

*Załącznik nr 2  
do Wniosku z dnia 05.04.2019 r  
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego*

**Donata Wawrzycka**

**Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki  
Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Wydział Nauk Biologicznych  
Uniwersytet Wrocławski**

**AUTOREFERAT**

**Wrocław 2019**

## 1. Imię i Nazwisko

Donata Małgorzata Wawrzycka

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

**Magister biologii**, studia ukończone w 1996 roku na Wydziale Nauk Przyrodniczych (obecnie Wydział Nauk Biologicznych) Uniwersytetu Wrocławskiego, praca magisterska pt. „Charakterystyka fenotypowa wybranych mutantów delecyjnych *Saccharomyces cerevisiae* w kierunku koniugacji i sporulacji”; promotor pracy magisterskiej: dr Gabriela Matuszewska-Orłowska

**Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii**, stopień uzyskany w 2000 roku na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego, na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Analiza funkcjonalna genów kodujących transportery ABC i genu *YPR117* w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*” promotor: prof. Stanisława Ułaszewski, recenzenci: prof. dr hab. Witold Jachymczyk i prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak

## 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

**2001-2002:** asystent w Zakładzie Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski

**2002-2005:** adiunkt w Zakładzie Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego

**2006-2008:** post doc Universite Catholique de Louvain, Louvain-La-Neuve, Belgia

**2009-2010:** adiunkt w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii Wydział Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego

**2010- do chwili obecnej:** adiunkt w Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego

## 4. Wykazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zmianami):

### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

**Charakterystyka wybranych białek błonowych warunkujących tolerancję drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na ksenobiotyki**

### 4.2. Autor/Autorzy, rok, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa <sup>1</sup>

1. **Wawrzycka D**, Sobczak I, Bartosz G, Bocer T, Ułaszewski S, Goffeau A (2010) Vmr 1p is a novel vacuolar multidrug resistance ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 10(7):828-38  
**IF 2,279 IF<sub>2018</sub> 2,609 IF<sub>5-letni</sub> 3,022 MNiSW 30; Liczba cytowań wg. Web of Science - 17**
2. Kołaczowska A, Manente M, Kołaczowski M, Laba J, Ghislain M, **Wawrzycka D** (2012) The regulatory inputs controlling pleiotropic drug resistance and hypoxic response in yeast converge at the promoter of the aminocholesterol resistance gene RTA1. *FEMS Yeast Research*. 2012;12(3):279-92.

**IF 2,462; IF<sub>2018</sub> 2,609 IF<sub>5-letni</sub>: 3,022; MNiSW 30; Liczba cytowań wg. Web of Science - 7**

3. Maciaszczyk-Dziubinska E, **Wawrzycka D**, Wysocki R (2012) Arsenic and antimony transporters in eukaryotes *International Journal of Molecular Sciences*. 13(3):3527-48  
**IF 2,598 IF<sub>2018</sub> 3,689 IF<sub>5-letni</sub> 3.878 MNiSW 30 Liczba cytowań wg. Web of Science - 43**

4. **Wawrzycka D**, Markowska K, Maciaszczyk-Dziubinska E, Migocka M, Wysocki R (2017) Transmembrane topology of the arsenite permease Acr3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2017 ;1859(1):117-125

**IF 3,498; IF<sub>2018</sub> 3,438 IF<sub>5-letni</sub> 3,640 ; MNiSW 35; Liczba cytowań wg. Web of Science – 1**

5. **Wawrzycka D.**, Sadlak J., Maciaszczyk-Dziubinska E., Wysocki R., (2019) Rsp5-dependent endocytosis and degradation of the arsenite transporter Acr3 requires its N-terminal acidic tail as an endocytic sorting signal and arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembrane* 1861(5): 916-925  
**IF 3,498; IF<sub>2018</sub> 3,438 IF<sub>5-letni</sub> 3,640; MNiSW 35; Liczba cytowań wg. Web of Science – 0**

<sup>1</sup> Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w Załączniku 6.

### **4.3. Omówienie celu naukowego w/w. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### **4.3.1 WSTĘP**

Utrzymanie homeostazy jest kluczowym zadaniem organizmu, dlatego komórki wszystkich organizmów wytworzyły mechanizmy obrony przez szkodliwymi egzo- i endogennymi czynnikami. Oporność wielolekowa jest powszechnym zjawiskiem o ogromnym znaczeniu dla medycyny, przemysłu i ekonomii. Komórki mikroorganizmów w bardzo szybkim tempie są w stanie nabyć cechy oporności na leki czy cytostatyki. Powoduje to rozpowszechnianie populacji odpornej na stosowane chemioterapeutyki. **Oporność wielolekowa polegająca na rozwinięciu przez komórkę oporności na szereg nie powiązanych ze sobą strukturalnie i funkcjonalnie związków jest problemem nie tylko w terapiach antybakteryjnych czy grzybiczych, ale również w terapiach antynowotworowych czy ochronie roślin** (Morschhäuser 2010; Szakács i wsp., 2006; De Waard i wsp., 2006; Housman i wsp., 2014). Zauważono, że nie tylko mikroorganizmy, ale również komórki nowotworowe nabywają fenotyp oporności na stosowane chemioterapeutyki już w czasie leczenia (Mattern i Volm, 1993; Housman i wsp., 2014).

W celu neutralizacji szkodliwych czynników komórki mogą użyć różnych mechanizmów: inaktywacji enzymatycznej inhibitora (np. hydroliza antybiotyków  $\beta$ -laktamowych (Livermore, 1995), modyfikacji celu działania cytostatyków (np. mutacja powodująca niewielką zmianę struktury, konformacji lub poziomu ekspresji białka stanowiącego cel inhibitora (Nittis i Beck., 1996; Holohan i

wsp., 2013), zmiany przepuszczalności błony (np. modyfikacja poryn; Nikado., 2003) i aktywne usuwanie z cytoplazmy. Analizując mechanizmy obrony komórki przed ksenobiotykami należy pamiętać, że w większości przypadków komórka wykorzystuje jednocześnie więcej niż jeden mechanizm. Uważa się jednak, że **najważniejszym mechanizmem obrony komórek przed toksycznym działaniem różnych związków jest uruchomienie systemów pozwalających na usuwanie ksenobiotyków z cytoplazmy poprzez ich transport do wakuoli lub na zewnątrz komórki dzięki systemowi wyspecjalizowanych białek błonowych.**

W badaniach mechanizmów oporności komórek eukariotycznych na różnego rodzaju inhibitory i stres od lat wykorzystuje się modelowy organizm jakim są drożdże piekarnicze *Saccharomyces cerevisiae*, których komórki pod względem złożoności budowy nie różnią się od wyższych organizmów, cechując je natomiast typowy dla mikroorganizmów krótki czas generacji, łatwość uzyskania i analizy mutantów, szeroka gama wykorzystywanych metod i podłoży (Mell i Burgess; 2002). Większość genów drożdżowych ma homologii u wyższych eukariontów, a komórki drożdży są z powodzeniem używane do badania białek zwierzęcych i roślinnych w układzie heterologicznej ekspresji (Mell i Burgess, 2002).

Analiza genomu drożdży *S. cerevisiae* wykazała obecność 258 potencjalnych transporterów błonowych. Ze względu na podobieństwo sekwencji transportery podzielono na 42 rodziny, wśród których znalazły się między innymi białka kanałowe, transportery aktywne (tzw. ATPazy transportujące), transportery wtórne (antyportery, symportery i uniportery) i translokazy (Paulsen i wsp., 1998; Saier, 2000). W przypadku badania mechanizmów oporności komórek na inhibitory szczególną uwagę zwrócono na białka transporterów zaklasyfikowane do podrodzin: ABC transporterów (ATP-binding cassette transporters) i MFS (Major Facilitator Superfamily). Białka ABC transporterów i MFS zidentyfikowano u wszystkich organizmów (Goffeu and Balzi., 1994).

Główna uwaga prowadzonych przeze mnie badań skupiała się na **identyfikacji i charakterystyce roli wybranych białek błonowych w odpowiedzi komórkowej na stres wywołany obecnością ksenobiotyków z wykorzystaniem modelu drożdżowego.**

#### **4.3.2 Rola Vmr1 w wielolekowej oporności komórek drożdży**

Pierwsza publikacja przedstawiona jako osiągnięcie naukowe (Wawrzycka D, Sobczak I, Bartosz G, Bocer T, Ułaszewski S, Goffeau A (2010) Vmr1p is a novel vacuolar multidrug resistance ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 10(7):828-38; załącznik 5.1) dotyczyła charakterystyki genu *VMR1*. **Była to pierwsza analiza funkcjonalna genu *YHL035c/VMR1*.**

Gen *YHL035c/VMR1* zlokalizowany jest na chromosomie VIII drożdży *S. cerevisiae*. Analiza porównawcza sekwencji genu *VMR1* pozwoliła na zaklasyfikowanie go do ABC transporterów, ATPaz transportujących, które wyrzucają substraty z cytoplazmy na zewnątrz komórki, wykorzystując energię pozyskaną z hydrolizy ATP (Pedersen., 2007). Rodzina ta obejmuje ponad 200 białek eukariotycznych

i prokariotycznych, z których większość związana jest z transportem substratów przez błony biologiczne. Substratami tych transporterów mogą być zarówno małe cząsteczki jak również duże hydrofobowe kompleksy cytostatyków czy antybiotyków. Niektóre z transporterów wykazują specyficzną substratową, wiele z nich jednak wykazuje zdolność transportu niepowiązanych funkcjonalnie czy strukturalnie związków, stanowią one główną podstawę wielolekowej oporności komórek. Typowy ABC transporter zbudowany jest z 1-2 domen NBD (Nucleotide-binding domain; NBD1 i NBD2) wiążących i hydrolizujących ATP i 1-2 hydrofobowych domen transmembranowych TMD (TransMembrane Domain; TMD1 i TMD2) (Taglicht i Michaelis, 1998). Podstawą klasyfikacji białka do rodziny ABC transporterów są specyficzne tylko dla tej rodziny, 200 aminokwasowe, wysoce konserwatywne regiony (tzw. Walker A, Walker i SGG(Q)) w obszarze domeny NBD.

### **Vmr1 należy do klasy MRP/CFTR rodziny ABC transporterów**

Przeprowadzona w ramach przedstawianych badań analiza porównawcza sekwencji pozwoliła na **zaklasyfikowanie Vmr1 do klasy MRP/CFTR rodziny ABC transporterów** (odpowiednik podrodziny ABCC u ludzi). Białka z tej klasy swoją topologią przypominają ludzki transporter CFTR (Cystic Fibrosis Chloride Chanel) związany z mukowiscydozą i MRP1 (Multidrug Resistance-Associated Protein), ludzkie białko odpowiedzialne m.in. za wielolekową oporność komórek nowotworowych na chemioterapeutyki (Dean, 2002). Wśród drożdżowych białek ABC do podgrupy MRP/CFTR zakwalifikowano: Ycf1, Bpt1, Ybt1, Nft1, Yor1 i będący tematem niniejszych badań Vmr1 (Paumi i wsp., 2009). Białko Ycf1 (Yeast Cadmium factor) odpowiedzialne jest za detoksykację metali (Cd, Hg, As) poprzez usuwanie ich w formie koniugatów z glutationem (GS) do wakuoli (Li i wsp., 1996; Wemmie i Moye-Rowley, 1997). Podobnie Bpt1 (Bile pigment transporter) usuwa koniugaty Cd-GS z cytoplazmy do wakuoli (Klein i wsp., 2002; Sharma i wsp., 2002) transportuje również nieskoniugowana bilirubinę (Petrovic i wsp., 2000). Za transport kwasów żółciowych z cytoplazmy do wakuoli odpowiedzialny jest Ybt1 (Yeast bile transporter) (Ortiz i wsp., 1997). Transporter Yor1 (Yeast oligomycine resistance) lokalizuje się w błonie komórkowej i jest odpowiedzialny za wielolekową oporność (Katzmann i wsp., 1995; Decottignies i wsp., 1998). Funkcja Nft1 nie została dotychczas scharakteryzowana, natomiast Vmr1 został scharakteryzowany w ramach niniejszej pracy.

W pracy wykonaliśmy analizę filogenetyczną porównując 300 aminokwasowy N-końcowy fragment białka Yhl035c/Vmr1 z pozostałymi drożdżowymi białkami należącymi do tej samej klasy. Wyniki pozwoliły na wyróżnienie trzech grup. **W jednej z grup znalazły się Vmr1 i Ybt1, co wskazuje na ich bliskie pokrewieństwo filogenetyczne.** W przypadku tych białek wykazano podobieństwo w 180 na 300 analizowanych aminokwasów z domeny NBD. Porównanie całych sekwencji aminokwasowych białek Vmr1 i Ybt1 wskazało na 64% identyczności. Analiza całego genomu drożdżowego wykazała natomiast, że region chromosomu obejmujący ORF *YHL035c/VMR1* został

zduplikowany, w rezultacie czego *VMRI* znajduje się chromosomie VIII, a jego paralog *YBT1* na chromosomie XII.

### ***VMRI* warunkuje oporność na wiele różnych inhibitorów**

W celu poznania funkcji genu *VMRI*, skonstruowano mutanty delecyjne, które poddano analizie fenotypowej. Analiza ta polegała na testach zahamowania wzrostu w obecności ponad 60 różnych inhibitorów, antybiotyków, chemioterapeutyków, detergentów i związków metali. **Zaobserwowaliśmy, że delecja genu *VMRI* uwrażliwia komórki na niezwiązane strukturalnie i funkcjonalnie, toksyczne związki: higromycnę B (antybiotyk aminoglikozydowy), cykloheksymid (inhibitor translacji), kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (herbicyd), diuron (herbicyd), 1,10-fenantrolinę (inhibitor metalopeptydaz), piperydynę (lek antymikrobowy, składnik leków psychotropowych), polidokanol (niejonowy detergent), chlorek trifenyloctetrazoliowy (barwnik), 8-hydroksychinolina (związek bakteriobójczy i grzybobójczy), N-tlenek-4 nitrochinoliny (mutagen, karcynogen), 2,4-dinitrofenol (herbicyd), rodaminę 6G (barwnik fluorescencyjny).** Pomimo dużego podobieństwa do Ybt1, delecja genu *VMRI* nie spowodowała wrażliwości na kwas glikochenodeoksycholowy i kwas taurocholowy, które są substratami białka Ybt1. Określono więc, że **białko Vmr1 odgrywa ważną rolę w generowaniu wielolekowej oporności komórek, a wzór wrażliwości nie pokrywa się z żadnym z dotychczas opisanych ABC transporterów.**

Ponieważ inne białka z klasy MRP jak Ycf1 i Bpt1, są odpowiedzialne za detoksykację komórki ze związków kadmu, sprawdzano również, czy kadm może być substratem dla Vmr1. **Wykazano, że delecja genu uwrażliwia komórki na związki kadmu** w dużym stopniu, ale tylko w przypadku wzrostu na niefermentowalnych źródłach węgla (etanol/glicerol). Komórki szczepu nie wykazywały wrażliwości na kadm w obecności glukozy, nawet przy jednoczesnym braku genu *ycf1Δ*. Zaobserwowano również wzrost wrażliwości komórek *vmr1Δ* na arsen, ale nie na cynk, miedź czy antymon.

Obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym wskazały **na lokalizację białka fuzyjnego Vmr1-GFP wyłącznie w błonie wakuoli.** Zaobserwowano, że w przypadku wzrostu na podłożu z glukozą białko Vmr1-GFP pozostawało w błonie wakuoli przez około 10 h, natomiast w przypadku hodowli na podłożu z etanolem/glicerolem, białko było stabilizowane i fluorescencja obserwowana była nawet po 24 h. Błonową lokalizację Vmr1 potwierdzano poprzez frakcjonowanie białek i immunodetekcję. Wskazuje to na **główne działanie białka Vmr1 w warunkach obecności niefermentowalnego źródła węgla, co odróżnia go od innych białek z klasy MRP/CFTR.**

### **Vmr1 transportuje substraty w formie koniugatów z glutationem**

W celu analizy aktywności transportowej białka Vmr1 użyto rodaminę 6G, która jest markerem aktywności transportowej wielu ABC transporterów. **Wykazano zmieniony poziom transportu użytej**

**jako substrat rodaminę 6G w zależności od obecności lub braku Vmr1.** Transport zależny jest od obecności glukozy jako źródła energii. Zaobserwowano również, że przy braku usuwania rodaminę 6G z cytoplazmy do wakuoli w przypadku komórek *vmr1Δ*, akumulowana w cytoplazmie rodaminę 6G zostaje usuwana z komórki poprzez transporter Pdr5. Podwójny mutant *pdr5Δ vmr1Δ* jest bardziej wrażliwy na rodaminę 6G niż odpowiednie pojedyncze mutanty.

Najbardziej podobne do Vmr1 białka Ycf1 i Bpt1 transportują kadm do wakuoli w formie skoniugowanej z glutationem (Li i wsp., 1996; Klein i wsp., 2002). Badania poziomu zależnego od ATP transportu koniugatów glutationu (DNP-S-Glutation) przeprowadzone na frakcji oczyszczonych wakuoli wykazały, że **delecja genu VMRI skutkowałą obniżeniem transportu koniugatów glutationu z cytoplazmy do wakuoli** niezależnie od użytego w podłożu źródła węgla. Dla porównania delecja genu *YCF1* powodowała ~80% zahamowania transportu koniugatów glutationu do wakuoli. Jednakże w przypadku jednoczesnej delecji obu genów (*ycf1Δvmr1Δ*) transport koniugatów glutationu do wakuoli był praktycznie całkowicie wygaszony.

Ze względu na różnice wrażliwości komórek mutantu *vmr1Δ* w zależności od rodzaju źródła węgla w podłożu, przeprowadzono analizę regulacji transkrypcji genu *VMRI*. Zaobserwowano, że gen *VMRI* ulega ekspresji 2x częściej w przypadku hodowli na podłożu z etanolem/glicerolem niż w obecności glukozy. Wykazano, że indukcja ta zależna jest od obecności czynnika transkrypcyjnego Adr1, regulatora genów ulegających represji glukozowej. Potwierdza to **główną aktywność białka w warunkach niefermentowalnego źródła węgla**. Ponadto wykazano zwiększenie aktywności transkrypcyjnej genu *VMRI* w obecności substratów takich jak kadm, arsen i cynk; dla porównania obecność bizmutu, kobaltu czy miedzi nie wpływała na ekspresję genu *VMRI*. Wykazano również, że poziom ekspresji genu *VMRI* jest niezależny od Pdr1, Pdr3 czy Yap1 - głównych czynników transkrypcyjnych aktywujących transkrypcję genów wielolekowej oporności.

**Ze względu na fenotyp oporności wielolekowej i lokalizację produktu białkowego w błonie wakuolarnej nadaliśmy genowi o systematycznej nazwie *YHL035c* nazwę *VMRI* (Vacuolar Multidrug Resistance), którą to nazwę zarejestrowaliśmy w bazie SGD (Saccharomyces Genome Database).**

Przedstawione wyniki zostały również zaprezentowane na międzynarodowej konferencji 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (2011) w Olsztynie.

### 4.3.3 Charakterystyka błonowego białka Rta1

Problem rozprzestrzeniającej się lekooporności mikroorganizmów mobilizuje badaczy do poszukiwania nowych związków o właściwościach antybakteryjnych i antygrzybiczych. Jednym z takich związków są aminosterole, które wykazują szerokie spektrum działania względem bakterii gram dodatnich i grzybów (Elkhiel i wsp., 1994). Izolowany z tkanek kolenia pospolitego (*Squalus acanthias*) aminosterol skwalamina jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania względem bakterii gram

dotatnich i gram ujemnych, grzybów i pierwotniaków (Moore i wsp., 1993). Również 7-aminocholesterol (7-ACH) wykazuje właściwości antybakteryjne i antygrzybicze (Soustre i wsp., 1996) jednak mechanizm jego działania nie jest wyjaśniony. Wykazano, że ekspozycja komórek drożdżowych na 7-ACH powoduje inhibicję izomerazy sterolowej  $\Delta 8\text{-}\Delta 7$  i reduktazy  $\Delta 14$ , enzymów ze szlaku biosyntezy steroli (Soustre i wsp., 1996), które są podstawowym składnikiem błon biologicznych w komórkach eukariotycznych. Sterole warunkują płynność i przepuszczalność błony, wpływają również na aktywność enzymów z nią związanych, a także na przesyłanie sygnałów, regulację cyklu komórkowego (Dufourc i wsp., 2008). U drożdży *S. cerevisiae* głównym sterolem występującym w błonach jest ergosterol. Chociaż 7-ACH zmniejsza aktywność enzymów ze szlaku biosyntezy steroli, to nie zaobserwowano zmniejszonej zawartości ergosterolu w błonie komórek hodowanych w obecności tego związku (Elkibel i wsp., 1994). Gen *RTAI* (Resistance To Aminocholesterol) został wyizolowany jako nadający komórkom drożdży oporność na 7-ACH w przypadku nadekspresji. Delecja genu *RTAI* powoduje uwrażliwienie komórek na aminosterole, ale nie na azole (Soustre i wsp., 1996). Analiza profilu ekspresji genu *RTAI* wykazała, że ulega on indukcji w warunkach ekspozycji na 8-metoksypsoralen (lek przeciwzapalny, fotouczulający, chemioterapeutyk), UVA, (Dardalhon i wsp., 2007) i cytryninę (mikotoksyna) (Iwahashi i wsp., 2007), co sugeruje, że gen ten może warunkować oporność wielolekową. Kolejna przedstawiona jako osiągnięcie naukowe praca (Kończakowska A, Manente M, Kończakowski M, Laba J, Ghislain M, **Wawrzycka D** (2012) The regulatory inputs controlling pleiotropic drug resistance and hypoxic response in yeast converge at the promoter of the aminocholesterol resistance gene *RTAI*. *FEMS Yeast Res.* 2012;12(3):279-92; załącznik 5.2) dotyczyła charakterystyki genu *RTAI*. Analiza *in silico* wskazywała na obecność w białku Rta1 siedmiu regionów transmembranowych, co sugeruje błonową lokalizację tego białka. Przedstawiona w pracy izolacja i frakcjonowanie białek ekstrahowanych ze szczepu ekspresyjnego znakowana formą Rta1-His6 pozwoliło na określenie obecności białka Rta1 tylko we frakcji zagęszczonych białek błony komórkowej. Podobnie obserwacja wewnątrzkomórkowej lokalizacji Rta1-GFP przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej wykazała, że **Rta1 lokalizuje się wyłącznie w błonie komórkowej**. Analiza western blot wskazała, że **produktem genu *RTAI* jest białko o masie ~36kDa**, co odpowiada jego przewidywanej wielkości. Nadekspresja genu *RTAI* nadawała komórkom fenotyp oporności na 7-ACH. Przeprowadzona dwoma metodami (w obecności cykloheksymidu lub znakowanie metioniną- $S^{35}$ ) **analiza stabilności białka wskazała na krótki okres półtrwania białka Rta1 w błonie komórkowej (30-60 min)**.

Analiza komputerowa wskazała na wysokie podobieństwo Rta1 do białka Rsb1, które związane jest z generowaniem oporności komórek drożdży na fitosfingozyny (PHS). Fitosfingozyna (ceramid) jest prekursorem sfingolipidów, które obok steroli, są naturalnym składnikiem błon komórkowych wpływającym na ich płynność i przepuszczalność. Fitosfingozyny powiązane z zależną od stresu termicznego ubikwitynacją i degradacją białek błonowych (Chung i wsp., 2000). W pracy wykazano, że podobnie jak w przypadku 7-ACH, **nadekspresja *RTAI* powoduje zwiększenie tolerancji**



**komórek drożdży na PHS.** Jednakże, nadekspresja *RBS1* nie powodowała zwiększenia oporności komórek na 7-ACH. Co więcej, **ekspresja *RTAI* ulegała indukcji w obecności PHS**, podczas gdy ekspresja *RSB1* pozostawała na stałym poziomie. To wskazuje na **różne funkcje i różną regulację białek *Rta1* i *Rsb1*, pomimo ich dużego podobieństwa.**

W sekwencji białka *Rta1* nie wykryto sygnałów wskazujących na aktywność transportową (np. domeny wiązania i hydrolizy ATP). Funkcję transportera 7-ACH wyklucza raczej również fakt równego komórkowego stężenia sterolu przy braku, obecności lub nadekspresji *RTAI* (Soustre i wsp., 1996). Przewidywana topologia białka *Rta1* wskazywać może na jego przynależność do grupy receptorów sprzężonych z białkami G, 7-transmembranowych (7 TM) receptorów odbierających sygnały z zewnątrz komórki. W przypadku *Rta1* mogłaby to być odpowiedź na stres cytotoksyczny. Zwłaszcza, że ekspresja *RTAI* zwiększa się w obecności 7-ACH czy PHS, ale też miktotoksyny. **Analiza sekwencji promotorowej genu *RTAI* wykazała obecność potencjalnych miejsc wiązania czynnika transkrypcyjnego *Pdr1*** (Pleiotropic Drug Resistance) odpowiedzialnego za regulowanie aktywności genów wielolekowej oporności komórek, np. genów kodujących transportery ABC. W pracy wykazano, że ekspresja genu *RTAI* jest 10-krotnie zwiększona w szczepie z super-aktywną formą *Pdr1-3*. Efekt indukcji zniesiony jest poprzez mutagenezę miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego *Pdr1* w promotorze genu *RTAI*. **Bezpośrednia zależność ekspresji *RTAI* od aktywności czynnika transkrypcyjnego *Pdr1* wskazuje na rolę *Rta1* w wielolekowej oporności komórek na inhibitory.** Co więcej, delecja trzech głównych genów warunkujących wielolekową oporność komórek na wiele niepowiązanych strukturalnie i funkcjonalnie substratów, *PDR5*, *YOR1* i *SNQ2*, powodowało indukcję ekspresji genu *RTAI* na poziomie podobnym do obserwowanego dla superaktywnej formy *Pdr1-3*. W pracy wykazano również zależność ekspresji genu *RTAI* od czynników transkrypcyjnych *Mot3* i *Rox1*, regulujących ekspresję genów działających w warunkach hipoksji (badania dotyczące roli hipoksji w ekspresji *RTAI* zostały wykonane przez grupę dr Anny Kołaczkowskiej). Delecja *MOT3* i *ROX1* powodowała zwiększenie aktywności transkrypcyjnej genu *RTAI*. Jednocześnie wykazano zwiększoną ilość białka *Rta1* w komórkach hodowanych w warunkach hipoksji. W warunkach obniżonej dostępności tlenu następuje zaburzenie syntezy ergosterolu. Wydaje się, że funkcja *Rta1* związana jest pośrednio z regulacją biosyntezy ergosterolu. Wskazuje na to zarówno indukcja ekspresji i oporność na inhibitor biosyntezy ergosterolu jakim jest 7-ACH, jak i zwiększony poziom białka *Rta1* w warunkach hipoksji. Zaproponowaliśmy, że zakotwiczone w błonie komórkowej **białko *Rta1* może działać jako receptor inhibitorów wzrostu, współdziałający z siecią genów warunkujących wielolekową oporność komórek, pośrednio wpływając na skład lipidowy błony komórkowej.**

#### 4.3.4 Badania mechanizmu oporności komórek na arsen

Zanieczyszczenie środowiska arsenem (As) stanowi ogólnoświatowy problem. Wiele milionów ludzi narażonych jest na stałą ekspozycję na wysokie stężenie związków arsenu ze względu na skażenie

wód pitnych, powietrza lub gruntu. Dotyczy to zwłaszcza Indii, Chin, Tajwanu i Bangladeszu, ale również Meksyku, Australii, Nowej Zelandii, Kanady i USA (Harvey i wsp., 2006; Hossain, 2006). Światowa organizacja zdrowia (WHO) szacuje, że nawet 100 mln osób może każdego dnia spożywać wodę lub żywność zawierającą arsen w stężeniu większym niż dopuszczane 10 µg/l (WHO rep; <https://www.who.int/features/archives/feature206/en/>). Zaobserwowano, że ekspozycja na arsenu powoduje melanozy, rogowacenia i raka skóry, inhalacja powoduje raka płuc, a wchłanianie przez układ pokarmowy doprowadza do nowotworów nerek, wątroby czy pęcherza moczowego (Safiuddin i Karim, 2001; Bustaffa i wsp., 2014; WHO rep). Międzynarodowa Agencja Badań nad nowotworami (IARC-International Agency for Research on Cancer) zaklasyfikowała arsen do pierwszej grupy czynników rakotwórczych (IARC, <https://www.iarc.fr/>), a Agencja ds. Substancji Toksycznych i Rejestru Chorób (ATSDR-Agency for Toxic Substances and Disease Registry) ze względu na toksyczność, częstość występowania i ekspozycję, w 2017r wpisała arsen jako pierwszy i najważniejszy (z ponad 200 wymienionych) element wpływający obecnie na zdrowie człowieka (ATSDR <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index>). Jednakże, toksyczne właściwości arsenu wykorzystywane były od wieków w terapiach trypanosomatoz (śpiączka afrykańska), a obecnie trójtlenek arsenu (Trisenox, Teva Pharmaceuticals) stosowany jest w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej, a badania nad użyciem tego metaloidu w leczeniu guzów litych są w toku (Dilda i Hogg, 2007; Ahn i wsp., 2010; Berrett i Croft, 2012; Aznab i Razaeei, 2015).

Toksyczność trójwartościowych form arsenu As(III) wynika z indukowania powstawania dużej ilości reaktywnych form tlenu (ROS) i generowania stresu oksydacyjnego (Flora., 2011; 2007; Chou, 2004; Hossein i wsp., 2013). Indukowane obecnością arsenu nagromadzenie ROS może doprowadzić do różnego typu uszkodzeń DNA (Jena., 2012). Badania na drożdżach wykazały, że arsen może indukować dwuniciowe złamania DNA we wszystkich fazach cyklu komórkowego, w sposób niezależny od stresu oksydacyjnego (Litwin i wsp., 2013). Wskazano również na bezpośredni związek działania arsenu na agregację białek poprzez zaburzenia w procesie fałdowania nowopowstających peptydów. Określono, że wśród ludzkich homologów drożdżowych białek ulegających agregacji po ekspozycji na arsen są białka powiązane z chorobami neurodegeneracyjnymi (Ibstedt i wsp., 2014; Tamas i wsp., 2014).

Ze względu na trwającą od wieków ekspozycję organizmów na wysokie stężenia arsenu i antymonu, komórki w trakcie ewolucji wytworzyły mechanizmy obrony przed toksycznym działaniem tego metaloidu. Badania nad zjawiskiem oporności komórek na arsen i antymon na przykładzie drożdży *S. cerevisiae* prowadzone są od wielu lat przez grupę naukową z Uniwersytetu Wrocławskiego (najpierw pod kierunkiem prof. Stanisława Ułaszewskiego, a obecnie pod kierunkiem prof. Roberta Wysockiego). W pracy przedstawionej jako kolejne osiągnięcie naukowe (Maciaszczyk-Dziubinska E, **Wawrzycka D**, Wysocki R (2012) Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *Int J Mol Sci.* 13(3):3527-48; załącznik 5.3) dokonano podsumowania aktualnego stanu wiedzy o mechanizmach detoksykacji arsenu i antymonu, jak i dróg wnikania metaloidów do komórki eukariotycznej. Omówiono rolę permeaz

heksozowych (Hxt) i transporterów fosforanowych (Pho) jako drogi wnikania odpowiednio As(III)/Sb(III) i As(V) do komórki. Zwrócono uwagę na najnowsze doniesienia dotyczące podwójnej roli akwagliceroporyn (np. Fps1 u *S. cerevisiae*), które mogą stanowić zarówno drogę wnikania jak i usuwania metaloidu. Ponadto scharakteryzowano rolę transporterów pierwotnych z rodziny ABC jako główny czynnik detoksykacji arsenu z komórek ssaczy. Szeroko przeanalizowano rolę transporterów metaloidów z rodziny Acr3 w generowaniu oporności na arsen u mikroorganizmów. Przedstawiono **perspektywy wynikające ze zrozumienia molekularnych mechanizmów oporności komórek eukariotycznych na związki arsenu jako kluczowe w opracowania skuteczniejszych metod terapeutycznych, ale również możliwości wykorzystania w bio- i fitoremediacji metaloidów.**

#### 4.3.5 Badania mechanizmu działania białka Acr3 antyportera As(III)/ H<sup>+</sup>

Detoksykacja arsenu polega głównie na obniżeniu jego wewnątrzkomórkowego stężenia poprzez aktywne usuwanie z cytoplazmy, bądź poprzez neutralizację na drodze biotransformacji i przekształcania w formy mniej toksyczne (Rosen, 2002). Najważniejszą i najbardziej wydajną linią obrony komórek jest aktywne usuwanie arsenu z cytoplazmy poprzez transportowanie go do wakuoli lub na zewnątrz komórki. U eukariontów w detoksykację arsenu zaangażowane są niespecyficzne, pierwotne transportery typu ABC. Białka te odpowiedzialne są za sekwestrację związków przez błonę, wbrew gradientowi stężeń, usuwając je z cytoplazmy do wakuoli lub na zewnątrz komórki. Substratami tych transporterów są koniugaty glutationowe arsenu organicznego (np. MMA(GS)<sub>2</sub>(III), DMA(GS)(III)) i nieorganicznego (As(GS)<sub>3</sub>(III)). Wykazano, że u człowieka w aktywne usuwanie związków arsenu zaangażowane są transportery ABC z klasy ABCC1 (MRP1; MRP2; MRP4) i ABCA1 (Banerjee i wsp., 2014; Crew i Lesli, 2010; Lesli i wsp., 2004; Tan i wsp., 2014). W przypadku drożdży *S. cerevisiae* w transport koniugatów As(GS)<sub>3</sub> zaangażowane są pompy ABC z klasy MRP1/CFTR, Ycf1 i Vmr1, które usuwają As(GS)<sub>3</sub> z cytoplazmy do wakuoli (Li i wsp., 1996, Wawrzycka i wsp. 2010; Maciaszczyk-Dziubinska i wsp., 2012).

Badania prowadzone od wielu lat przez grupę, której jestem członkiem (Instytut Genetyki i Mikrobiologii i Instytut Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Wrocławskiego), wykazały, że głównym elementem oporności drożdży *S. cerevisiae* na arsen jest zlokalizowany w błonie komórkowej transporter As(III) i Sb(III) Acr3 (Arsenical Compounds Resistance) (Bobrowicz i wsp., 1997). Ekspresja genu *ACR3* jest indukowana obecnością arsenu w środowisku. Delecja genu *ACR3* powoduje uwrażliwienie komórek nawet na niskie stężenia arsenu z jednoczesną akumulacją tego metaloidu w cytoplazmie (Wysocki i wsp., 1997). Wykazano, że białko Acr3 jest wtórnym antyporterem As(III)/H<sup>+</sup> wykorzystującym do transportu energię pochodzącą z gradientu elektrochemicznego protonów, generowaną przez błonową H<sup>+</sup>-ATPazę. Umożliwia to usuwanie As(III) z cytoplazmy na zewnątrz komórki wbrew gradientowi stężeń (Maciaszczyk-Dziubińska i wsp., 2010; 2011). Chociaż fizjologiczna funkcja Acr3 w detoksykacji As(III) została określona, mniej wiadomo o mechanizmie

działania tego transportera i jego strukturze. Arsen wykazuje silne powinowactwo do grupy tiolowej (-SH) może więc oddziaływać z białkami przez reszty cysteinowe (Zhao i wsp., 2012). Wykazano, że wysoce konserwatywna reszta Cys151, jest niezbędna do aktywności transportowej białka Acr3, podczas gdy Cys90 i Cys169 są niezbędne odpowiednio do prawidłowego sortowania białka z ER do błony komórkowej lub aktywności transportowej (Maciaszczyk-Dziubińska i wsp, 2014). Analiza mutacyjna wybranych konserwatywnych hydrofobowych i polarnych reszt aminokwasowych zlokalizowanych w potencjalnych regionach transbłonowych wskazała na istotną rolę Phe266 (TM7), Phe352 (TM9), Ser349(TM9), Glu353 (TM9) i Glu380 (TM10) w aktywności antyportowej Acr3 (Markowska i wsp., 2015). Powstało więc pytanie ile regionów transbłonowych posiada białko Acr3 i które z nich są istotne w generowaniu aktywności antyportowej Acr3.

Przedstawiona jako kolejne osiągnięcie naukowe praca (**Wawrzycka D**, Markowska K, Maciaszczyk-Dziubinska E, Migocka M, Wysocki R (2017) Transmembrane topology of the arsenite permease Acr3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta – Biomem.* 1861(5):916-925; załącznik 5.4) dotyczyła ustalenia topologii białka Acr3, określenia strukturalnego modelu białka i wyznaczenia potencjalnych regionów odpowiedzialnych za wiązanie As(III) i H<sup>+</sup>.

W celu wyznaczenia potencjalnych regionów transbłonowych sekwencje białka Acr3 analizowano *in silico* przy użyciu dziewięciu różnych programów wyznaczających białkowe regiony hydrofobowe. Następnie dokonano przyrównania tych regionów. W przypadku wszystkich użytych programów wyniki wyraźnie wskazywały na obecność dziewięciu potencjalnych regionów transbłonowych, jednak wyniki z pięciu analiz wskazywały na obecność jeszcze jednego regionu hydrofobowego w białku Acr3. Wątpliwości dotyczyły regionu 332–366. Dokładne ustalenie konformacji białka Acr3 i określenie położenia potencjalnego dodatkowego regionu hydrofobowego jest istotne ponieważ w regionie tym znajdują się kluczowe dla aktywności antyportowej reszty aminokwasowe: Phe352, Ser349, Glu353. W celu eksperymentalnego określenia topologii białka Acr3 użyto dwóch metod tzw. mapowania przy użyciu kasety reporterowej Suc2A (miejsca glikozylacji) i analizy proteolitycznej. Weryfikacja obecności glikozylowanych form fuzji Acr3-Suc2 pozwoliła na określenie, że **regiony hydrofilowe łączące odpowiednio domeny transbłonowe TM1-TM2 i TM3-TM4, TM5-TM6 i TM7-TM8 są skierowane do lumen ER, a co za tym idzie po uzyskaniu błonowej lokalizacji skierowane są na zewnątrz komórki**. Ponadto zaobserwowane wyniki wskazywały, że **zarówno N- i C-koniec białka skierowane są do cytoplazmy, co jest możliwe przy topologii Acr3 z 10-cioma regionami transbłonowymi**. Analiza wzoru proteolitycznego form fuzyjnego białka Acr3-fXa potwierdziła, że hydrofilowe regiony między TM7-TM8 i TM9-TM10 skierowane są na zewnątrz komórki, podczas gdy TM8-TM9 i C-końcowy region białka Acr3 są skierowane do cytoplazmy. **Analiza eksperymentalna potwierdziła hipotetyczny model białka Acr3 z 10-cioma regionami transbłonowymi i pozwoliła na określenie, że regiony transbłonowe są połączone przez cztery pętle cytoplazmatyczne i pięć pętli skierowanych na zewnątrz komórki. Ponadto wykazano, że dyskusyjny region 322-366 jest częścią transbłonowego regionu TM9.**

Jednocześnie **nasze badania wskazały duże znaczenie międzybłonowych pętli hydrofilowych w prawidłowym funkcjonowaniu i fałdowaniu Acr3**. Jednakże szczególnie interesujący jest region pętli 8 łączącej TM8 i TM9. Analiza porównawcza regionu pętli 8, wykazała że obszar ten zawiera charakterystyczne tylko dla kladu *Saccharomycotina* wydłużenie sekwencji o 7 do 63 reszt aminokwasowych. By określić rolę tego regionu skonstruowano wersję białka Acr3 pozbawioną 28 reszt z regionu pętli 8. Zaobserwowano, że taka delekcja nie wpłynęła na funkcjonalność oraz błonową lokalizację białka Acr3. Oznacza to, że **region hydrofilowy pętli 8 nie odgrywa roli w funkcji, sortowaniu i subkomórkowej lokalizacji białka Acr3**.

Zaproponowaliśmy, że **drożdżowy antyporter Acr3 i należący do tej samej rodziny BART, symporter kwasów żółciowych ASBT mogą być strukturalnymi homologami. Przyrównanie sekwencji aminokwasowej Acr3 z *S. cerevisiae* i białka ASBT z bakterii *Yersinia frederiksenii* pokazało wysoki stopień podobieństwa topologii transbłonowej obu białek**.

Korzystając z wyznaczonej eksperymentalnie topologii białka Acr3 i struktury krystalicznej ASBT z *Yersinia frederiksenii* (PDB ID: 4N7W, CIN conformation) (Zhuo i wsp., 2014), podjęto próbę stworzenia hipotetycznego modelu 3D białka Acr3. W przypadku zaproponowanego przez (Hu i wsp., 2011; Ahadef i wsp., 2015) modelu białek ASBT z *Y. frederiksenii* i *Neisseria meningitidis*, wyznaczono wyraźne domeny: panelową tworzoną przez regiony transbłonowe TM1-TM2 i TM6-TM7 i tzw. domenę korową tworzoną przez regiony transbłonowe TM3-TM5 i TM8-TM10. Co ciekawe, domeny transbłonowe TM4 i TM9 stanowią nieciągłe  $\alpha$ -helisy (TM4a i TM4b; TM9a i TM9b), które wzajemnie krzyżują się w obrębie konserwatywnego, rozwiniętego fragmentu łańcucha polipeptydowego (Hu i wsp., 2011; Ahadef i wsp., 2015). Autorzy zaproponowali również, że jony  $\text{Na}^+$  wiązane są w rejonie transbłonowym w obrębie domeny korowej, blisko skrzyżowania TM4 i TM9, natomiast miejsce wiązania substratu znajduje się w rejonie pomiędzy domeną panelową i korową w centralnej części białka. Bazując na strukturze krystalicznej białek ASBT zaproponowano, że mechanizm transportu polegałby na przesuwaniu się ruchomej domeny korowej względem nieruchomej domeny panelowej. Ruch ten następowałby po związaniu substratu i/lub jonów i powodowałby naprzemienny dostęp do miejsc wiązania po obu stronach błony (Hu i wsp., 2011; Ahadef i wsp., 2015).

Dotychczas nie są dostępne żadne dane dotyczące krystalograficznej struktury któregośkolwiek z członków rodziny Acr3, nie znany jest też mechanizm translokacji protonów i arsenu. Bazując na podobieństwie topologii Acr3 i białek ASBT, przy użyciu serwera SWISS-MODEL (The SWISS-MODEL server, Biozentrum, Universität Basel, <http://swissmodel.expasy.org>.) i metody modelowania bazującej na homologii **zaproponowaliśmy hipotetyczny model 3D białka Acr3**. Zgodnie z zaproponowanym przez nas modelem **w białku Acr3 można wyróżnić domenę korową i domenę panelową**. W skład domeny korowej wchodzi 6 regionów transbłonowych tj. TM3-TM5 i TM8-TM10, natomiast domena panelowa składa się z 4 regionów TM1-TM2 i TM6-TM7. Domeny **TM4 i TM9 są nieciągłe**, skierowane w przeciwnych kierunkach i krzyżują się wzajemnie w miejscu fragmentu rozwiniętej helisy, w obrębie domeny panelowej. Co ciekawe, **reszty aminokwasowe zidentyfikowane**

wcześniej jako istotne dla aktywności antyportowej Acr3 znajdują się właśnie w obrębie TM4 (Cys151) i TM9 (Ser349, Phe352, Glu353). Ponadto, ponieważ zgodnie z naszym modelem, wysoce konserwatywne reszty Cys151 i Ser349 znajdują się bardzo blisko siebie, dokładnie w miejscu krzyżowania domen TM4 i TM9, zaproponowaliśmy, że mogą one tworzyć miejsce wiązania arsenu. Cząsteczka As(III) prawdopodobnie wchodzi w interakcję z grupą tiolową (-SH) reszty Cys151, natomiast Ser349 poprzez wiązania wodorowe może koordynować tę interakcję. Natomiast reszty kwasu glutaminowego Glu353 (TM9) i Glu380 (TM10), które znajdują się w pobliżu Cys151 mogą podlegać procesowi protonowania. Ponadto, zgodnie z naszym modelem reszta Glu380 znajduje się w bliskim położeniu względem potencjalnego miejsca wiązania arsenu, może więc brać udział w koordynacji tego wiązania.

Uzyskane wyniki były efektem realizacji jednego z zadań badawczych projektu NCN 2012/07/B/NZ1/02804 i zostały również 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: 3<sup>rd</sup> International Workshop on Antimony in the Environment, Leipzig w Niemczech.

#### 4.3.6 Proteostaza Acr3; mechanizmy regulacji degradacji antyportera

W kolejnej pracy przedstawionej jako osiągnięcie naukowe (Wawrzycka D., Sadlak J., Maciaszczyk-Dziubinska E., Wysocki R., (2019) Rsp5-dependent endocytosis and degradation of the arsenite transporter Acr3 requires its N-terminal acidic tail as an endocytic sorting signal and arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors. *Biochim Biophys Acta – Biomem.* 1861(5): 916-925; załącznik 5.5) kontynuowano badania nad białkiem Acr3. Głównym punktem zainteresowania była proteostaza białka Acr3, a w szczególności jego stabilność, droga i mechanizmy regulacji degradacji.

Komórki w szybki sposób muszą dostosować się do zmieniających się warunków środowiska. Jednym z podstawowych mechanizmów pozwalających na utrzymanie homeostazy komórkowej jest selektywność błony komórkowej, która zapewnia prawidłowe wprowadzanie i wyprowadzanie substancji odżywczych, metali czy ksenobiotyków. Przystosowanie takie wymaga szybkiej wymiany rodzaju i składu białek błonowych. Prawidłowa struktura błony zależy od rozmieszczenia i funkcjonalności białek w niej występujących, stąd sprawnie działające systemy kontroli jakości i degradacji białek leżą u podstaw przeżycia, szczególnie organizmów jednokomórkowych. Białka błonowe stanowią do 20% proteomu komórkowego, więc w dużej mierze wpływają na zachowanie proteostazy (homeostazy białek) w komórce (Cournia i wsp., 2015). Transportery błonowe podlegają bardzo ścisłej regulacji na poziomie ekspresji, fałdowania, sortowania i degradacji.

Tematem, który w ostatnich latach bardzo interesuje badaczy jest proteostaza i regulacja aktywności białek błonowych na poziomie ubikwitynacji i degradacji. Ustalono, że eukariotyczne białka błonowe, które są przeznaczone do usunięcia z błony komórkowej ulegają degradacji w kilkietapowym

procesie obejmującym ubikwitynację, internalizację, endocytozę, sortowanie do ciałek wielopęcherzykowych (MVB, ang. Multivesicular bodies) i proteolizę w wakuoli (Piper i wsp., 2014; Feyder i wsp., 2015). Po raz pierwszy wakuolarną degradację białek błonowych opisano dla białka Ste6 u drożdży *S. cerevisiae* (Bercover i wsp., 1994). Obecnie, najwięcej informacji o przebiegu i regulacji tego typu degradacji pochodzi z badań prowadzonych na modelowym organizmie jakim są drożdże *S. cerevisiae*. Przeznaczone do degradacji białka podlegają ubikwitynacji, polega to na tworzeniu izopeptydowego wiązania między cząsteczką ubikwityny (Ub) a resztą lizynową substratu (Hershko i Ciechanover, 1998). Białka mogą podlegać monoubikwitynacji, multiubikwitynacji (ubikwitynacja na różnych resztach lizynowych) lub poliubikwitynacji (przyłączanie ogonków wieloubikwitynowych). Cząsteczka ubikwityny to 76 aminokwasowe białko, które w swojej sekwencji posiada sześć reszt lizynowych K6, K11, K33, K48 i K63, z których każda może utworzyć wiązanie izopeptydowe z następną cząsteczką ubikwityny (Swatek i Komander, 2016). W wyniku poliubikwitynacji powstaje łańcuch ubikwityn, który w zależności od tego, przez którą resztę lizynową ubikwityny jest zbudowany, nadaje białku różne przeznaczenie.

W przypadku drożdży *S. cerevisiae* zidentyfikowano dotychczas tylko jedną ligazę ubikwityny odpowiedzialną za ubikwitynację białek błonowych, jest to należące do rodziny ligaz NEDD4, białko Rsp5. Ligaza ubikwityny Rsp5 w swojej strukturze posiada trzy 40 aminokwasowe domeny WW, które mogą się wiązać do białek/substratów zawierających bogaty w proliny motyw PPxY (PY) (Kasanow i wsp., 2001; Shcherbik i wsp., 2004). Ligaza ubikwityny Rsp5 preferuje budowanie łańcuchów poli-Ub przez Lys63 ubikwityny (Dunn i wsp., 2001; Kim i Huibregtse, 2009; Zarrinpar i Lim, 2000). Jednakże większości błonowych białek nie ma motywu PPXY, a w przypadku niektórych (np. Fur4, Gap1) obserwowano zależną od Rsp5 ubikwitynację i internalizację mimo braku w sekwencji tych białek motywu PPXY (Leon i Haguenaer-Tsapis, 2009). Wykazano, że ligaza Rsp5 może być naprowadzana na błonowe substraty przez tzw. białka adaptorowe. Dotychczas zidentyfikowano kilkanaście białek mogących pełnić funkcje adaptorów ligazy Rsp5 u drożdży *S. cerevisiae*. Większość z nich należy do rodziny  $\alpha$ -arestyn, określa się je jako adaptory ART (Arrestin-Related Trafficking adaptors). Wszystkie białka ART zawierają motyw PPXY, który pozwala im łączyć się z Rsp5, nie wiadomo jednak w jaki sposób białka te łączą się z substratami w błonie (Piper i wsp., 2014; Lin i wsp., 2008; Nikko i wsp., 2009). Niedawne badania wykazały, że w przypadku badanych transporterów aminokwasów do interakcji może dochodzić poprzez krótki fragment eksponowanego do cytoplazmy regionu białka błonowego. Zaobserwowano, że sygnałem do internalizacji tych białek jest nadmiar dostępnego w środowisku substratu, co powoduje prawdopodobnie zmianę konformacji białka, która umożliwia ekspozycję regionu rozpoznawanego przez kompleks arestyna-Rsp5 i w konsekwencji ubikwitynację i degradację (Gournas i wsp., 2017.; Fujita i wsp., 2018; Keener i Babst., 2013). Zaproponowano również, że endocytoza transporterów błonowych zależy od regulacji aktywności  $\alpha$ -arestyn np. poprzez fosforylację (Becuwe i wsp., 2012; Merhi i wsp., 2012).

Wyniki przedstawione w pracy stanowiącej kolejne osiągnięcie naukowe (**Wawrzycka D., Sadlak J., Maciaszczyk-Dziubinska E., Wysocki R., (2019) Rsp5-dependent endocytosis and degradation of the arsenite transporter Acr3 requires its N-terminal acidic tail as an endocytic sorting signal and arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors. *Biochim Biophys Acta – Biomem.* 1861(5): 916-925; załącznik 5.5) po raz pierwszy ukazują badania nad proteostazą Acr3, prowadzące do ustalenia regulacji procesu degradacji i czasu półtrwania białka.**

Indukowane obecnością As(III) białko Acr3-GFP lokalizuje się w błonie plazmatycznej komórek z fazy logarytmicznej, jednak podczas przedłużającej się indukcji, zaobserwowano pojawianie się sygnału zielonej fluorescencji również w wakuoli. **Nasze badania pozwoliły na określenie, że białko Acr3 ulega degradacji na drodze internalizacji, endocytozy, sortowania do ciałek wielopęcherzykowych oraz proteolizy w wakuoli. Wykazano, że antyporter Acr3 jest białkiem o średnim okresie półtrwania, który oszacowano na ~90 min.** Zaobserwowano również, że obecność substratu (As(III)) nie wpływa na poziom internalizacji i degradacji białka Acr3. Nieaktywny katalitycznie mutant Acr3<sup>E353A</sup> wykazywał taki sam wzór degradacji jak obserwowany dla dzikiej formy Acr3. Zaobserwowano również, że **degradacja prawidłowo faldowanego białka Acr3-GFP nie zależy od funkcjonowania proteasomu.** Wyniki te wskazują, że białko Acr3 ulega internalizacji, endocytozie i degradacji poprzez sortowanie do wakuoli, a degradacja jest ciągła, niezależna od obecności substratu i aktywności białka Acr3. Jest to w zgodzie z wcześniejszymi naszymi obserwacjami wskazującymi, że ilość białka Acr3 zależy od aktywności transkrypcyjnej (Maciaszczyk-Dziubińska i wsp., 2010). Zablockowanie procesu endocytozy komórkowej spowodowało całkowite zablokowanie białka Acr3 w błonie, wstrzymanie internalizacji i w konsekwencji brak sygnału w wakuoli, wykazano również wysoką stabilność białka Acr3-GFP. **Wskazuje to na konieczność internalizacji białka Acr3 w błonie, poprzedzające endocytozę i degradację w wakuoli.**

W pracy wykazano bezpośrednią **zależność internalizacji i endocytozy białka Acr3 od obecności ligazy ubikwityny Rsp5.** Zaburzenia funkcjonowania białka Rsp5 powodowały stabilizację białka i zatrzymanie sygnału Acr3-GFP w błonie komórkowej, co potwierdzono obserwując drastycznie zwiększony poziom białka Acr3 we frakcji białek błony komórkowej, jak również znacznie wydłużony (do~ 6h) czas półrozpadu białka. **Wykazano, że białko Acr3 ulega Rsp5-zależnej poliubikwitynacji, a poliubikwitynowane formy Acr3 wynikają głównie z tworzenia łańcuchów poprzez Lys63 cząsteczki ubikwityny,** co jest charakterystyczną cechą ligazy ubikwityny Rsp5. Poliubikwitynacja białek błonowych przez UbK63 jest niezbędna do prawidłowej ich degradacji i sortowania z ciałek wielopęcherzykowych do wakuoli. Zaobserwowano akumulację Acr3-GFP w błonie wakuoli w przypadku komórek z prawidłowo funkcjonującą ligazą RSP5 lecz niezdolnych do tworzenia łańcuchów poli-UbK63 (UbK63R). W komórkach tych wykazano zwiększoną stabilność białka Acr3-GFP, ale bez zmian jego retencji w błonie komórkowej. Co więcej, zaobserwowano zmniejszony poziom poliubikwitynowanych form Acr3, przy całkowitym braku form poliubikwitynowanych przez tworzenie łańcuchów UbK63. Stwierdzono, że **zablokowanie białka Acr3-GFP w błonie wakuoli spowodowane**



**jest brakiem jego modyfikacji przez poli-UbK63.** Zaprezentowane w pracy wyniki wskazują, że **już monoubikwitynacja jest wystarczająca do internalizacji białka Acr3-GFP, natomiast poliubikwitynacja poprzez tworzenie łańcuchów poli-UbK63 jest niezbędna do prawidłowego sortowania białka Acr3 z ciałek wielopęcherzykowych do wakuoli.** W niniejszej pracy **po raz pierwszy wykazano, że Acr3 podlega Rsp5-zależnej poliubikwitynacji poprzez łańcuchy UbK63, co warunkuje prawidłową internalizację i degradację transportera w wakuoli.**

Bazując na ustalonej eksperymentalnie 10-transbłonowej sekwencji Acr3 (Wawrzycka i wsp., 2017) wyznaczono 11 reszt lizynowych, znajdujących się w cytoplazmatycznych pętlach białka Acr3, mogących potencjalnie ulegać modyfikacji poprzez ubikwitynację (K6, K14, K28, K91, K99, K108, K239, K244, K325, K331, K395). Zgodnie z analizą sekwencji aminokwasowej białka Acr3 przy użyciu odpowiednich programów bioinformatycznych (np. UbiPred) największe prawdopodobieństwo modyfikacji poprzez ubikwitynację występuje w pozycji K6 i/lub K14 i/lub K325, dlatego te reszty lizynowe poddano badaniu jako pierwsze. Metodą mutagenезy ukierunkowanej skonstruowano odpowiednio mutanty, w których zamieniono w/w lizyny (K) na argininy (R). Zaobserwowano, że pojedyncze substytucje Acr3<sup>K6R</sup> lub Acr3<sup>K14R</sup> lub Acr3<sup>K325R</sup> nie wpływają na funkcję czy lokalizację transportera, natomiast **jednoczesne wprowadzenie podwójnych substytucji Acr3<sup>K6R,K14R</sup> lub Acr3<sup>K14R,K325R</sup> spowodowało znaczące opóźnienie internalizacji i endocytozy białka Acr3, podczas gdy potrójny mutant Acr3<sup>K6,K14R,K325R</sup> ulegał stabilizacji w błonie komórkowej.** Analizując poziom białka Acr3 w komórkach mutantów określono, że już podwójna zamiana reszt lizyna na reszty argininy powoduje opóźnioną degradację białka Acr3, a w przypadku formy Acr3<sup>K6R,K14R,K325R</sup> zaobserwowano utrzymujący się wysoki poziom białka, co wskazuje na znaczną stabilizację tych form białka. Badania poziomu ubikwitynacji zmutowanych form białka Acr3 wykazały, że **stabilizacja i zaburzona internalizacja formy Acr3<sup>K6R,K14R,K325R</sup> wynika z zablokowania możliwości ubikwitynacji białka.** O ile w przypadku pojedynczych substytucji Lys na Arg poziom ubikwitynacji białka Acr3 był podobny do poziomu ubikwitynacji dzikiej formy Acr3, to już podwójne podstawienia K6R,K14R i K14R,K325R powodowały obniżenie wykrywanej ilości modyfikowanych przez ubikwitynację form białka Acr3. Natomiast w przypadku wersji Acr3<sup>K6R,K14R,K325R</sup> ubikwitynowanych form nie wykrywano w ogóle. By wykluczyć ewentualną rolę innych reszt lizynowych w zależnej od ubikwitynacji internalizacji i degradacji białka Acr3 skonstruowano również formę Acr3-11KR, gdzie na argininę zmieniono wszystkie 11 cytoplazmatycznie zorientowane reszty lizynowe. **Wersja Acr3-11KR, podobnie jak Acr<sup>K6R,K14R,K325R</sup>, ulegała stabilizacji w błonie komórkowej, wykazywała zaburzoną internalizację, nie ulegała degradacji, nie zaobserwowano form modyfikowanych przez ubikwitynację.** Co więcej, przywrócenie dzikiej wersji trzech reszt lizynowych K6, K14, K325 w mutancie Acr3-11KR, zaowocowało przywróceniem prawidłowej internalizacji, wakuolarniej degradacji i ubikwitynacji białka na poziomie obserwowanym dla dzikiej formy białka Acr3. Zarówno pojedyncze jak i wielokrotne **podstawienia Lys na Arg nie wpłynęły na funkcję białka Acr3 i nie zaobserwowano różnic w poziomie oporności na As(III).** Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że **prawidłowa**

**internalizacja i wakuolarna degradacja białka Acr3 wymaga jednoczesnej poliubikwitynacji co najmniej trzech reszt lizynowych: K6 i K14, które zlokalizowane są w N-końcowym ogonku białka Acr3 i reszty K325 zlokalizowanej w pętli cytoplazmatycznej TM8-TM9.**

Ligaza ubikwityny Rsp5 rozpoznaje substraty, które w swojej sekwencji posiadają motyw PPXY (Kasanow i wsp., 2001; Shcherbik i wsp., 2004). Analiza sekwencji aminokwasowej białka Acr3 wykazała obecność potencjalnego motywu KPYY, zlokalizowanego w pozycji 336-339, w obrębie C-końcowego ogonka. Jednak w przypadku formy podwójnego mutantu Acr3<sup>P337A.Y339A</sup> nie zaobserwowano zaburzeń internalizacji czy zmian w poziomie degradacji białka. **Wskazuje to na konieczność udziału adaptorów w nakierowaniu ligazy Rsp5 na białko Acr3.** W przypadku drożdży *S. cerevisiae* wykazano dotychczas 14 potencjalnych białek z grupy  $\alpha$ -arestyn (ART), funkcjonujących jako potencjalne adaptory dla ligazy ubikwityny Rsp5 (Lin i wsp., 2008; Nikko, i wsp., 2009; Piper i wsp., 2014). Ekspresjonowano Acr3-GFP w komórkach szczepów z usuniętymi poszczególnymi genami ART. Zaobserwowano, że delecja takich genów jak *ART1*, *ART2*, *ART5*, *ART6*, *ART7* i *ART9* nie wpływają na endocytozę, degradację i poziom białka Acr3. Natomiast **brak Art3 (Aly2) i Art4 (Rod1) powodowały przedłużone przetrzymywanie białka w błonie komórkowej z jednoczesnym opóźnieniem tempa wakuolarniej degradacji białka Acr3-GFP.** Wskazuje to na potencjalną rolę Art3 i Art4 w procesie naprowadzania ligazy Rsp5 na białko Acr3.

Dotychczas bardzo niewiele wiadomo o mechanizmie interakcji kompleksu  $\alpha$ -arestyna-Rsp5 z substratami. W przypadku zlokalizowanych w błonie permeaz Mup1, Can1 i Jen1 wskazano, że w interakcji z  $\alpha$ -arestynami potencjalną rolę mogą odgrywać krótkie, ujemnie naładowane (kwaśne), zmienne regiony z N- lub C-końcowej części tych białek, zlokalizowane blisko reszt lizynowych ulegających ubikwitynacji (Guiney i wsp., 2016; Gournas i wsp., 2017; Fujita i wsp., 2018). Analiza sekwencji wykazała, że N-końcowy ogon transportera Acr3 zawiera kwaśne aminokwasy w regionie poprzedzającym reszty K6 i K14, które ulegają ubikwitynacji (patrz wyżej). Sukcesywne skracanie N-końcowego ogonka Acr3, pozwoliło na określenie, że wersja **białka Acr3- $\Delta$ 5, pozbawiona krótkiego N-początkowego regionu (1-MSEDQ-5) ulega znacznej stabilizacji w błonie komórkowej, co wskazuje, że fragment ten jest potrzebny do internalizacji i endocytozy białka Acr3.** Systematyczna analiza poszczególnych reszt aminokwasowych z tego regionu pozwoliła na określenie, że **główną rolę w regulacji stabilności białka Acr3 odgrywają reszty Glu3 i Asp4.** Zaobserwowano, że mutacja E3A powodowała tylko częściową retencję, natomiast przy zmianie D4A białko ulegało stabilizacji w błonie komórkowej i nie podlegało endocytozie. Czas degradacji białka Acr3 był odpowiednio wydłużony dla obu tych mutantów. Pomiar poziomu ubikwitynacji wykazały zmniejszony, w stosunku do dzikiego białka Acr3, poziom modyfikacji w przypadku mutantu Acr3<sup>E3A</sup>. **Ubikwitynowanych form białka praktycznie nie wykrywano w przypadku mutantów Acr3<sup>D4A</sup> i Acr3- $\Delta$ 5.** Wskazuje to na udział N-końcowego ogona białka Acr3 w regulacji interakcji z kompleksem adaptor-Rsp5 i ubikwitynacji reszt K6 i K14. Zaproponowaliśmy, że podstawą tej interakcji jest najprawdopodobniej oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy kwaśnymi

**aminokwasami białka Acr3 i pozytywnie naładowanymi resztami w białku  $\alpha$ -arestyny.** Taki mechanizm zaproponowano niedawno w przypadku błonowej permeazy Mup1, gdzie zaburzenie interakcji Mup1-Art1 spowodowane mutacją kwaśnych aminokwasów z Mup1 supresorowane było poprzez zmianę ładunku w obrębie pozytywnie naładowanych aminokwasów z C-końca białka Art1 (Guinley i wsp., 2016). **W pracy po raz pierwszy pokazano badania dotyczące regulacji degradacji białka błonowego typu efflux. Wyniki pozwalają przypuszczać, że mechanizm interakcji białka błonowego z kompleksem arestyna – Rsp5 może być wspólny dla permeaz i białek błonowych odpowiedzialnych za detoksykację (typu efflux),** co rzuca nowe światło na badania proteostazy transporterów warunkujących oporność na cytostatyki.

Uzyskane wyniki były efektem realizacji jednego z zadań badawczych projektu NCN 2015/19/B/NZ1/00327, zostały również zaprezentowane na dwóch międzynarodowych konferencjach w postaci plakatu na *The Final COST Action BM1307 Meeting Proteostatic Mechanisms in Health and Disease* w Grecji i na *Congress Bio2018 w Polsce*.

**Reasumując, uważam, że do moich najważniejszych, oryginalnych osiągnięć badawczych przedstawionego cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe należą:**

1. Charakterystyka genu *YHL035c/VMR1*; wykazanie roli Vmr1 w wielolekowej oporności komórek; charakterystyka regulacji transkrypcji, lokalizacji, funkcji transportowej i substratów błonowego transportera Vmr1, należącego do rodziny ABC transporterów; rejestracja nazwy genu.
2. Określenie, że Vmr1 odpowiada za transport koniugatów glutationu z cytoplazmy do wakuoli, preferencyjnie w obecności niefermentowalnych źródeł węgla.
3. Wykazanie roli genu *RTA1* w oporności komórek na fitosfingozyny; określenie czasu półtrwania Rta1, wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka Rta1
4. Podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat mechanizmów oporności komórek eukariotycznych na arsen i antymon, wskazanie nowych nurtów badań.
5. Wykazanie obecności dziesięciu regionów transbłonowych w topologii antyportera  $As(III)/H^+$  Acr3 u *S. cerevisiae*; wyznaczenie regionów cytoplazmatycznych; analiza roli pętli cytoplazmatycznej TM8-TM9; zaproponowanie modelu 3D białka Acr3 z wyznaczeniem potencjalnych miejsc wiązania substratu i protonów, wskazanie na kluczową rolę nieciągłych domen TM4 i TM9 w aktywności transportowej Acr3.
6. Wykazanie, że białko Acr3 w sposób konstytutywny, niezależny od aktywności i obecności substratu ulega degradacji na drodze endocytozy i proteolizy w wakuoli; określenie Rsp5-zależnej poliubikwitynacji poprzez łańcuszki poli-UbK63 białka Acr3, która jest niezbędna do prawidłowej internalizacji, endocytozy i wakuolarniej degradacji białka Acr3

7. Identyfikacja reszt lizynowych (K6; K14; K325) w białku Acr3 podlegających poliubikwitynacji i warunkujących internalizację transportera Acr3.
8. Wyznaczenie i charakterystyka zlokalizowanego na N-końcu białka Acr3 regionu niezbędnego dla prawidłowej internalizacji i degradacji Acr3 i odpowiedzialnego za interakcję z  $\alpha$ -arestynami;
9. określenie zależności ubikwitynacji i degradacji białka Acr3 od interakcji z Art3 i Art4.

Oporność wielolekowa komórek na stosowane leki, pestycydy czy herbicydy stanowi narastający problem w walce z mikroorganizmami, ale również w terapiach antynowotworowych. Wyniki przedstawionych jako osiągnięcie prac pozwalają na poszerzenie wiedzy o roli trzech białek błonowych w mechanizmach oporności komórek eukariotycznych na ksenobiotyki. Wykorzystanie modelowego organizmu jakim są jednokomórkowe drożdże piekarnicze *S. cerevisie* pozwala na użycie wielu metod, których zastosowanie jest ograniczone w przypadku badań prowadzonych na komórkach ludzkich. Wysoki stopień homologii genów i podobieństwo funkcjonowania komórek drożdżowych i ludzkich pozwala na bezpośrednie przełożenie informacji uzyskanych na drożdżach na przypisanie funkcji określonym genom ludzkim.

Przedstawione wyniki pracy dotyczące charakterystyki genu *VMR1* stanowiły pierwsze doniesienia naukowe o roli tego genu w wielolekowej oporności komórek i uzupełniają wiedzę o białkach z grupy transporterów ABC. Uzyskane wyniki wskazały, że pomimo dużego podobieństwa pomiędzy białkami transporterów ABC podlegają one innej regulacji i transportują inne zestawy substratów. Wykazanie, że blokowanie transporterów wakuolarnych może wpływać na zwiększenie aktywności detoksykacyjnej transporterów z błony komórkowej, pozwala na lepsze zrozumienie zależności w siatce genów wielolekowej oporności. *Vmr1*, podobnie jak należące do tej samej grupy *Ycf1* i *Bpt1*, transportuje substraty w postaci koniugatów glutationu, co może wskazywać, że jest to cecha wspólna dla wszystkich transporterów z klasy MRP/CFTR. Wszystkie informacje uzyskane dla drożdżowego białka *Vmr1* mogą nas przybliżyć do zrozumienia funkcji i aktywności jego ludzkich homologów. Informacje te mogą być wykorzystane w poszukiwaniu inhibitorów blokujących działanie ABC transporterów w przypadku problemów np. z opornością komórek na terapie, z drugiej strony nadekspresja wakuolarnych transporterów ABC (np. *Vmr1*) może być wykorzystana do fitoremediacji metali ciężkich.

Wyniki badań dotyczące charakterystyki białka *Rta1* dostarczyły informacji o roli tego białka błonowego w oporności na aminosterole i sfingolipidy. Interakcja *RTA1* z genami wielolekowej oporności i warunkowanie oporności na inhibitor syntezy ergosterolu, wskazuje na powiązanie fenotypu oporności wielolekowej z regulacją składu błony. W pracy wskazano na rolę *Rta1* jako receptora niż transportera, co może ułatwić charakterystykę pozostałych białek z rodziny RTA1-podobnych białek.

Badania nad antyporterem Acr3 odpowiedzialnym za detoksykację As(III) uzupełniają dostępne dotychczas informacje o budowie i mechanizmie działania tego białka. Eksperymentalne wyznaczenie 10-transbłonowej struktury białka Acr3 pozwalają na topologiczne badania porównawcze białek z rodziny

Acr3. Określenie orientacji poszczególnych pętli łączących regiony transbłonowe pozwala na wyznaczenie ważnych dla funkcji białka Acr3 reszt aminokwasowych. Ponadto pozwoliło to na określenie przypuszczalnej struktury 3D, co przybliżyło nas do identyfikacji centrum aktywnego i miejsca wiązania substratu. Wyznaczenie ścieżki degradacji białka Acr3, określenie warunków zależnej od ubikwitynacji internalizacji tego błonowego białka dostarcza nowe informacje o regulacji proteostazy i degradacji błonowych białek typu efflux. Co więcej, na przykładzie antyportera Acr3 wykazano, że białka te, podobnie jak permeazy, są rozpoznawane przez sieć adaptorów. Informacja ta nie tylko przybliżyła nas do zrozumienia działania Acr3, ale również wyznaczając nową rolę adaptorów z rodziny  $\alpha$ -arestyn w regulacji białek typu efflux pozwoliło na badanie roli arestyn i tej ścieżki proteostazy w oporności komórek na cytostatyki.

Łączny **Impact Factor** publikacji wchodzących w skład osiągnięcia według bazy JCR wynosi **15,8**; IF z roku wydania pracy wynosi **14,27**, natomiast 5-letni IF wynosi **17,20**. Suma punktów według kryteriów MNiSW - **160**. Prace te były cytowane według Web of Science **69** razy (stan z dnia 05.04.2019 r.)

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć badawczych

Moje osiągnięcia naukowe związane są głównie z okresem po obronie doktoratu, jednakże są one w dużej mierze wynikiem zainteresowań, które rozwinęły się jeszcze w trakcie wykonywania pracy doktorskiej. W trakcie studiów doktoranckich realizowanych pod kierunkiem prof. Stanisława Ułaszewskiego w ramach Studium Doktoranckiego Biologii Molekularnej na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego zajmowałam się charakterystyką genów potencjalnie należących do rodziny ABC transporterów. Badania w dużej mierze prowadziłam w laboratorium prowadzonym przez prof. Andre Goffeau (Department de Biochimie Physiologique, Universite Catholique de Louvain, Belgia), który był wiodącym w tym czasie ośrodkiem badań nad funkcją ABC transporterów na przykładzie drożdży *S. cerevisiae*. W czasie kilkukrotnych pobytów w w/w laboratorium (w sumie 14 miesięcy) poznałam wiele technik biologii molekularnej, a w szczególności manipulacji genetycznych. W ramach pracy doktorskiej dokonałam wstępnej analizy wrażliwości wielu mutantów delecyjnych różnych genów ABC transporterów na ponad 100 różnych funkcjonalnie i strukturalnie inhibitorów. Ogrom informacji dotyczący coraz to nowych przykładów izolacji opornych szczepów mikroorganizmów czy problemów z terapią antynowotworową zdecydowały, że zaczęłam coraz bardziej zgłębiać ten temat. Po doktoracie, już jako adiunkt w Zakładzie Genetyki Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego zajęłam się szczegółową charakterystyką jednego z nieopisanych dotychczas drożdżowych genów ABC transporterów- genem *YHL035c/VMR1*. Nawiązana wcześniej współpraca z prof. Goffeau zaowocowała możliwością wykorzystania jego

doświadczeń w badaniach ABC transporterów. Wynikiem współpracy była publikacja (**Wawrzycka i** wsp, 2010) stanowiąca jedno z osiągnięć naukowych przedstawionych w niniejszym wniosku. Część przedstawionych w w/w pracy powstało w trakcie stażu podoktorskiego w 2008 r, który odbywałam w laboratorium prof. Michela Ghislain (Department de Biochimie Physiologique, Universite Catholique de Louvain, Belgia). Moje doświadczenie związane z pracą nad ABC transporterami zaowocowało również współpracą z prof. Robertem Wysockim. Wynikiem tej współpracy była praca (Wysocki R, Chéry CC, **Wawrzycka D**, Van Hulle M, Cornelis R, Thevelein JM, Tamás MJ. (2001) The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 40(6):1391-401) dotycząca opisanie roli akwagliceroporyny Fps1 we wrażliwości komórek drożdży na związku arsenu i antymonu. Jednym z głównych elementów oporności komórek drożdżowych na arsen jest aktywność detoksykacyjna zlokalizowanego w błonie wakuolarniej transportera ABC-białka Ycf1. Białko to odpowiada za usuwanie koniugatów As(III)-GS z cytoplazmy do wakuoli. Mój wkład w badania polegał na utworzeniu szczepów drożdżowych z usuniętym genem *YCF1* i weryfikacji ich wrażliwości na arsen. Takie szczepy wykazywały zwiększoną wrażliwość na arsen w związku z czym nadawały się do badania poziomu wprowadzania związków arsenu do komórki poprzez akwagliceroporynę Fps1. Wynikiem ciągłego mojego zainteresowania białkami ABC transporterów i generowaną przez transportery typu efflux opornością były również prace przeglądowe (**Wawrzycka D.**, The ABC transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Postepy Biochem.* 2011;57(3):324-32 i Jarmuła A, Oblak E, **Wawrzycka D**, Gutowicz J., Efflux-mediated antimicrobial multidrug resistance. *Postepy Hig Med Dosw* 2011;65:216-27. Brałam również udział w pracach nad charakterystyką mutantów opornych na czwartorzędowe sole amoniowe, której wyniki przedstawiono w pracy: Oblak E, Piecuch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, **Wawrzycka D**. (2016) Quaternary ammonium salt *N*-(dodecyloxycarbonylmethyl)-*N,N,N*-trimethyl ammonium chloride induced alterations in *Saccharomyces cerevisiae* physiology. *J Biosci.* 41(4):601-614.

Moja współpraca z prof. Wysockim była kontynuowana i znacząco się rozwinęła od momentu, gdy zostałam zatrudniona jako adiunkt w kierowanym przez niego Zakładzie Genetyki i Fizjologii Komórki Uniwersytetu Wrocławskiego. Od tego momentu stałam się członkiem zespołu pracującego nad charakterystyką mechanizmów oporności komórek na związku arsenu i antymonu. Głównym podmiotem badań prowadzonych najpierw przez zespół prof. Stanisława Ułaszewskiego a później przez zespół prof. Wysockiego, był gen *ACR3*. Początkowo wykazano, że delecja genu *ACR3* powoduje drastyczne uwrażliwienie komórek na związku arsenu. W ramach różnych projektów, będąc jednym z głównych wykonawców grantów brałam udział w dalszych badaniach dotyczących charakterystyki białka Acr3, których wyniki były opublikowane w kilku pracach. W pracy 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(11):2170-5 wskazaliśmy, że ekspresja genu *ACR3* indukowana jest zarówno obecnością arsenu jak i antymonu. Wykazaliśmy również, że białko Acr3 lokalizuje się wyłącznie w błonie komórkowej, a jego produkcja jest ściśle

związana z obecnością As(III), As(V) lub Sb(III) w środowisku. Ponadto pomiary aktywności transportowej wykazały, że zarówno As(III) jak i Sb(III) jest przez białko Acr3 wyrzucane z cytoplazmy na zewnątrz komórki. Badania były prowadzone w ramach projektu badawczego MNiSWN301/05931/1785, a wyniki zostały zaprezentowane również w na 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology w Olsztynie.

Kolejna praca w której powstaniu brałam udział to 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(3):747-55. W pracy tej przedstawiliśmy wyniki dotyczące analizy roli poszczególnych reszt cysteinowych w funkcji antyportowej Acr3. Systematyczna mutageneza a następnie charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna poszczególnych mutantów wykazała, że leżąca w środku czwartego regionu transbłonowego (TM4) reszta cysteinowa C151 jest niezbędna do translokacji As(III) i Sb(III) i może być potencjalnym miejscem wiązania arsenu przez Acr3. Mutacja C151V powoduje całkowitą utratę funkcji transportera przy jednoczesnym zachowaniu prawidłowej lokalizacji w błonie komórkowej i nie prowadzi również do zmian ilości białka. Wykazano również istotną rolę reszty C90, której zmiana na alaninę powodowała zaburzenia fałdowania białka Acr3 i jego retencję w ER. Badania były prowadzone w ramach projektu NCN 2012/07/B/NZ1/02804 i zostały również zaprezentowane na dwóch konferencjach: na konferencji 22nd IUBMB and 37<sup>th</sup> FEBS Congress – From Single Molecules to Systems Biology, Sevilla w Hiszpanii oraz na konferencji 26nd International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Frankfurt/Main w Niemczech.

Kolejna praca dotycząca charakterystyki Acr3, w której powstaniu brałam udział to Markowska K, Maciaszczyk-Dziubinska E, Migocka M, **Wawrzycka D**, Wysocki R (2015) Identification of critical residues for transport activity of Acr3p, the *Saccharomyces cerevisiae* As(III)/H<sup>+</sup> antiporter. *Mol Microbiol*. 98(1):162-74. Praca ta była kontynuacją analizy mutacyjnej w kierunku identyfikacji innych niż C151 reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za aktywność transportową Acr3 lub za specyfikę substratową. Przy czym tym razem wybierano konserwatywne, hydrofilowe reaktywne aminokwasy jako potencjalne miejsca oddziaływania z metaloidem lub protonem. Analiza funkcjonalna zmutowanych wersji Acr3 pokazała, że reszty aminokwasowe Asn117, Trp130, Arg150, Trp158, Asn176, Arg230, Tyr290, Phe345, Asn351 są niezbędne do prawidłowego składania i sortowania Acr3 z ER do błony komórkowej. Wykazano również, że mutacje konserwatywnych reszt aminokwasowych: Phe266 (TM7), Phe352 (TM9), Ser349 (TM9), Glu353 (TM9), Glu380 (TM10) powodowały znaczne obniżenie lub całkowity brak aktywności transportowej antyportera Acr3, co wskazuje na ich istotną dla transportu As(III)/H<sup>+</sup> rolę. Badania były prowadzone w ramach projektu NCN 2012/07/B/NZ1/02804 i zostały zaprezentowane na dwóch międzynarodowych konferencjach: na 27<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB), Levico Terme, Trentino we Włoszech i na konferencji Antimony 2015: 3rd International Workshop on Antimony in the Environment, Leipzig w Niemczech.

Wynikiem mojej współpracy z prof. Andrzejem Dzujajem i prof. Dariuszem Rakusem z Zakładu Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Wrocławskiego była publikacja Rakus D., Maciaszczyk E., **Wawrzycka D.**, Ułaszewski S., Eschrich K., Dzujaj A. (2005) The origin of the high sensitivity of muscle fructose 1,6-bisphosphatase towards AMP. *FEBS Letters* 579(25):5577-5581 przedstawione w niej badania dotyczyły różnic we wrażliwości ludzkiej mięśniowej i wątrobowej izoformy fruktozo 1,6-bisfosfatazy (FBPazy), kluczowego enzymu gliko-i glukoneogenezy, na AMP. Mój udział polegał na przygotowaniu mutantów i ekspresji zmutowanych form białek w *E. coli*. Podstawową różnicą między mięśniową i wątrobową FBPazą jest ich inna wrażliwość na AMP. Mutageneza ukierunkowana reszt aminokwasowych w obu formach, pozwoliła na określenie roli aminokwasów K20, K20, T177, Q179 w silniejszym wiązaniu AMP przez mięśniową izoformę FBPazy.

W ramach prowadzonych wraz z dr Gabriellą Orłowską-Matuszewską badań nad charakterystyką wybranych genów z III chromosomu drożdży, których wyniki zostały przedstawione w pracy: Orłowska-Matuszewska G, **Wawrzycka D.** (2006) A novel phenotype of eight spores asci in deletants of the prion-like Rnq1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(1):190, wyodrębniono gen *RNQ1*. W wyniku wewnątrzkomórkowych konformacji produkt tego genu, białko Rnq1 może być przekształcone w prionową formę [*RNQ+*/*PIN+*], która tworzy złożone amyloidowe. W naszej pracy wykazałyśmy, że delekcja genu *RNQ1* powoduje zaburzenia sporulacji diploidalnych komórek drożdży *S. cerevisiae*, przy zachowaniu prawidłowej żywotności haploidów, procesów koniugacji, tworzenie i podziały zygoty. Zaobserwowano, że z dużą częstością tworzone przez komórki  $\Delta r n q 1 / \Delta r n q 1$  były worki o zwiększonej nieregularnej liczbie spor (od 5 do 8 spor). Obserwacje w mikroskopie skaningowym wykazały, że zwiększona liczba spor w kompleksie nie wynika z przypadkowego sklejenia się więcej niż jednego worka. Wykazałyśmy, że wszystkie spory zawierają jądro komórkowe. Segregacja typu płciowego spor w poszczególnych workach wykazywała dużą zmienność i często wskazywała na nierównowagę typu MAT $\alpha$  i MATa (nawet 1:5). Według nas efekt ten wynika z dodatkowych podziałów mitotycznych jedynie części spor w worku. Co ciekawe podobny efekt zaburzeń sporulacji zaobserwowaliśmy przy nadekspresji *RNQ1*. Jest to zgodne z fenomenem fenotypu prionowego gdzie zarówno delekcja jak i nadekspresja powodują ten sam efekt (Aigle i Lacroute, 1975). Oznacza to, że zarówno brak Rnq1 jak i indukowane nadekspresją formowanie prionowych wersji białka [*RNQ+*] powoduje zaburzenia procesu powstawania haploidalnych spor. Może to wskazywać na ochronną rolę Rnq1 w procesach podziału mejotycznego komórki. Jednocześnie zwiększenie liczebności spor może tłumaczyć zwiększoną, w stosunku do innych prionów, częstość występowania [*RNQ+*] w populacji. Rnq1 może wpływać na zachowanie homeostazy białkowej i adaptację komórek do zmian środowiska poprzez mobilizowanie innych białek prionowych do tworzenia złogów amyloidowych. Badania na drożdżach wskazują, że różnorodność form konformacyjnych prionów wpływa na szybkie dostosowanie się do zmian środowiskowych.

Drożdże *S. cerevisiae* używane są jako modelowy organizm również w heterologicznej ekspresji genów ludzkich. Z sukcesem są wykorzystywane do badania przyczyn i mechanizmu



tworzenia złogów amyloidowych, charakterystycznych dla chorób neurodegeneracyjnych. Zagadnienia wykorzystania drożdży w badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi bardzo mnie zainteresowały w trakcie badań nad prionowym białkiem. Przygotowałam pracę przeglądową przedstawiającą dotychczasowe wyniki dotyczące badań nad mechanizmem chorób neurodegeneracyjnych z wykorzystaniem drożdży: **Wawrzycka D.** (2011) Yeast as a model for studying neurodegeneration. *Postepy Hig Med Dosw.* 65:328-37. W tym okresie nawiązałam również współpracę z dr Sandrą Tenreiro i prof. Tiago Outeiro z New University of Lisbon, NOVA Chronic Diseases Research Centre (CEDOC) w Portugalii. Grupa ta od kilku lat pracowała nad wyjaśnieniem roli alfa-synukleiny ( $\alpha$ -Syn) w generowaniu zmian neurodegeneracyjnych w chorobie Parkinsona. Badania prowadzone były również na modelu drożdżowym.  $\alpha$ -Syn jest głównym komponentem wewnątrzkomórkowych patologicznych agregatów/złogów białkowych zwanych ciałkami Lewy'ego, charakterystycznych dla synukleinopatii np. choroby Parkinsona. Fizjologiczna rola  $\alpha$ -Syn nie jest określona. W ramach wspólnych badań wykazaliśmy, że  $\alpha$ -Syn ulega fosforylacji na S129, przy czym wykryto, że poziom fosforylacji zwiększa się dla form  $\alpha$ -Syn ułożonych w złogach. Nasze badania wskazały, że zablokowanie fosforylacji poprzez wprowadzenie mutacji S129A powodowało zwiększenie intensywności, różnorodności i wielkości złogów tworzonych przez formy S129A w stosunku do tych tworzonych przez natywne białko  $\alpha$ -Syn. Ponadto fosforylacja bezpośrednio wpływa na proteostazę  $\alpha$ -Syn. Wykazaliśmy, że mutowane formy  $\alpha$ -Syn S129A ulegają stabilizacji, proces ich usuwania i autofagii jest znacznie zredukowany. Wskazuje to na kluczową rolę poziomu fosforylacji białka  $\alpha$ -Syn w generowaniu synukleinopatii. Poziom fosforylacji reszty serynowej S129 wpływa zarówno na zabezpieczeniu przed agregacją  $\alpha$ -Syn jak i w późniejszym oczyszczaniu komórki ze złogów w procesie autofagii. Wyniki naszych doświadczeń zostały przedstawione w pracy Tenreiro S, Reimão-Pinto MM, Antas P, Rino J, **Wawrzycka D**, Macedo D, Rosado-Ramos R, Amen T, Waiss M, Magalhães F, Gomes A, Santos CN, Kaganovich D, Outeiro TF. (2014) Phosphorylation modulates clearance of alpha-synuclein inclusions in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS Genet.* 10(5):e1004302. doi:10.1371/journal.pgen.1004302. Współpracę z dr Tenreiro nadal kontynuuję w ramach badań nad proteostazą. Wynikiem tej współpracy będzie realizacja przez moją magistrantkę praktyki studenckiej w ramach projektu realizowanego pod kierunkiem dr Tenreiro w Chronic Diseases Research Centre (CEDOC) w Portugalii.

Portugalscy koledzy rekomendowali mnie również do udziału w programie COST PROTEOSTASIS. W latach 2014-2018 byłam przedstawicielem Polski w Komitecie Zarządzającym (Management Committee) Europejskiego Programu Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych (COST) dla projektu BM1307 Proteostasis. Udział w tym projekcie umożliwił mi bezpośredni kontakt z europejskimi naukowcami zajmującymi się zjawiskiem ubikwitynacji, degradacji, sortowania, stabilności białek i ich patogenicznych konsekwencji. Otworzył też drogę do możliwości skorzystania z

dostępnych w sieci laboratoriów szczepów i metod, jak również finansowania na szkolenia młodych naukowców i udział w konferencjach. Mam ogromną nadzieję na kontynuację zawiązanych współpracy.

### Plany na przyszłość

Dotychczasowe badania nad charakterystyką transportera Acr3 kontynuujemy w ramach projektu badawczego NCN nr 2015/19/B/NZ1/00327. Badania prowadzone są w kierunku wyznaczenia reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za aktywność transportową. Chcielibyśmy określić również miejsca odpowiedzialne za specyfikę substratową białka Acr3. Ponadto staramy się zidentyfikować miejsca istotne w proteostazie białka Acr3 i interakcji z białkami adaptorów.

Sumaryczny Impact Factor dla wszystkich publikacji wnioskodawcy, zgodnie z rokiem publikacji wynosi **54,5**, + jedna spoza listy Web of Science

Liczba punktów MNiSW za wszystkie publikacje wnioskodawcy wynosi: **483**

Liczba cytowani wszystkich publikacji wnioskodawcy wg bazy Web of Science wynosi: **381**

Indeks Hirsha według bazy Web of Science wynosi – **8**

Dane na dzień 05.04.2019

### LITERATURA

- Ahn R.W., O'Halloran T.V. i wsp.(2010) A novel nanoparticulate for mutation of arsenic trioxide with enhanced therapeutic efficacy in a murine model of breast cancer. *Clin Cancer Res.* 16(14):3607-17.
- Alhadeff R, Ganoth A, Arkin IT, (2015) Mechanistic studies of the apical sodium dependent bile acid transporter, *Proteins* 83:1107–1117
- Aznab M., Rezaei M. (2015) Induction, consolidation, and maintenance therapies with arsenic as a single agent for acute promyelocytic leukaemia in a 11-year follow-up. *Hematol. Oncol.* doi: 10.1002/hon.2253
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW., (2008) Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science* 319, 916
- Barrett M.P., Croft S.L (2012) Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Brit. Med. Bull.* 104, 175–196
- Banerjee M., Carew M.W., Roggenbeck B.A., Whitlock B.D., Naranmandura H., Le X.C., Leslie E.M. (2014) A novel pathway for arsenic elimination: human multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates cellular export of dimethylarsinic acid (DMAV) and the diglutathione conjugate of mono-methylarsonous acid (MMAIII). *Mol. Pharmacol.* 86, 168–179
- Becuwe M, Vieira N, Lara D, Gomes-Rezende J, Soares-Cunha C, Casal M, Hagenauer-Tsapis R, Vincent O, Paiva S, Leon S., (2012) A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signalling to transporter endocytosis, *J. Cell Biol.* 16:247–259
- Berkower C, Loayza D, Michaelis S. (1994) Metabolic instability and constitutive endocytosis of STE6, the a-factor transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 5(11):1185-98
- 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
- Chou W.C., Jie C., Kenedy A.A., Jones R.J., Trush M.A., Dang C.V.(2004) Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:4578–4583
- Carew M.W., Leslie E.M.(2010) Selenium-dependent and -independent transport of arsenic by the human multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2): implications for the mutual detoxification of arsenic and selenium. *Carcinogenesis*, 31:1450–1455
- Chung N, Jenkins G, Hannun YA, Heitman J & Obeid LM., (2000) Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin dependent proteolysis. *J Biol Chem* 275: 17229–17232
- Cournia Z, et al., (2015) Membrane protein structure, function, and dynamics: a perspective from experiments and theory. *J Membr Biol* 248:611–640
- Dardalhon M, Lin W, Nicolas A & Averbek D (2007) Specific transcriptional responses induced by 8-methoxypsoralen and UVA in yeast. *FEMS Yeast Res* 7: 866–878.
- Dean M (2002) The Human ATP-Binding Cassette (ABC)Transporter Superfamily. National Library of Medicine
- Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, de Wet H, McIntosh DB, Goffeau A. (1998) ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem.* 273(20):12612-22.
- De Waard M. A., Andrade A. C., Hayashi K., Schoonbeek H.-J., Stergiopoulos I., Zwiers L.-H. (2006). Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest. Manag. Sci.* 62, 195–207 10.1002/ps.1150

- Dilda P.J., Hogg P.J.(2007) Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat. Rev.*33:542–564
- Dufour JP, Amory A & Goffeau A (1988) Plasma membrane ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 157: 513–528.
- Dunn R., Hicke L. (2001) Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Mol. Biol. Cell*, 12: 421-35
- Elkhiel L, Soustre I, Karst F., Letourneux Y (1994) Aminoand aminomethylcholesterol derivatives with fungicidalactivity. *FEMS Microbiol Lett* 120: 163–167
- Feyder,S., De Craene JO, Bar S, Bertazzi DL, Friant S, (2015) Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model, *Int. J. Mol. Sci.* 16:1509–1527
- Flora S.J. (2011) Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic. Biol. Med.* 51:257–281
- Flora S.J., Singh N.(2007) Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *J. Environ. Biol.*28, 333–347
- Fujita S, Sato D, Kasai H, Ohashi M, Tsukue S, Takekoshi Y, Gomi K, Shintani T, (2018) The C-terminal region of the yeast monocarboxylate transporter Jen1 acts as a glucose signal-responding degron recognized by the  $\alpha$ -arrestin Rod1, *J. Biol. Chem.* 293:10926–10936.
- Goffeau A., Balzi E.(1994) Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta.*,1187(2):152-62
- Gournas C, Saliba E, Krammer EM, Barthelemy C, Prevost B (2017) Transition of yeast Can1 transporter to the inward-facing state unveils an  $\alpha$ -arrestin target sequence promoting its ubiquitylation and endocytosis, *Mol. Biol. Cell* 28:2819–2832
- Guiney I, Klecker T, Emr SD, (2016) Identification of the endocytic sorting signal recognized by the Art1-Rsp5 ubiquitin ligase complex, *Mol. Biol. Cell* 27:4043–4054.
- Harvey CS et al. (2006) Groundwater dynamics and arsenic contamination in Bangladesh. *Chemical Geology*, 228:112-136
- Hershko A, Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. ***Annu Rev Biochem*** 67: 425–479
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer.* 13(10):714-26
- Hossain, M.F. (2006) As contamination in Bangladesh- An found highly toxic. *The Times of India.* New Delhi, Agri Ecosystem Environ. 113 (1-4): 1-16
- Hosseini M.J., Shaki F., Ghazi-Khansari M., Pourhmad J.(2013) Toxicity of arsenic (III) on isolated liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Iranian J. Pharm. Res.*12:121–138
- Housman G., Byler S., Heerboth S., Lapinska K., Longacre M., Snyder N., Sarkar S., (2014) Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel)*. 6(3):1769–1792
- Hu NJ, Iwata S, Cameron AD, Drew D,(2011) Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT, *Nature* 478:408–411
- Ibstedt S., Sideri T.C., Grant C.M., Tamás M.J.(2014) Global analysis of protein aggregation in yeast during physiological conditions and arsenite stress. *Biology Open*, 3, 913–923
- Iwahashi H, Odani M, Ishidou E & Kitagawa E (2005) Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. *FEBS Lett* 579: 2847–2852
- Jena N.R.(2012) DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* 37:503–517
- Jarmuła A, Obłąk E, Wawrzycka D, Gutowicz J. (2011) Efflux-mediated antimicrobial multidrug resistance. *Postepy Hig Med Dosw* 65:216-27
- Kasanov J, Pirozzi G, Uveges AJ, Kay BK, (2001) Characterizing class I WW domains defines key specificity determinants and generates mutant domains with novel specificities, *Chem. Biol.* 8:231–241
- Katzmann DJ, Hallstrom TC, Voet M, Wysock W, Golin J, Volckaert G, Moye-Rowley WS. (1995) Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol.* 15(12):6875-83
- Keener JM, Babst M, (2014) Quality control and substrate-dependent downregulation of the nutrient transporter Fur4, *Traffic* 14:412–427
- Kim H.C., Huijbregtse J.M. (2009) Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. *Mol. Cell. Biol.*; 29: 3307-3318
- Klein M, Mamnun YM, Eggmann T, Schuller C, Wolfger H, Martinoia E & Kuchler K (2002) The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett* 520: 63–67.
- Kończakowska A, Manente M, Kończakowski M, Laba J, Ghislain M, Wawrzycka D (2012) The regulatory inputs controlling pleiotropic drug resistance and hypoxic response in yeast converge at the promoter of the aminocholesterol resistance gene RTA1. *FEMS Yeast Res.* 2012;12(3):279-92
- Kumar V, et al., (2016), Amyloid- $\beta$  Peptide Protects Against Microbial Infection In Mouse and Worm Models of Alzheimer's Disease *Sci Transl Med.* 8(340):340-72
- Leslie E.M., Haimour A., Waalkes M.P. (2014) Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.* 279, 32700–32708
- Léon S., Haguenauer-Tsapis R.(2009) Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp. Cell Res.*, 315:1574-1583
- Li Z, Szczyepka M, Lu Y, Thiele D & Rea P (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* 271: 6509–6517.
- Lin CH, MacGurn JA, Chu T, Stefan CJ, Emr SD,(2008) Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface, *Cell* 135:714–725
- Litwin I., Bocer T., Dziadkowiec D., Wysocki R.(2013) Oxidative stress and replication-independent DNA breakage induced by arsenic in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.*9, e1003640
- Livermore D., (1995)  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 35:7-22
- Mattern J., and Volm M, (1993) Multiple pathway drug resistance. *Int. J. Oncol.* 2:557-561

- 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(11):2170-5.
- 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, 1855–1859:57.629
- Maciaszczyk-Dziubinska E, Wawrzycka D, Wysocki R (2012) Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *Int J Mol Sci*. 13(3):3527-48
- 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(3):747-55
- 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(1):162-74
- Merhi A, Andre B, (2012) Internal amino acids promote Gap1 permease ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-dependent control of the Bul arrestin-like adaptors, *Mol. Cell. Biol*. 32:4510–4522.
- Mell JC., Burgess SM (2002) Yeast as a Model Genetic Organism Chapter 10.1038/npg.els.0000821
- Moore KS., Roder H., Rogers M., Forrest JN., McCrimmon D., Zasloff M., (1993) Squalamine: an aminosterol antibiotic from the shark. *PNAS USA* 90(4):1354-1358
- Morschhäuser J (2010) Review Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol*. 47(2):94-106
- Nikko E., Pelham RB.(2009) Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters, *Traffic* 10:1856–1867.
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. (2003) *Microbiol Mol Biol Rev*. 67(4):593–656.
- Nittis J., and Beck WT., (1996) Antitopoisomerase drug action in resistance. *Eur. J. Cancer* 325:958-966
- Oblak E, Piecuch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Wawrzycka D., (2016) Quaternary ammonium salt *N*-(dodecyloxy-carboxymethyl)-*N,N,N*-trimethyl ammonium chloride induced alterations in *Saccharomyces cerevisiae* physiology. *J Biosci*. 41(4):601-614
- Orłowska-Matuszewska G, Wawrzycka D. (2006) A novel phenotype of eight spores asci in deletants of the prion-like Rnq1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 340(1):190
- Ortiz D, St Pierre M, Abdulmessih A & Arias IM (1997) A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem* 272: 15358–15365
- Paulsen IT., Sliwinski MK., Nelissen B., Goffeau A., Saier MH., (1998) Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *S. cerevisiae*. *FEBS Lett*. 430(1-2):116-25
- Paumi CM, Chuk M, Snider J, Staglar I & Michaelis S (2009) ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and their interactors: new technologies advances the biology of the ABC (MRP) subfamily. *Microbiol Mol Biol R* 73: 577–593
- Pedersen PL (2007) Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr*. 39(5-6):349-55.
- Petrovic S, Pascolo L, Gallo R, Cupelli F, Ostrow JD, Goffeau A, Tiribelli C & Bruschi CV (2000) The products of YCF1 and YLL015w (BPT1) cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *S. cerevisiae*. *Yeast* 16:561–571
- Piper RD, Dikic I, Lukacs GL,(2014) Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 6 (2014) a016808
- Plonka M., Wawrzycka D., Wysocki R., Boguta M., Cieśla M., (2019) Coupling of RNA polymerase III assembly to cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Cycle* 18(4):500-510
- 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(25):577-81
- Rosen B.P. (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*, 529:86–92
- Safiuddin, M. and Karim, M. M. (2001) Groundwater As perspective on naturally occurring As problems in ground contamination in Bangladesh: Causes, effects and water. *As Exposure & Health Effects*. 4: 9-25.
- Saier MH; (2000). A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64(2): 354–411.
- Sharma K, Mason D, Liu G, Rea P, Bachhawat A & Michaelis S (2002) Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell* 1: 391–400.
- Shcherbik N, Kee Y, Lyon N, Huibregtse JM, Haines DS, (2004) A single PXY motif located within the carboxyl terminus of Spt23p and Mga2p mediates a physical and functional interaction with ubiquitin ligase Rsp5p, *J. Biol. Chem*. 279:53892–53898.
- Soustre I, Letourneux Y & Karst F (1996) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *RTA1* gene involved in 7-aminocholesterol resistance. *Curr Genet* 30: 121–125
- Swatek KN, Komander D. (2016) Ubiquitin modifications. *Cell Res* 26: 399–422
- Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM (2006) Targeting multidrug resistance in cancer *Nat Rev Drug Discov*. 5(3):219-34
- Taglicht G., and Michaelis S., (1998) *S. cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. *Methods in Enzymol*. 292:130-163
- Tamás M.J., Sharma S.K., Ibstedt S., Jacobson T., Christen P.(2014) Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules* 4:252–267
- Tan X., Yang L., Xian L., Huang J., Di C., Gu W., Guo S., Yang L. (2014) ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) promotes arsenic tolerance in human cells by reducing cellular arsenic accumulation. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol*. 41:287–294

- Tenreiro S, Reimão-Pinto MM, Antas P, Rino J, Wawrzycka D, Macedo D, Rosado-Ramos R, Amen T, Waiss M, Magalhães F, Gomes A, Santos CN, Kaganovich D, Outeiro TF. (2014) Phosphorylation modulates clearance of alpha-synuclein inclusions in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS Genet.* 10(5):e1004302. doi:10.1371/journal.pgen.1004302
- Tyedmers J, Mogk A, Bukau B.(2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Rev. Mol Cell Biol.* 11:777-788
- Wawrzycka D, Sobczak I, Bartosz G, Bocier T, Ułaszewski S, Goffeau A (2010) Vmr 1p is a novel vacuolar multidrug resistance ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 10(7):828-38
- Wawrzycka D. (2011) The ABC transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Postepy Biochem.* 2011;57(3):324-32
- Wawrzycka D. (2011) Yeast as a model for studying neurodegeneration. *Postepy Hig Med Dosw.* 2;65:328-37
- Wawrzycka D, Markowska K, Maciaszczyk-Dziubinska E, Migocka M, Wysocki R (2017) Transmembrane topology of the arsenite permease Acr3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1859(1):117-125
- Wawrzycka D., Mizio K. (2018) Ubikwitynacja, kontrola jakości i degradacja białek błonowych – szansa na terapię? *Potępy Hig Med Dosw* ; 72 : 512-525.
- Wawrzycka D., Sadlak J., Maciaszczyk-Dziubinska E., Wysocki R., (2019) Rsp5-dependent endocytosis and degradation of the arsenite transporter Acr3 requires its N-terminal acidic tail as an endocytic sorting signal and arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*, 1861(5): 916-925
- Wemmie JA & Moye-Rowley WS (1997) Mutational analysis of the *S. cerevisiae* ATP-binding cassette transporter protein Ycf1p. *Mol Microbiol* 25: 683–694.
- 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, Chéry CC, Wawrzycka D, Van Hulle M, Cornelis R, Thevelein JM, Tamás MJ. (2001) The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 40(6):1391-401
- Zarrinpar A., Lim W.A.(2000) Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat. Struct. Biol.*, 7: 611-613
- Zhao L., Chen S., Jia L., Shu S., Zhu P., Liu Y.(2012) Selectivity of arsenite interaction with zinc finger proteins. *Metallomics*, 4:988–994
- Zhou X, Levin EJ, Pan Y, McCoy JG, Sharma R, Kloss B, Bruni R, Quick M, Zhou M,(2014) Structural basis of the alternating-access mechanism in a bile acid transporter, *Nature* 505:569–573

