

STRESZCZENIE

„Charakterystyka transportera arsenowego Acr3 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*”

Arsen i antymon to toksyczne metaloidy powszechnie występujące w środowisku, stanowiące poważny problem rolniczy i medyczny w wielu rejonach świata. Z drugiej strony oba metaloidy stosowane są w leczeniu niektórych typów nowotworów oraz pasożytniczych chorób tropikalnych. Niestety terapia z użyciem leków zawierających ich związki jest często nieskuteczna ze względu na szybkie nabywanie przez organizmy oporności. Zlokalizowany w błonie komórkowej antyporter Acr3 u drożdży *S. cerevisiae* uczestniczy w aktywnym usuwaniu arsenu i antymonu na zewnątrz komórek w sprzężeniu z transportem protonów i służy jako model do badania właściwości wszystkich członków rodziny Acr3 obecnych u bakterii, grzybów i niższych roślin. Niedawno pokazano, że znajdująca się w środku czwartego regionu transbłonowego (TM4) reszta Cys151 ma kluczowe znaczenie dla aktywności antyportowej wskazując, że As(III) może oddziaływać z grupą tiolową podczas procesu translokacji. W tej pracy, w celu zidentyfikowania innych funkcjonalnie ważnych reszt uczestniczących w wymianie As(III)/H⁺ w pierwszej kolejności potwierdzono eksperymentalnie dziesięcio-transbłonową topologię drożdżowego białka Acr3, a następnie przeprowadzono systematyczną analizę mutacyjną szeregu obdarzonych ładunkiem, polarnych bez ładunku i aromatycznych aminokwasów, konserwatywnych w rodzinie Acr3 i znajdujących się w obrębie segmentów transmembranowych. W jej wyniku zidentyfikowano dziewięć reszt (Asn117, Trp130, Arg150, Trp158, Asn176, Arg230, Tyr290, Phe345 i Asn351), które są niezbędne do prawidłowego fałdowania i sortowania białka Acr3 do błony komórkowej. Ponadto stwierdzono, że zamiana reszt Phe266 (TM7), Phe352 (TM9), Glu353 (TM9) i Glu380 (TM10) na Ala całkowicie zniósła aktywność transportową Acr3, natomiast mutacja Ser349 (TM9) na Ala znacząco zredukowała wymianę As(III)/H⁺, sugerując istotną ich rolę w mechanizmie antyportu. Szczegółowa analiza Glu353 i Glu380 ujawniła z kolei, że obecność ujemnie naładowanych reszt w środku regionu TM9 i TM10 jest niezbędna dla funkcji transportowej Acr3 i mogą one stanowić miejsca wiązania protonu(ów). Na podstawie podobieństwa topologii drożdżowego białka Acr3 i dwóch bakteryjnych symporterów kwasów żółciowych zależnych od sodu (ASBT) należących do tej samej nadrodziny BART oraz homologicznego modelu jego trójwymiarowej struktury, a także w oparciu o dane literaturowe dotyczące innych transporterów wtórnych o podobnej budowie i sposobie działania, zaproponowano hipotetyczny mechanizm wymiany metaloid/proton katalizowany przez drożdżowy transporter Acr3.

16.03.2016r. , K. Markowska

ABSTRACT

„Characterization of arsenic transporter Acr3 in yeast *Saccharomyces cerevisiae*”

Arsenic and antimony are toxic metalloids which are commonly present in the environment leading to major agriculture and medical problems in many parts of the world. On the other hand, both metalloids are used in the treatment of some types of cancer and protozoan tropical diseases. However, metalloid-based drugs are often not effective as organisms may quickly acquire resistance to these compounds. The plasma membrane proton-driven antiporter Acr3 from *S. cerevisiae* mediates active extrusion of arsenic and antimony out of yeast cells and serves as a model to study properties of all members of Acr3 family present in prokaryotes, fungi and lower plants. It has been previously showed that Cys151 located in the middle of the fourth transmembrane segment (TM4) is critical for antiport activity, suggesting that As(III) might interact with a thiol group during the translocation process. In this work, in order to identify other functionally important residues involved in As(III)/H⁺ exchange, first the ten-transmembrane topology of the yeast Acr3 protein was experimentally confirmed using two complementary methods. Then a systematic alanine-replacement analysis of charged/polar and aromatic amino acid residues that are conserved in the Acr3 family and located in transmembrane segments was performed. Nine residues (Asn117, Trp130, Arg150, Trp158, Asn176, Arg230, Tyr290, Phe345, Asn351) were revealed to be critical for proper folding and trafficking of Acr3 to the plasma membrane. Moreover, it was found that replacement of highly conserved residues Phe266 (TM7), Phe352 (TM9), Glu353 (TM9) and Glu380 (TM10) with Ala abolished transport activity of Acr3, while mutation of Ser349 (TM9) to Ala significantly reduced the As(III)/H⁺ exchange, implying an important role of these residues in the antiport mechanism. Detailed mutational analysis of Glu353 and Glu380 unveiled that the negatively charged residues located in the middle of transmembrane segments TM9 and TM10 are absolutely essential for Acr3 activity and may contribute to proton(s) binding. Based on the topological similarity between the yeast Acr3 and two bacterial sodium bile acid symporters (ASBT) belonging to the same Bile/Arsenite/Riboflavin Transporter (BART) superfamily and a homologous model of its three-dimensional structure as well as the literature data concerning other secondary active transporters that share similar topology, structure, and mode of action, a hypothetical mechanism of metalloid/proton exchange catalyzed by the yeast Acr3 transporter has been proposed.