo nasz wniosek o kluczowym znaczeniu reszt cysteinowych dla transportu metaloidów przez białka Acr3. Pozostałe reszty cysteinowe w białku Acr3, które nie są konserwatywne w rodzinie Acr3, albo nie mają żadnego wpływu (C283A) albo tylko w niewielkim stopniu wpływają na efektywność transportu metaloidów przez białko Acr3 (C192A, C316A, C318A, C333A, C344A).

6. Identyfikacja reszt aminokwasowych istotnych dla struktury i funkcji białka Acr3

Najnowsza praca naszej grupy badawczej (Markowska K., **Maciaszczyk-Dziubińska E.**, Migocka M., Wawrzycka D., Wysocki R. (2015) *Molecular Microbiology* 98(1):162-174, ostatnia w cyklu habilitacyjnym, była kontynuacją analizy mutacyjnej białka Acr3 pod kątem identyfikacji innych, niż C151, reszt aminokwasowych w regionach transbłonowych odpowiedzialnych za aktywność antyportową As(III)/H⁺. W tym celu dokonaliśmy porównania sekwencji białek Acr3 z różnych organizmów i znaleźliśmy pięćdziesiąt sześć reszt aminokwasowych zachowanych u większości przedstawicieli rodziny Acr3, co sugeruje ich ważną rolę w determinowaniu właściwości transportowych białka Acr3. Opierając się na hipotetycznym modelu topologii zamieniliśmy, używając techniki mutagenezy ukierunkowanej, dwadzieścia sześć wybranych (aromatycznych i hydrofilowych) konserwatywnych reszt aminokwasowych znajdujących się w regionach

transmembranowych na alaniny. Wybór aminokwasów hydrofilowych wynikał z faktu, iż mają one polarną budowę lub posiadają dodatkowe grupy chemiczne, są reaktywne chemicznie i dlatego mogą być odpowiedzialne za translokację metaloidów i protonów przez białko Acr3. Dokładne analizy funkcjonalne zmutowanych wersji Acr3 pokazały, że **dziewięć reszt aminokwasowych (Asn117, Trp130, Arg150, Trp158, Asn176, Arg230, Tyr290, Phe345, Asn351) jest niezbędnych do prawidłowego składania i sortowania Acr3 z retikulum endoplazmatycznego do błony komórkowej**, co odzwierciedlało się w zaburzonej błonowej lokalizacji, zmniejszonej ilości białka zwłaszcza we frakcji błonowej, braku lub znacząco obniżonej aktywności transportowej oraz braku komplementacji fenotypu oporności komórek drożdży mutantu delecyjnego *acr3Δ* na As(III) do poziomu charakterystycznego dla komórek typu dzikiego. Odkryliśmy także, że **konserwatywne reszty aminokwasowe w białku Acr3: Phe266 (TM7), Phe352 (TM9), Ser349 (TM9), Glu353 (TM9), Glu380 (TM10) są istotne dla transportu As(III)/H⁺, a ich mutacje powodowały znaczne obniżenie lub całkowity brak aktywności transportowej antyportera Acr3**. Co ciekawe reszty Ser349, Phe352, Glu353 zlokalizowane są w środkowym odcinku wysoce konserwatywnego regionu transmembranowego TM9, gdzie skupienie aromatycznych i ujemnie naładowanych aminokwasów jest charakterystyczne dla miejsca wiązania substratu w przypadku innych aktywnych transporterów wtórnych (Shi, 2013), co sugerować może na podobną rolę tych reszt aminokwasowych w drożdżowym białku Acr3. Villadangos i współpracownicy (2012) wykazali udział reszty kwasu glutaminowego Glu305 w procesie translokacji arsenu przez homologiczne białko Acr3 u *Corynebacterium glutamicum*. Odpowiednikiem tej reszty aminokwasowej w białku Acr3 z *S. cerevisiae* jest Glu353, która zlokalizowana jest w TM9 i została poddana analizie mutacyjnej wraz z Glu380 położoną w TM10, jako potencjalne miejsca wiązania protonów. Zamiana Glu353 w białku Acr3 na jakikolwiek inny aminokwas (ujemny – D; dodatni – K; obojętny – K, A; hydrofobowy – L) pomimo prawidłowej ekspresji i lokalizacji białka, powodowały całkowitą utratę aktywności transportowej, co wskazuje na **kluczową rolę Glu353 dla aktywności transportowej Acr3 oraz udział Glu353 w wiązaniu substratu. Analiza mutantów reszty Glu380 w białku Acr3 sugeruje, że reszta Glu380 istotna jest nie tylko dla antyportu As(III)/H⁺, ale także dla prawidłowego składania i sortowania tego białka**, ponieważ dla części mutantów (E380L, E380D) obserwowaliśmy zaburzoną lokalizację oraz zmniejszoną ilość białka w błonie cytoplazmatycznej.

Ostatnio opublikowano wyniki struktury kryształów dwóch bakteryjnych transporterów kwasów żółciowych zależnych od Na⁺ z *Neisseria meningitidis* (Hu *et al.*, 2011) i *Yersinia frederiksenii* (Zhou *et al.*, 2014) z rodziny ASBT i nadrodziny BART, do których białko Acr3 wykazuje podobieństwo strukturalne. Transportery te zbudowane są z dziesięciu regionów transbłonowych, które tworzą dwie duże domeny. Domena rdzeniowa zbudowana jest z sześciu regionów transbłonowych (TM3-TM5 i TM8-TM10), a domena panelowa z czterech (TM1-TM2 i TM6-TM7). Istotą struktury białek ASBT jest nieciągłość helis TM4 i TM9 i ich krzyżowanie się. Dwa miejsca wiązania Na⁺ znajdują się pomiędzy tym skrzyżowaniem, a reszty aminokwasowe zaangażowane w wiązanie substratu to Ser, Asn, Glu, His, Gln zlokalizowane w TM3, TM4, TM5 i TM9. Przyrównanie sekwencji aminokwasowej Acr3 i ASBT z *Yersinia frederiksenii* pokazuje istotne podobieństwa, nie tylko w topologii regionów transbłonowych, ale także w rodzaju i położeniu reszt aminokwasowych **istotnych w procesie antyportu As(III)/H⁺ czyli Cys151 w TM4 i Ser349, Phe352, Glu353 w TM9**. Skłania to nas do postawienia hipotezy, że białka ASBT i Acr3 mogą być strukturalnymi homologami i mechanizm antyportu As(III)/H⁺ może być podobny do symportu zależnego od Na⁺ katalizowanego przez białka ASBT.

Uzyskane wyniki były efektem realizacji jednego z zadań badawczych projektu NCN 2012/07/B/NZ1/02804 i zostały zaprezentowane na dwóch międzynarodowych konferencjach w postaci plakatu na 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB), Levico Terme, Trentino we Włoszech oraz na Antimony 2015: 3rd International Workshop on Antimony in the Environment, Leipzig w Niemczech.

7. Podsumowanie najważniejszych wyników będących przedmiotem niniejszego wniosku habilitacyjnego

Reasumując, za moje najważniejsze, oryginalne osiągnięcia badań, których wyniki opublikowano w cyklu prac włączonych do osiągnięcia habilitacyjnego uważam wykazanie, że:

1. Akwagliceroporyna Fps1 bierze nie tylko udział w akumulacji arsenu do komórek drożdży *S. cerevisiae*, ale również pełni rolę w usuwaniu arsenu z cytoplazmy na zewnątrz komórek.
2. Transporter Acr3 warunkuje oporność komórek drożdży *S. cerevisiae* nie tylko na As(III), ale także na Sb(III).
3. Białko Acr3 lokalizuje się w błonie komórkowej i funkcjonuje jako antyporter As(III)/H⁺ i Sb(III)/H⁺ wykorzystujący do transportu energię pochodzącą z gradientu elektrochemicznego.
4. Antyporter Acr3 ma takie samo powinowactwo do As(III) jak i Sb(III), ale transport Sb(III) jest wolniejszy.
5. Wysoce konserwatywne reszty Cys151 i Glu353 zlokalizowane w środku czwartego (TM4) i dziewiątego (TM9) regionu transbłonowego są niezbędne dla aktywności transportowej białka Acr3 i mogą stanowić miejsca przyłączenia dla substratów.
6. Konserwatywne reszty aminokwasowe Cys169 (pętla TM4-TM5), Phe266 (TM7), Phe352 (TM9), Ser349 (TM9), Glu380 (TM10) w białku Acr3 są istotne dla antyportu As(III)/H⁺.
7. Reszty aminokwasowe Cys90, Asn117, Trp130, Arg150, Trp158, Asn176, Arg230, Tyr290, Phe345, Asn351 w białku Acr3 są ważne dla jego prawidłowego składania i sortowania z ER do błony komórkowej.

IV. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

A) Badania prowadzone w ramach pracy doktorskiej i staży podoktorskich

Moją „przygodę” ze zjawiskiem oporności komórek na związki arsenu i antymonu rozpoczęłam podczas wykonywania pracy doktorskiej. Jej celem było poszukiwanie genów warunkujących oporność na związki arsenu u drożdży *Saccharomyces douglasii* - najbliższej spokrewnionego gatunku z drożdżami *S. cerevisiae*, wśród dotychczas poznanych gatunków z rodzaju *Saccharomyces*. Badania te, choć byłam doktorantką Studium Doktoranckiego Biologii Molekularnej na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego, przez 26 miesięcy prowadziłam w laboratorium prof. Jagi Łazowskiej w Centre de Génétique Moléculaire, Centre National de la Recherche

Scientifique, Gif-sur-Yvette, we Francji. Był to wówczas wiodący na świecie ośrodek badań nad genetyką drożdży z rodzaju *Saccharomyces*, kierowany przez Prof. Piotra Słonimskiego. Podczas prowadzonych tam badań zapoznałam się z metodami pracy z drożdżami *Saccharomyces cerevisiae*, zwłaszcza stosowanymi w genetyce mitochondrialnej. Poznałam też najnowsze techniki biologii molekularnej, które wykorzystywałam w dalszej działalności naukowej. Miałam też bezpośrednią możliwość zapoznania się z procesem dydaktycznym, realizowanym przez studentów Université de Paris XI, ponieważ w 1999/2000 roku byłam uczestnikiem studiów doktoranckich na tamtejszej uczelni. W pracy doktorskiej zaproponowałam molekularny mechanizm oporności na związki arsenu u drożdży *S. douglasii*, na który składa się zgrupowanie 3 analogicznych genów, jak u *S. cerevisiae*, ale występujących w zduplikowanej formie, co warunkuje większą oporność tych drożdży na związki arsenu i antymonu. Dokonałam także porównania systemu detoksykacji związków arsenu z tym poznany u drożdży *S. cerevisiae*. Zbadałam komplementacje homologiczne i heterologiczne, wykazując, że geny *ACR2* i *ACR3* drożdży *S. cerevisiae* i *S. douglasii* są funkcjonalnie i strukturalnie równoważne. Wykryłam, że pomimo 97% identyczności aminokwasowej gen *ASR1* drożdży *S. douglasii* nie jest zdolny do komplementacji braku genu *ACR1* u drożdży *S. cerevisiae*, co może wynikać z odmiennego mechanizmu regulacji ekspresji lub różnic w sekwencjach promotorowych (w promotorze genu *ASR1* drożdży *S. douglasii* wykryto delecję 35 nukleotydów). Na podstawie homologii sekwencji białkowych do białek Acr3 i Asr3 skonstruowaliśmy drzewo filogenetyczne dla rodziny białek pochodzących z różnych organizmów, które może dostarczyć dowodów potwierdzających hipotezę horyzontalnego transferu genu *ACR3* od bakterii do organizmów eukariotycznych. Uzyskane wyniki opublikowane po obronie pracy doktorskiej (**Maciaszczyk E.**, Wysocki R., Golik P., Lazowska J., Ulaszewski S. (2004) Arsenical resistance genes in *Saccharomyces douglasii* and other yeast species undergo rapid evolution involving genomic rearrangements and duplications. *FEMS Yeast Research*) pozwalają na lepsze zrozumienie aspektów ewolucyjnych systemu detoksykacji arsenu przez komórki drożdży.

Podczas pobytu i realizacji studiów doktoranckich, a następnie w ramach 3 staży poddoktorskich w laboratorium prof. Jagi Łazowskiej w Centre de Génétique Moleculaire, realizowałam równocześnie drugi temat badawczy: Poszukiwanie interakcji mitochondrialnych i jądrowych u drożdży; supresja mutacji zlokalizowanych w intronie bi2 genu - *cytb* u *S. cerevisiae* i *S. capensis*. Efektem tej pracy była publikacja **Maciaszczyk E.**, Ulaszewski S., Lazowska J. (2004) Intragenic suppressors that restore the activity of the maturase encoded by the second intron of the *Saccharomyces cerevisiae* *cyt b* gene. *Current Genetics* 46(2): 67-71, w której dokonałam izolacji i charakterystyki rewertantów mitochondrialnych mutacji blokujących aktywność maturazy, biorącej udział w wycinaniu intronu, kodowanej przez drugi intron genu mitochondrialnego *cytb* u drożdży *S. cerevisiae*. Wykonałam genetyczną oraz molekularną analizę włącznie z określeniem sekwencji 311 mutacji wtórnych będącymi monosubstytucjami lub rewersją powrotną zlokalizowanymi w konserwatywnym motywie P1 maturazy bi2.

B) Wybrane inne badania prowadzone w ramach pracy naukowej na Uniwersytecie Wrocławskim

Większość znaczących osiągnięć w moim dorobku naukowym pochodzi z okresu po obronie pracy doktorskiej. Swoje badania po obronie pracy doktorskiej rozpocząłam od kontynuacji zagadnienia dotyczącego poznania molekularnych aspektów oporności na

związki arsenu i antymonu u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* początkowo jako członek grupy badawczej kierowanej przez prof. dr hab. Stanisława Ułaszewskiego, a następnie przez prof. dr hab. Roberta Wysockiego. Szczególnie intensywna współpraca z prof. Wysockim pozwoliła na uzyskanie i opublikowanie wielu wyników, które wchodzą w skład mojego osiągnięcia naukowego przedstawionego w tym wniosku. Podjęłam, wraz ze współpracownikami, badania równocześnie nad kilkoma różnymi projektami badawczymi wykorzystując wiedzę i umiejętności z zakresu molekularnej genetyki drożdży zdobyte podczas zagranicznych staży oraz pracy w Zakładzie Genetyki.

Będąc w obszarze bezpośrednich zainteresowań zjawiskiem oporności na sole arsenu, w 2003 roku porównaliśmy mechanizmy oporności u *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* (Wysocki R., Clemens S., Augustyniak D., Golik P, **Maciaszczyk E.**, Tamas M.J., Dziadkowiec D. (2003) Metalloid tolerance based on phytochelatin is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304(2):293-300). W tym celu wykorzystaliśmy technikę heterologicznej ekspresji do wykazania, iż system oporności na arsen opierający się na białku Acr3 u *S. cerevisiae*, nie jest równoważny z systemem opartym na fitochelatynach u *S. pombe*. Równocześnie pokazaliśmy po raz pierwszy, że fitochelatyny mogą być związane z opornością na antymon, a nie tylko na kadm, miedź, srebro, rtęć czy arsen.

Kolejnym zagadnieniem, które mnie interesuje i jest wciąż badane to regulacja ekspresji genu *ACR3* na poziomie inicjacji transkrypcji u drożdży *S. cerevisiae*. Ekspresja genów zaangażowanych w oporność na arsen – *YCF1* oraz *ACR2* i *ACR3* kontrolowana jest odpowiednio przez białka Yap1 i Yap8/Acr1 należące do drożdżowej rodziny czynników transkrypcyjnych YAP (Yeast Activator Protein). Cechą charakterystyczną tych białek jest obecność regionu zamka leucynowego oraz regionu zasadowego tworzących domenę bZIP odpowiedzialną za wiązanie białka Yap do specyficznej sekwencji DNA, tzw. YRE (Yap Response Element) oraz domen CRD (Cystein-Rich Domain) bogatych w cysteiny (Fernandes *et al.*, 1997). Oba te czynniki transkrypcyjne zaliczane są do rodziny białek AP-1 (Activator Protein 1). W porównaniu do Yap1, czynnik transkrypcyjny Yap8 jest stosunkowo słabo poznany, ale dzięki współpracy z grupą naukową prof. Markusa Tamása z Uniwersytetu w Gothenborgu od wielu lat intensywnie przez nas badany, czego rezultatem jest kilka wspólnych, tematycznie powiązanych publikacji

Białko Yap8 pozytywnie reguluje transkrypcję genów *ACR2* i *ACR3* ze wspólnej sekwencji promotorowej (Bobrowicz *et al.*, 1997). Wiele badań dokumentuje sekwencje rozpoznawalne przez czynnik Yap1 natomiast sekwencja rozpoznawalna przez czynnik Yap8 została poznana przez naszą grupę badawczą. Optymalna sekwencja rozpoznawalna przez czynnik transkrypcyjny Yap1 to sekwencja TTAATAA z centralnie położoną cytozyną (Fernandes *et al.*, 1997). W sekwencji promotora genu *ACR3* znaleziono pseudopalinidrom o sekwencji TTAATAA z centralnie położoną adenozyną. Podobieństwo tych sekwencji skłoniło nas ku hipotezie, że sekwencja TTAATTA rozpoznawana jest przez czynnik transkrypcyjny Yap8 (Wysocki R., Fortier P.K., **Maciaszczyk E.**, Odhagen A., Owsianik G., Ułaszewski S., Ramotar D. and Tamás, M. J. (2004) Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Molecular Biology of the Cell* 15(5): 2049-2060). W dalszych naszych badaniach okazało się, że delecja tej 7-nukleotydowej sekwencji w promotorze genu *ACR3* ma taki sam skutek, co delecja genu *YAP8*, tj. brak ekspresji *ACR2* i *ACR3* w obecności As(III) oraz fenotyp wrażliwości na arsen. Z drugiej strony sekwencja TTAATAA występuje także w promotorze samego genu *YAP8*, ale nie stwierdziliśmy przyłączania się białka Yap8 do własnego promotora. W tej samej

publikacji porównaliśmy lokalizację komórkową obu czynników transkrypcyjnych w odpowiedzi na stres arsenowy i wykazaliśmy, że w przeciwieństwie do Yap1, który akumuluje się w jądrze po zadziałaniu czynnika stresowego, białko Yap8 wykazuje stałą obecność w jądrze, gdzie związane jest z promotorem genu *ACR3* niezależnie od obecności arsenu w komórce. Przeanalizowaliśmy także rolę konserwatywnych cystein: C132 i C274, występujących we wszystkich drożdżowych białkach typu AP-1 w regionach n-CRD i c-CRD (Cysteine-Rich Domain) dla stabilizacji Yap8 w obecności As(III) oraz indukcji ekspresji genów *ACR2* i *ACR3*, pokazując, że obie reszty cysteinowe są niezbędne dla funkcji białka Yap8. Postawiliśmy hipotezę, że bezpośrednie związanie As(III) do C132 i C274 może indukować zmiany konformacyjne białka Yap8, co umożliwia aktywację ekspresji genów odpowiedzialnych za detoksykację arsenu. W powyższej publikacji wykazaliśmy także, że w odpowiedzi na stres arsenowy Yap1 akumuluje się w jądrze komórkowym i aktywuje transkrypcję genów, które biorą udział w obronie przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez arsen.

W publikacji Ilina Y., Sloma E., **Maciaszczyk-Dziubińska E.**, Novotny M., Thorsen M., Wysocki R., Tamás M.J. (2008) Characterization of the DNA-binding motif of the arsenic-responsive transcription factor Yap8p. *Biochemical Journal* 415:467-475 zajęliśmy się dokładną charakterystyką motywu nukleotydowego rozpoznawanego przez czynnik transkrypcyjny Yap8. Dzięki badaniom z wykorzystaniem skróconych wersji promotora genu *ACR3* wykazaliśmy, że dla trans-aktywacji tego promotora niezbędny i wystarczający jest region o długości -200 pz (od kodonu START), który zawiera sekwencję pseudopalindromową TGATTAATAATCA (YRE-1) rozpoznawaną przez Yap8, ale nie przez inne drożdżowe białka z rodziny AP-1, które preferują 7-nukleotydowy motyw YRE (TTACTAA) z centralnie położoną resztą C lub G (Wysocki *et al.*, 2004). Badania *in silico* wykazały w tym odcinku obecność jeszcze dwóch dodatkowych sekwencji pseudopalindromowych: YRE-2 (TGATTTAAAATCA) i YRE-3 (ACTTTTCAAAGT), które mogą być istotne dla przyłączania Yap8 i pełnej trans-aktywacji promotora *ACR3*. W tym celu przeprowadziliśmy mutagenezę, a następnie wykazaliśmy, że element YRE-3 jest zbędny do aktywacji promotora *ACR3*, podczas gdy mutacje w motywach YRE-1 i YRE-2 powodowały albo całkowitą inaktywację albo znaczne obniżenie aktywności promotora *ACR3*, sugerując, iż motyw YRE-2 może stanowić drugie miejsce wiązania czynnika Yap8 (dane nieopublikowane). Aby określić, co determinuje specyficzność wiązania Yap8 tylko do promotora genu *ACR3*, a nie do własnego, pomimo obecności tego samego motywu TTAATAA i opierając się na danych literaturowych, które wskazywały na rolę sekwencji flankujących w rozpoznawanych motywach przez czynniki transkrypcyjne Yap1 i Yap2 w determinacji ekspresji genów docelowych (Cohen *et al.*, 2002) dokonaliśmy podobnej analizy. Wprowadzenie mutacji do regionów flankujących motyw TGATTAATAATCA oraz zastosowanie techniki opóźnionej migracji kompleksów Yap8-DNA w żelu poliakrylamidowym (EMSA) pozwoliło na udowodnienie, że Yap8, ale nie Yap1, rozpoznaje znacznie dłuższą sekwencję pseudopalindromową, o długości 13-stu nukleotydów, a część rdzeniowa tego motywu TTAA/CTAA, choć niezbędna, nie jest wystarczająca dla przyłączenia Yap8. Co ciekawe, wszystkie organizmy, które posiadają ortologii Yap8 posiadają niezmienny 13-nukleotydowy motyw TGATTAATAATCA w promotorach genów *ACR2* i *ACR3*. Odmienne sekwencje flankujące motyw TTAATAA występują w promotorze genu *YAP8* (TTCTTAATAAATT), co tłumaczyłoby brak zdolności Yap8 do przyłączania się do własnego promotora. Analiza występowania motywu TGATTAATAATCA w genomie drożdży połączona z analizą transkryptomu pokazała, że u *S. cerevisiae* Yap8 jest wysoce wyspecjalizowany i reguluje jedynie ekspresję dwóch genów *ACR2* i *ACR3*.

Ostatnia nasza wspólna publikacja Veide Vilg J., Kumar N.V., **Maciaszczyk-Dziubińska E.**, Sloma E., Onesime D., Aubert J., Migocka M., Wysocki R., Tamás M.J. (2014) Elucidating the response of *Kluyveromyces lactis* to arsenite and peroxide stress and the role of the transcription factor KIYap8. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms* 1839(11):1295-306 dotyczy charakterystyki czynnika transkrypcyjnego Yap8 drożdży *Kluyveromyces lactis* i pozwala na zrozumienie aspektów ewolucji mechanizmu detoksykacji komórek drożdży z arsenu. Pokazaliśmy, że KIYap8 choć jest funkcjonalnym ortologiem ScYap8 pełni funkcję nie tylko w nadawaniu tolerancji na As(III) i Sb(III), ale także na Cd(II) i związki generujące stres oksydacyjny (*t*-BOOH). Badania transportu metali i metaloidów w komórkach wykazały, że brak genu Yap8 u *K. lactis* powoduje akumulację i zmniejszenie eksportu kadmu i arsenu, co związane jest prawdopodobnie z obniżeniem ekspresji odpowiednich transporterów. Wykazaliśmy także, że KIYap8 w odróżnieniu od ScYap8, może współdziałać z KIYap1 i regulować ekspresję szeregu genów zarówno w obecności As(III) jaki i *t*-BOOH rozpoznając 13-nukleotydomowy (TGATTAATAATCA) YRE-8 motyw w sekwencjach promotorowych tych genów, przy czym wyniki analiz EMSA potwierdziły, że szczególnie ważne w rozpoznawaniu tego motywu są nukleotydy flankujące (TGAXXXXXXTC) oraz konserwatywne nukleotydy w pozycji 1-5 i 9-13, podczas gdy pozycje 6-9 są mniej istotne. Geny, które są aktywowane przez KIYap8 w odpowiedzi na As(III) kodują białka, które są odpowiedzialne za: detoksykację arsenu, ochronę przed stresem oksydacyjnym, fałdowanie i degradację białek, transport toksyn, powstanie klasterów żelazo-siarkowych, zaś w odpowiedzi na stres oksydacyjny - białka odpowiedzialne za transkrypcję, translację, reakcje redoks, metabolizm i transport. Świadczyć to może, iż KIYap8 w odróżnieniu do ScYap8 odgrywa rolę w tolerancji komórek *K. lactis* na różne warunki stresowe, podczas gdy ScYap8 jest wysoce wyspecjalizowanym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym odpowiedź komórki tylko na stres arsenowy, a jego funkcjonalna specjalizacja musiała nastąpić dopiero po całkowitej duplikacji genomu (WGD, Whole Genome Duplication) drożdży *S. cerevisiae*.

Odrębny nurt badań, w których ostatnio biorę czynny udział, ale który nadal jest związany z transportem metali i metaloidów, to badania we współpracy z dr Magdaleną Migocką z Zakładu Fizjologii Roślin Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Wrocławskiego dotyczące wyjaśnienia procesów transportu metali przez błony komórek roślinnych. Zagadnienia, nad którymi się skupiamy wpisują się w nurt badań nad odpowiedzią roślin na stres metali ciężkich w środowisku. Jest to bardzo aktualna tematyka, bo z jednej strony podejmuje się próby efektywniejszego wykorzystania roślin jako źródła cennych metali (biofortyfikacja upraw), z drugiej strony selekcjonuje się rośliny zdolne do akumulacji i tolerancji dużych ilości metali dla celów fitoremediacji. W obu przypadkach ważne jest poznanie podstaw molekularnych i mechanizmów regulacji transportu metali przez rośliny. Celem naszych badań jest identyfikacja i charakterystyka białek błonowych zaangażowanych w aktywny transport jonów metali w komórkach roślinnych. Jako organizm modelowy wykorzystujemy ogórka siewnego (*Cucumis sativus*), ponieważ wcześniejsze badania wykazały, że w błonach plazmolemowych i tonoplastowych komórek tej rośliny funkcjonują aktywne systemy transportowe zużywające ATP lub gradient protonów do transportu metali. Korzystając z dostępnych baz genetycznych, zidentyfikowaliśmy w genomie ogórka geny kodujące dziewięć białek MTP/CDF (ang. Metal Transport Proteins/Cation Diffusion Facilitator) i osiem białek HMA (ang. Heavy Metal ATPases; P1B-ATPazy), które mogą mieć istotne znaczenie dla utrzymania homeostazy metali niezbędnych komórkom roślinnym (Zn, Cu) oraz detoksykacji tych komórek z metali balastowych, nie pełniących żadnych funkcji

biologicznych (Pb, Cd). Dotychczasowe badania z użyciem innych organizmów wskazują, że są to transportery aktywne, zależne od ATP (HMA) lub transportujące jony metali na drodze antyportu H^+/Me^{2+} , a więc zależne od gradientu protonów (MTP). Założyliśmy, że to białka MTP i HMA katalizują aktywny transport metali w błonach plazmolemowych i tonoplastowych komórek ogórka. Na podstawie podobieństwa do scharakteryzowanych dotąd białek bakteryjnych, zwierzęcych i białek roślin modelowych, białka MTP ogórka sklasyfikowaliśmy do trzech funkcjonalnych grup: Zn-CDF (CsMTP1, CsMTP4, CsMTP5, CsMTP12), Zn/Fe-CDF (CsMTP6, CsMTP7) i Mn-CDF (CsMTP8-CsMTP11) (Migocka *et al.*, 2014), sugerujących specyficzność substratową zidentyfikowanych transporterów. Podobna analiza wykonana dla białek HMA ogórka pozwoliła na klasyfikację tych transporterów do trzech odrębnych grup filogenetycznych: P1B1-ATPaz (CsHMA5.1, CsHMA5.2, CsHMA6, CsHMA7, CsHMA8), które prawdopodobnie transportują jony jednowartościowe Cu^+/Ag^+ oraz P1B2-ATPaz (CsHMA3 i CsHMA4) i P1B4-ATPaz (CsHMA1), które u organizmów modelowych transportują dwuwartościowe kationy metali $Cd^{2+}/Pb^{2+}/Co^{2+}/Zn^{2+}$ (Migocka *et al.*, 2015). Jak dotąd, scharakteryzowaliśmy funkcjonalnie geny kodujące cztery białka MTP (CsMTP1, CsMTP4, CsMTP8 i CsMTP9) oraz cztery białka HMA (CsHMA3, CsHMA4, CsHMA5.1 i CsHMA5.2) ogórka, wykorzystując szereg metod w tym systemy ekspresji heterologicznej w komórkach *S. cerevisiae* (MTP i HMA) oraz protoplastach i roślinach *Arabidopsis thaliana* (MTP), umożliwiające określenie lokalizacji, funkcji i biochemicznych właściwości transporterów ogórka. Nasze badania nad białkami MTP ogórka wykazały, że transportery CsMTP1, CsMTP4 i CsMTP8 lokalizują się w błonie wakuolarniej komórek tej rośliny a CsMTP9 w błonie plazmatycznej komórek endodermy korzeni (CsMTP9) i uczestniczą w utrzymaniu homeostazy cynku (CsMTP1 i CsMTP4) i manganu (CsMTP8 i CsMTP9) oraz w detoksykacji komórek z kadmu na drodze sekwestracji metali w wakuolach. Wykorzystując odpowiednie mutanty drożdży do ekspresji genów ogórka potwierdziliśmy także, że białka CsMTP1, CsMTP4, CsMTP8 i CsMTP9 funkcjonują jako antyportery kationowo/protonowe i tworzą oligomery w błonach wakuolarnych. Dodatkowo pokazaliśmy, że aktywność tych transporterów może być modyfikowana na poziomie transkrypcji, translacji lub modyfikacji post-translacyjnych przez poziom metali w środowisku, co potwierdza istotną funkcję tonoplastowych białek MTP ogórka w odpowiedzi rośliny na zanieczyszczenie środowiska Mn, Zn lub Cd. Efekty tych badań opublikowaliśmy w trzech czasopismach naukowych z tzw. "Listy Filadelfijskiej": Migocka M., Papierniak A., **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Poździk P., Posyniak E., Garbiec A., Filleur S. (2014) Cucumber metal transport protein MTP8 confers increased tolerance to manganese when expressed in yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 65(18):5367-84; Migocka M., Kosieradzka A., Papierniak A., **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Posyniak E., Garbiec A., Filleur S. (2015) Two metal-tolerance proteins, MTP1 and MTP4, are involved in Zn homeostasis and Cd sequestration in cucumber cells. *Journal of Experimental Botany* 66:1001-1015); Migocka M., Papierniak A., Kosieradzka A., Posyniak E., **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Robert Biskup R., Garbiec A., Marchewka T. (2015) Cucumber Metal Transport Protein CsMTP9 is a plasma membrane H^+ -coupled antiporter involved in the Mn^{2+} and Cd^{2+} efflux from root cells (2015) *The Plant Journal* doi: 10.1111/tpj.13056.

Badania nad białkami HMA ogórka prowadzimy wykorzystując głównie heterologiczne systemy drożdżowe. Analizy biochemiczne tych białek w błonach izolowanych z komórek drożdży potwierdziły, że białka HMA to ATP-azy, których aktywność jest ściśle powiązana z transportowanymi jonami metali. Wykazaliśmy, że podobne strukturalnie P1B2-ATPazy CsHMA3 i CsHMA4 wykazują odmienną lokalizację subkomórkową i organową (CsHMA3 - tonoplast komórek korzeni ogórka, CsHMA4 -

błona plazmatyczna komórek korzeni ogórka a także organów reprodukcyjnych) i zróżnicowaną specyficzność substratową: CsHMA3 uczestniczy w sekwestracji Cd i Pb w wakuolach, natomiast CsHMA4 odpowiada za usuwanie kadmu i nadmiaru cynku z komórek, a więc bierze udział w utrzymaniu homeostazy cynku w roślinie. Podobnie jak CsHMA3, P1B1-ATPazy CsHMA5.1 i CsHMA5.2 także lokalizują się w tonoplaście komórek ogórka, przy czym białko CsHMA5.1 jest specyficzne tylko dla korzeni rośliny, podczas gdy CsHMA5.2 występuje we wszystkich badanych organach ogórka (wegetatywnych i reprodukcyjnych). W przeciwieństwie do CsHMA3 i CsHMA4, CsHMA5.1 i CsHMA5.2 transportują jednowartościowe kationy metali Cu^+ i Ag^+ , a więc są odpowiedzialne za homeostazę miedzi w komórkach ogórka. Co ciekawe, obydwie białka są odmiennie regulowane przez poziom miedzi w środowisku: poziom transkrypty i białka CsHMA5.1 jest stały w komórkach i stosunkowo niski niezależnie od poziomu Cu, natomiast ekspresja genu CsHMA5.2 i poziom kodowanego przez niego białka znacznie wzrasta lub maleje w warunkach odpowiednio, nadmiaru lub braku metalu w środowisku. Wydaje się zatem, że funkcja białka CsHMA5.2 jest ściśle związana z detoksykacją komórek ogórka w warunkach nadmiaru miedzi w środowisku. Wyniki badań nad białkami HMA ogórka opublikowaliśmy w dwóch czasopismach naukowych z tzw. „Listy Filadelfijskiej”: Migocka M., Papierniak A., **Maciaszczyk-Dziubińska E.**, Posyniak E., Kosieradzka A. (2015) Molecular and biochemical properties of two P1B2-ATPases, CsHMA3 and CsHMA4, from cucumber. *Plant Cell & Environment* 38(6):1127-1141; Migocka M., Posyniak E., **Maciaszczyk-Dziubińska E.**, Papierniak A., Kosieradzka A. (2015) Functional and Biochemical Characterization of Cucumber Genes Encoding Two Copper ATPases CsHMA5.1 and CsHMA5.2. *Journal of Biological Chemistry* 290(25):15717-15729.

Obecnie, kontynuujemy współpracę nad białkami MTP ogórka realizując wspólnie projekt badawczy nr 2012/05/D/NZ1/01659 (2013-2016) finansowany przez NCN pt. "Znaczenie fizjologiczne transporterów metali ciężkich CsMTP5, CsMTP6 i CsMTP7, reprezentujących trzy odrębne filogenetycznie grupy w rodzinie białek MTP (Metal Transport Proteins) u ogórka".

Kilkuletnia współpraca z zespołem badawczym z Zakładu Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Wrocławskiego kierowanym przez prof. dr hab. Andrzeja Dżugaję, a następnie prof. dr hab. Dariusza Rakusa zaowocowała zarówno aktywnym udziałem jako wykonawca w czterech projektach badawczych: KBN 6P04A 045 26 (2004-2007), KBN N30/08131/2670 (2006-2008), MNiSW NN301/4163/33 (2007-2010), MNiSW N301 069139 (2010-2013), jak i licznymi publikacjami naukowymi dotyczącymi badań nad strukturą i funkcją ludzkiej mięśniowej fruktozo 1,6-bisfosfatazy (FBPazy) kluczowego enzymu gluko- i glikoneogenezy. Moja praca polegała na przygotowaniu szeregu mutantów oraz izolacji zmodyfikowanych białek z komórek *E. coli*, co pozwoliło na opisanie wielu cech tego enzymu.

W publikacji Rakus D., **Maciaszczyk E.**, Wawrzycka D., Ułaszewski S., Eschrich K., Dżugaj A. (2005) The origin of the high sensitivity of muscle fructose 1,6-bisphosphatase towards AMP. *FEBS Letters* 579(25):5577-5581 wskazaliśmy przyczynę różnic we wrażliwości na AMP pomiędzy mięśniową a wątrobową FBPazą. Kinetyczne właściwości obu enzymów są bardzo podobne, a podstawową różnicą jest znacznie silniejsze hamowanie przez AMP mięśniowej FBPazy niż wątrobowej FBPazy. Zastosowanie techniki mutagenyzy ukierunkowanej pozwoliło zamienić reszty aminokwasowe podejrzewane o udział w wiązaniu AMP do izoenzymu mięśniowego na te, które obecne są w enzymie wątrobowym (K20E,T177M,Q179C) i odwrotnie. Okazało się, że potrójne mutanty wątrobowe i mięśniowe FBPazy wykazują odmiennie właściwości wobec AMP – wątrobowy wysokie powinowactwo, ale niską wrażliwość, a mięśniowy –

zmniejszone hamowanie, ale wiązanie AMP na poziomie dzikiego wątrobowego enzymu. Wskazuje to na kluczową rolę K20, T177 i Q179 w silniejszym wiązaniu AMP przez enzym mięśniowy niż wątrobowy.

Inne badania dotyczyły mechanizmu hamującego wpływu jonów wapnia na FBPazę i zostały przedstawione w pracy Zarzycki M., **Maciaszczyk E.**, Dzugaj A. (2007) Glu 69 is essential for the high sensitivity of muscle fructose-1,6-bisphosphatase inhibition by calcium ions. *FEBS Letters* 581:1347-1350 i Rakus D., Gizak A., Kasprzak A.A., Zarzycki M., **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Dzugaj A. (2013) The mechanism of calcium-induced inhibition of muscle fructose 1,6-bisphosphatase and destabilization of glyconeogenic complex. *PLoS One* 8(10):e76669. Gizak i współpracownicy w 2004 roku pokazali, że wapń jest silnym inhibitorem FBPazy. Badania nad ssaczą wątrobową FBPazą pokazały, że istotne dla regulacji aktywności są zmiany stanów konformacyjnych w obrębie pętli 52-72 (Choe *et al.*, 1998). Porównując strukturę pierwszorzędową pętli 52-72 mięśniowej FBPazy z analogiczną strukturą FBPazy wątrobowej zaobserwowaliśmy, że Glu69 w mięśniowej FBPazie jest zastąpiona przez Gln w FBPazie wątrobowej. Uzyskaliśmy mutantą Glu69Gln izoenzymu mięśniowego oraz mutantą Gln69Glu enzymu wątrobowego i porównaliśmy ich właściwości kinetyczne. Powinowactwo mięśniowego mutantu FBPazy do jonów wapnia było 500-krotnie a do jonów magnezu 3-krotnie zmniejszone. Jednocześnie mutant wątrobowej FBPazy Gln69Glu wykazywał zwiększone powinowactwo do wapnia i do magnezu. Uzyskane wyniki, wskazują na kluczową rolę Glu69 dla wysokiego powinowactwa do jonów wapnia przez mięśniową FBPazę i mogą skłaniać ku hipotezie, iż pojedyncza mutacja Gln69Glu mogła być istotnym elementem podczas ewolucji FBPazy umożliwiając regulację procesu glikoneogenezy w komórkach mięśniowych przez jony wapnia. Dla uzyskanego mutantu Glu69Gln mięśniowego izoenzymu FBPazy określiliśmy także strukturę kryształu (Zarzycki M., Kołodziejczyk R., **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Wysocki R., Jaskolski M., Dzugaj, A. (2011) Structure of E69Q mutant of human muscle fructose-1,6-bisphosphatase. *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography* 67(Pt 12):1028-1034).

Czynnikiem odczuwającym mięśniową FBPazę na hamowanie przez AMP jest mięśniowa aldolaza (Rakus and Dzugaj 2000, Rakus *et al.* 2003), która tworzy z nią metabolon, w którym następuje bezpośrednio przekazywanie syntetyzowanego przez aldolazę substratu do FBPazy, bez uwalniania substratu do środowiska (Rakus *et al.* 2004). Zbadaliśmy molekularny mechanizm hamowania oraz regulacji kompleksu FBPaza-aldolaza w obecności jonów wapnia pokazując, iż Ca^{2+} hamuje mięśniową FBPazę poprzez zmiany w konformacji katalitycznej pętli 52-72 kompetytywnie do jonów dwuwartościowych (Mg^{2+} , Zn^{2+}), a także indukuje destabilizację kompleksu z aldolazą.

Prześledziliśmy także efekt delekcji dziesięciu wysoce konserwatywnych reszt aminokwasowych z N-końca ludzkiej mięśniowej FBPazy dla jej właściwości kinetycznych, lokalizacji i zdolności wiązania z aldolazą (Gizak A., **Maciaszczyk E.**, Dzugaj A., Eschrich K., Rakus D. (2008) Evolutionary conserved N-terminal region of human muscle fructose 1,6-bisphosphatase regulates its activity and the interaction with aldolase. *Proteins - Structure, Functions and Bioinformatics* 72:209-216). Pokazaliśmy, iż Arg4 i Ser5 z N-końca FBPazy mogą być odpowiedzialne za interakcję z aldolazą, a skrócone formy FBPazy są nie tylko mniej wrażliwe na hamowanie przez AMP, ale także znacząco słabiej aktywowane przez jony magnezu w porównaniu do dzikiej formy mięśniowego i wątrobowego enzymu a także mają mniejsze powinowactwo do aldolazy, ale nie wpływają na lokalizację FBPazy we włóknach mięśniowych.

We włóknach mięśni szkieletowych FBPaza jest zlokalizowana na linii Z (Gizak *et al.* 2003), a w kardiomiocytach na linii Z i w jądrach komórkowych (Gizak and Dzugaj

2003). W komórkach mięśni gładkich FBPaza jest widoczna tylko w jądrach komórkowych (Gizak *et al.* 2005), a w komórce mięśni szkieletowych kolokalizuje z aldolazą na linii Z (Rakus *et al.* 2003). Publikacja Gizak A., **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Jurowicz M., Rakus, D. (2009) Muscle FBPase is targeted to nucleus by its 203KKKGGK207 sequence. *Proteins - Structure, Functions and Bioinformatics* 77:262-267 pokazuje efekty naszej analizy potencjalnej sekwencji sygnałowej do jądra komórkowego (NLS, Nuclear Localization Signal) obecnej w mięśniowej FBPazie potwierdzając istotny udział całego motywu ²⁰³KKKGGK₂₀₇ we właściwym imporcie enzymu do jądra komórkowego kardiomiocytów.

Relacje pomiędzy kompleksem mięśniowej FBPazy i aldolazy zlokalizowanym na linii Z sarkomerów a obecną tam także kinazą syntazy glikogenu przedstawiliśmy w publikacji Gizak A., Mazurek J., Wozniak M., **Maciaszczyk-Dziubinska E.**, Rakus D. (2013) Destabilization of fructose 1,6-bisphosphatase-Z-line interactions is a mechanism of glycogenesis down-regulation *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* 1833(3):622-628. Pokazaliśmy, że mięśniowa FBPaza może być celem w szlaku kinazy syntazy glikogenu (GSK3) *in vivo* i substratem dla niej *in vitro*, a zahamowanie GSK3 powoduje zmniejszone oddziaływanie FBPazy z linią Z i równoczesne zmniejszenie zawartości glikogenu w mięśniach, co skłania ku hipotezie, iż zahamowanie GSK3 w mięśniach szkieletowych kręgowców powoduje obniżenie glikoneogenezy poprzez destabilizację kompleksu glikoneogenetycznego spowodowanego odłączeniem FBPazy od linii Z (i aldolazy).

V. Plany na przyszłość

Prace, których celem jest dogłębna charakterystyka mechanizmu interakcji czynnika transkrypcyjnego Yap8 z promotorem genu *ACR3* oraz praktyczne ustalenie topologii antyportera Acr3 w błonie komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, są przeze mnie kontynuowane w ramach projektu badawczego „Transporter arsenowy Acr3 - regulacja ekspresji i mechanizm translokacji arsenu przez błonę komórkową” NCN 2012/07/B/NZ1/02804, kierownik projektu prof. dr hab. Robert Wysocki, w którym jestem głównym wykonawcą.

Głównym zadaniem, nad którym pracujemy to ustalenie liczby regionów transbłonowych w białku Acr3, które mogą tworzyć ścieżkę transportu dla As(OH)₃ i H⁺, gdyż analizy komputerowe wskazują na 9 lub 10 takich regionów, a wątpliwą domeną jest TM9, w której zlokalizowanych jest kilka konserwatywnych reszt aminokwasowych, a zatem określenie topologii wydaje się być niezbędne do zrozumienia procesu translokacji arsenu przez białko Acr3.

Pracujemy też nad mechanizmami regulacji ekspresji genu *ACR3* przez czynnik transkrypcyjny Yap8, w tym staramy się określić, co odpowiada za specyficzność aktywatora transkrypcji Yap8 wobec promotora *ACR3*; w szczególności badamy, które aminokwasy sąsiadujące z konserwatywną domeną zasadową (RxxQLRxSQxxFRxR) wiążącą motywy YRE mogą być istotne dla zdolności aktywacji transkrypcji genu *ACR3* przez Yap8.

VI. Literatura

Achour, A.R., Bauda, P., Billard, P. (2007) Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* 158:128–137.

Baker, N., de Koning, H.P., Maser, P., Horn, D. (2013) Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story. *Trends in parasitology* 29:110-118.

- Beese, S.E., Negishi, T., Levin, D.E. (2009) Identification of positive regulators of the yeast *fps1* glycerol channel. *PLoS Genet.* 5(11):e1000738.
- Bobrowicz, P., Wysocki, R., Owsianik, G., Goffeau, A., Ulaszewski, S. (1997) Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13:819-828.
- Chappuis, F. (2007) Melarsoprol-free drug combinations for second-stage Gambian sleeping sickness: the way to go. *Clin. Infect. Dis.* 45:1443-1445.
- Choe, J.Y., Poland, B.W., Fromm, H.J., Honzatko, R.B. (1998). Role of a dynamic loop in cation activation and allosteric regulation of recombinant porcine fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochemistry* 37:11441-11450.
- Cohen, B.A., Pilpel, Y., Mitra, R.D., and Church, G.M. (2002). Discrimination between paralogs using microarray analysis: application to the Yap1p and Yap2p transcriptional networks. *Mol. Biol. Cell* 13:1608-1614.
- Delaunay, A., Isnard, A.D., Toledano, M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* 19:5157-5166.
- Dilda, P.J., Hogg, P.J. (2007) Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat. Rev.* 33:542-564.
- Fernandes L., Rodrigues-Pousada C., Struhl K. (1997) Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.* 17:6982-6993.
- Frézard, F., Demicheli, C. (2010) New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 7:1343-1358.
- Fu, H. L., Meng, Y., Ordonez, E., Villadangos, A. F., Bhattacharjee, H., Gil, J. A., Mateos, L. M., Rosen, B. P. (2009) Properties of arsenite efflux permeases (*Acr3*) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 284:19887-19895.
- Garelick, H., Jones, H., Dybowska, A., Valsami-Jones, E. (2008) Arsenic pollution sources. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 197:17-60.
- Ghosh, M., Shen, J., Rosen, B.P. (1999) Pathways of As(III) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5001-5006.
- Gizak, A., Rakus, D., Dzugaj, A. (2003) Immunohistochemical localization of human fructose-1,6-bisphosphatase in subcellular structures of myocytes. *Histol. Histopathol.* 18:135-142.
- Gizak, A., and Dzugaj, A. (2003) FBPase is in the nuclei of cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 539:51-55.
- Gizak, A., Majkowski, M., Dus, D., Dzugaj, A. (2004) Calcium inhibits muscle FBPase and affects its intracellular localization in cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 576:445-448.
- Gizak, A., Rakus, D., Dzugaj, A. (2005) Nuclear localization of fructose-1,6-bisphosphatase in smooth muscle cells. *J. Mol. Histol.* 36:243-248.
- Gizak, A., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Jurowicz, M., Rakus, D. (2009) Muscle FBPase is targeted to nucleus by its 203KKKGGK207 sequence. *Proteins* 77:262-267
- Gizak, A., Mazurek, J., Wozniak, M., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Rakus, D. (2013) Destabilization of fructose 1,6-bisphosphatase-Z-line interactions is a mechanism of glyconeogenesis down-regulation *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1833(3):622-628.
- Hu, N.J., Iwata, S., Cameron, A.D., and Drew, D. (2011) Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT. *Nature* 478:408-411.
- Iilina, Y., Sloma, E., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Novotny, M., Thorsen, M., Wysocki, R., Tamás, M.J. (2008) Characterization of the DNA-binding motif of the arsenic-responsive transcription factor Yap8p. *Biochem. J.* 415:467-475.

- Indriolo, E., Na, G., Ellis, D., Salt, D.E., Banks, J.A. (2010) A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *Plant Cell* 22:2045–2057.
- Litwin, I., Lis, P., Maciaszczyk-Dziubińska, E. (2009) Dwie twarze arsenu. *Kosmos* 58:187–198.
- Lis P., Litwin I., Maciaszczyk-Dziubinska E. (2010) Mechanizmy transportu nieorganicznych związków arsenu do komórek prokariotycznych i eukariotycznych. *Post. Biochem.* 56:400–408.
- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J.M., Mukhopadhyay, R., Agre, P., Rosen, B.P. (2002) Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6053–6058.
- López-Maury, L., Florencio, F.J., Reyes, J.C. (2003) Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 185:5363–5371.
- Wysocki, R., Clemens, S., Augustyniak, D., Golik, P., Maciaszczyk, E., Tamas, M.J., Dziadkowiec, D. (2003) Metalloid tolerance based on phytochelatins is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:293–300.
- Maciaszczyk, E., Ulaszewski, S., Lazowska, J. (2004) Intragenic suppressors that restore the activity of the maturase encoded by the second intron of the *Saccharomyces cerevisiae* *cyt b* gene. *Curr. Genet.* 46:67–71.
- Maciaszczyk, E., Wysocki, R., Golik, P., Lazowska, J., Ulaszewski, S. (2004) Arsenical resistance genes in *Saccharomyces douglasii* and other yeast species undergo rapid evolution involving genomic rearrangements and duplications. *FEMS Yeast Res.* 4:821–832.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Migdal, I., Migocka, M., Bocer, T., Wysocki, R. (2010) The yeast aquaglyceroporin Fps1p is a bidirectional arsenite channel. *FEBS Lett.* 584:726–732.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Wawrzycka, D., Sloma, E., Migocka, M., Wysocki, R. (2010) The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1798:2170–2175.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Migocka, M., Wysocki, R. (2011) Acr3p is a plasma membrane antiporter that catalyzes As(III)/H⁺ and Sb(III)/H⁺ exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1808:1855–1859.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Wawrzycka, D., Wysocki, R. (2012) Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *International Journal of Molecular Sciences* 13(3):3527–3548.
- Maciaszczyk-Dziubinska, E., Migocka, M., Wawrzycka, D., Markowska, K., Wysocki, R. (2014) Multiple cysteine residues are necessary for sorting and transport activity of the arsenite permease Acr3p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1838:747–755.
- Mansour, N.M., Sawhney, M., Tamang, D.G., Vogl, C., Saier, M.H., Jr (2007) The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J.* 274:612–629.
- Markowska, K., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Migocka, M., Wawrzycka, D., Wysocki, R. (2015) Identification of critical residues for transport activity of Acr3p, the *Saccharomyces cerevisiae* As(III)/H⁺ antiporter. *Mol. Microbiol.* 98:162–174.
- Martinez, V.D., Vucic, E.A., Becker-Santos, D.D., Gil, L., Lam, W.L. (2011) Arsenic exposure and the induction of human cancers. *J. Toxicol.* 2011:431287.
- Migdal, I., Ilina, Y., Tamás, M.J., Wysocki, R. (2008) Mitogen-activated protein kinase Hog1 mediates adaptation to G1 checkpoint arrest during arsenite and hyperosmotic stress. *Eukaryot. Cell* 7:1309–1317.
- Migocka, M., Papierniak, A., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Poździk, P., Posyniak, E., Garbiec, A., Filleur S. (2014) Cucumber metal transport protein MTP8 confers increased tolerance to manganese when expressed in yeast and *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 65:5367–84.

- Migocka, M., Papierniak, A., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Posyniak, E., Kosieradzka, A. (2015) Molecular and biochemical properties of two P1B2 -ATPases, CshMA3 and CshMA4, from cucumber. *Plant Cell Environ.* 38:1127–1141.
- Migocka, M., Kosieradzka, A., Papierniak, A., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Posyniak, E., Garbiec, A., Filleur, S. (2015) Two metal-tolerance proteins, MTP1 and MTP4, are involved in Zn homeostasis and Cd sequestration in cucumber cells. *J. Exp. Bot.* 66:1001–1015.
- Migocka, M., Posyniak, E., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Papierniak, A., Kosieradzka, A. (2015) Functional and Biochemical Characterization of Cucumber Genes Encoding Two Copper ATPases CshMA5.1 and CshMA5.2. *J. Biol. Chem.* 290:15717–15729.
- Mollapour, M., Piper, M.W. (2007) Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol. Cell. Biol.* 27:6446–6456.
- Mukhopadhyay, R., Shi, J., Rosen, B.P. (2000) Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J. Biol. Chem.* 275:21149–21157.
- Nordstrom, D.K. (2002) Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* 296:2143–2145.
- Rakus, D., and Dzugaj, A. (2000) Muscle aldolase decreases muscle FBPase sensitivity toward AMP inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275:611–616.
- Rakus, D., Pasek, M., Krotkiewski, H., Dzugaj, A. (2003) Muscle FBPase in a complex with muscle aldolase is insensitive to AMP inhibition. *FEBS Lett.* 547:11–14.
- Rakus, D., Pasek, M., Krotkiewski, H., Dzugaj, A. (2004) Interaction between muscle aldolase and muscle fructose-1,6-bisphosphatase results in the substrate channeling. *Biochemistry* 43:14948–14957.
- Rakus, D., Maciaszczyk, E., Wawrzycka, D., Ułaszewski, S., Eschrich, K., Dzugaj, A. (2005) The origin of the high sensitivity of muscle fructose 1,6-bisphosphatase towards AMP. *FEBS Lett.* 579:5577–5581.
- Rakus D., Gizak A., Kasprzak A.A., Zarzycki M., Maciaszczyk-Dziubinska E., Dzugaj A. (2013) The mechanism of calcium-induced inhibition of muscle fructose 1,6-bisphosphatase and destabilization of glyconeogenic complex. *PLoS One* 8:e76669.
- Rosen, B.P., and Tamás, M.J. (2010) Arsenic transport in prokaryotes and eukaryotic microbes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 679:47–55.
- Sharma, A.K., Tjell, J.C., Sloth, J.J., Holm, P.E. (2014) Review of arsenic contamination, exposure through water and food and low cost mitigation options for rural areas. *Appl. Geochem.* 41:11–33.
- Shi, Y. (2013) Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu. Rev. Biophys.* 42:51–72.
- Tamás, M.J., Wysocki R. (2001) Mechanisms involved in metalloids transport and acquisition. *Curr. Genet.* 40:2–12.
- Tamás, M.J., Labarre, J., Toledano, M.B., Wysocki, R. (2005). Mechanisms of toxic metal tolerance in yeast. In: Molecular biology of metal homeostasis and detoxification: from microbes to man, eds. M.J. Tamás and E. Martinoia, Heidelberg: Springer Verlag, pp 395-454.
- Tapio, S., Grosche, B. (2006) Arsenic in the etiology of cancer. *Mutat. Res.* 612:215–246.
- Thorsen, M., Di, Y., Tängemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der Does, C., Wagner, A., Johansson, E., Boman, J., Posas, F., Wysocki, R., Tamás, M.J. (2006) The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 17:4400–4410.
- Thorsen, M., Jacobson, T., Vooijs, R., Navarrete, C., Blik, T., Schat, H., Tamás, M.J. (2012) Glutathione serves an extracellular defence function to decrease arsenite accumulation and toxicity in yeast. *Mol. Microbiol.* 84:1177–1188.

- Xia, X., Postis, V.L., Rahman, M., Wright, G.S., Roach, P.C., Deacon, S.E., Ingram, J.C., Henderson, P.J., Findlay, J.B., Phillips, S.E., McPherson, M.J., Baldwin, S.A. (2008) Investigation of the structure and function of a *Shewanella oneidensis* arsenical-resistance family transporter. *Mol. Membr. Biol.* 25:691–705.
- Wawrzycka, D., Sobczak, I., Bartosz, G., Bocser, T., Ułaszewski, S., Goffeau, A. (2010) Vmr 1p is a novel vacuolar multidrug resistance ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 10:828–838.
- Wysocki, R., Bobrowicz, P., Ułaszewski, S. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J. Biol. Chem.* 272:30061–30066.
- Wysocki, R., Bobrowicz, P., Ułaszewski, S. (1999) Mechanizm oporności na związki arsenu u prokariotów i eukariotów. *Post. Biochem.* 45:304–312.
- Wysocki, R., Chéry, C.C., Wawrzycka, D., Van Hulle, M., Cornelis, R., Thevelein, J.M., Tamás, M.J. (2001) The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 40:1391–1401.
- Wysocki, R., Clemens, S., Augustyniak, D., Golik, P., Maciaszczyk, E., Tamás, MJ, Dziadkowiec, D. (2003) Metalloid tolerance based on phytochelatin is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:293–300.
- Wysocki, R., Fortier, P.K., Maciaszczyk, E., Thorsen, M., Leduc, A., Odhagen, A., Owsianik, G., Ułaszewski, S., Ramotar, D., Tamás, M.J. (2004) Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Mol. Biol. Cell* 15:2049–2060.
- Veide Vilg, J., Kumar, N.V., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Sloma, E., Onesime, D., Auber, J., Migocka, M., Wysocki, R., Tamás, M.J. (2014) Elucidating the response of *Kluyveromyces lactis* to arsenite and peroxide stress and the role of the transcription factor K1Yap8. *Biochim. Biophys. Acta* 1839:1295–306.
- Villadangos, A.F., Fu, H.L., Gil, J.A., Messens, J., Rosen, B.P., and Mateos, L.M. (2012) Efflux permease CgAcr3-1 of *Corynebacterium glutamicum* is an arsenite-specific antiporter. *J. Biol. Chem.* 287:723–735.
- Zarzycki, M., Maciaszczyk, E., Dzugaj, A. (2007) Glu 69 is essential for the high sensitivity of muscle fructose-1,6-bisphosphatase inhibition by calcium ions. *FEBS Lett.* 581:1347–1350.
- Zhou, X., Levin, E.J., Pan, Y., McCoy, J.G., Sharma, R., Kloss, B., et al. (2014) Structural basis of the alternating access mechanism in a bile acid transporter. *Nature* 505:569–573.
- Zhu, H.H., Qin, Y.Z., Huang, X.J. (2014) Resistance to arsenic therapy in acute promyelocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 370:1864–1866.

Ewa Maciaszczyk-Dziubińska