

AGNIESZKA KUTROWSKA

*Zakład Biochemii
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii
Collegium Biologicum
Umultowska 89, 61-614 Poznań
E-mail: akutr@amu.edu.pl*

ROŚLINNE TRANSPORTERY BŁONOWE METALI ŚLADOWYCH

WPROWADZENIE

W roztworze glebowym we frakcji biodostępnej znajduje się wiele substancji odżywczych niezbędnych do rozwoju roślin. Wśród mikro- i makroelementów można wyróżnić grupę metali śladowych, czyli metali przejściowych o masie atomowej większej niż 20. Metale śladowe to m.in. ołów, rtęć, kadm, cynk, miedź, mangan, nikiel, kobalt i chrom (NAGAJYOTI i współaut. 2010). Wymienione pierwiastki w dostępnej literaturze są nazywane także metalami ciężkimi, ponieważ ich masa właściwa (masa 1 cm³) jest większa niż 5 g/cm³. Zmiana nazewnictwa z „metali ciężkich” na „metale śladowe” pozwala na włączenie do opisywanej grupy także pierwiastków lżejszych takich jak np. glin (2,6 g/cm³), o podobnych właściwościach i toksyczności dla organizmów (KRZESŁOWSKA i współaut. 2010).

Metale śladowe można podzielić na: metale konieczne do prawidłowego funkcjonowania komórek roślinnych (m.in. Fe, Cu, Mn, Co, Zn, Ni) oraz metale niekonieczne (np. Cd, Hg, Pb, Cr). Metale konieczne są niezbędne do funkcjonowania wielu białek w komórkach (m.in. są integralną częścią fotosystemów I i II) i/lub regulują przebieg rozmaitych procesów (np. fotosyntezy, metabolizmu azotu czy oddychania) (KRÄMER i współaut. 2007, JADIA i FULEKAR 2009). Zarówno nadmiar, jak i deficyt tych pierwiastków jest szkodliwy dla rośliny. W przypadku metali niekoniecznych wyróżnia się dawkę toksyczną dla rośliny, zależną od rodzaju metalu,

gatunku (lub nawet odmiany) i stanu badanego organizmu (PERALTA-VIDEA i współaut. 2009, KRZESŁOWSKA i współaut. 2010). Utrzymywanie homeostazy poprzez kontrolowanie pobierania, transportu, wypompowywania i sekwestracji metali zarówno koniecznych, jak i niekoniecznych, jest kluczowe dla prawidłowego działania komórek i organizmu (KRÄMER i współaut. 2007).

Metale śladowe obecne są w wierzchnich warstwach gleby, skąd są pobierane przez rośliny. Zmiany zawartości i dostępności metali w glebie zależą od wielu czynników, w dużej mierze także od działalności człowieka. Źródłami zanieczyszczeń metalami ciężkimi są m.in.: składowiska odpadów, szlamy ściekowe, huty metali nieżelaznych, kopalnie, środki ochrony roślin, pestycydy, nawozy i fungicydy (JADIA i FULEKAR 2009, NAGAJYOTI i współaut. 2010).

Istnieją dwie grupy roślin, które potrafią wzrastać i rozmnażać się nawet w warunkach wysokiego zanieczyszczenia metalami śladowymi (czy to wywołanych naturalnymi procesami glebotwórczymi, czy też pochodzenia antropogenicznego). Do pierwszej grupy należą rośliny wykluczające, ograniczające pobieranie metali ze środowiska. Poza zmniejszonym pobieraniem, rośliny te unieruchamiają i unieczynnają metale w strefie korzenia, aby nie dopuszczać do translokacji do organów najbardziej wrażliwych na zanieczyszczenie. Druga grupa charakteryzuje się z kolei obecnością wydajnych systemów de-

toksykacji metali i translokacji jonów metali do części nadziemnych (VERKLEIJ i współaut. 2009, RASCIO i NAVARI-IZZO 2011). Rośliny te gromadzą w swoich tkankach wysokie ilości metali (nawet do 100 i 1000 razy większe niż u roślin nie-akumulujących) i stąd są nazywane hiperakumulatorami (MIRANSARI 2011). Przystosowania hiperakumulatorów do zwiększonego gromadzenia metali nie wy-

nikają z pojawienia się genów *de novo*, ale ze zmienionej regulacji i ekspresji genów obecnych w roślinach nieakumulujących (RASCIO i NAVARI-IZZO 2011). Coraz więcej badań wskazuje, że najważniejszą strategią detoksykacji w hiperkumulatorach może nie być wiązanie jonów metali do ligandów, ale ich translokacja i sekwestracja, głównie w wakuolach liści (KÜPPER i KOCHIAN 2010).

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA DOSTĘPNOŚĆ METALI DLA ROŚLIN

Nie wszystkie metale obecne w glebie są łatwo dostępne dla roślin. Efektywność pobierania metali z podłoża przez komórki rośliny zależy od: postaci metalu śladowego, odczynu podłoża, zawartości substancji organicznych w podłożu i stężenia innych jonów.

Wolne jony (np. Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+}) oraz niskocząsteczkowe, nieorganiczne związki kompleksowe są łatwiej pobierane z gleby niż związki makrocząsteczkowe. Jednym z najważniejszych czynników warunkujących mobilność metali w glebie jest wartość pH podłoża. Przystawalność większości metali zwiększa się wraz ze spadkiem pH. W przypadku deficytu mikro- i makroele-

mentów rośliny mogą obniżyć odczyn gleby dzięki działaniu zawartych w błonie komórkowej ATP-zależnych pomp protonowych (PALMER i GUERINOT 2009). Gleby bogate w koloidy mineralne i organiczne skuteczniej wiążą substancje toksyczne, zmniejszając ich mobilność (SIWEK 2008). Na zdolność roślin do pobierania poszczególnych metali wpływ ma także obecność w podłożu innych jonów. Zwiększone stężenie metali śladowych w środowisku zaburza naturalnie występującą równowagę jonową w glebie, zmieniając działanie korzeniowego systemu pobierania jonów (KRZESŁOWSKA i współaut. 2010).

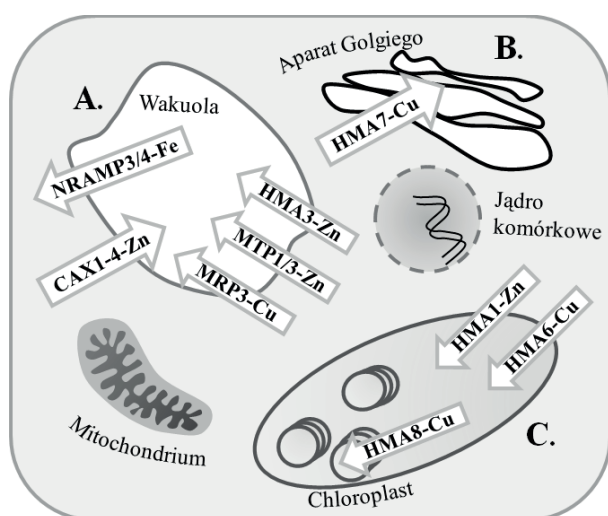
POBIERANIE I TRANSPORT METALI ŚLADOWYCH

Komórki korzenia do pewnego stopnia mogą regulować ilość pobieranych ze środowiska metali ciężkich. Ściana komórkowa korzenia jest pierwszą barierą dla metali. Składniki budulcowe ściany (głównie polisacharydy bogate w grupy karboksylowe) wiążą dwu- i trójwartościowe jony metali. Badania z ostatnich lat wskazują, że metale związane z pektynami ściany komórkowej nie są całkowicie unieruchomione – mogą zostać pobrane przez roślinę na drodze endocytozy kompleksu metal-pektyna (KRZESŁOWSKA 2011). Kolejną barierą (pierwszą prawdziwie selektywną) jest błona komórkowa, pokonywana przez jony metali poprzez transportery dla niezbędnych kationów (Ryc. 1). Transportery te nie charakteryzują się wysoką specyficznością i mogą pobierać również metale niekonieczne, o podobnych właściwościach fizycznych do właściwych ligandów. Białka pobierające metale do komórki wykazują często specyficzność do jonów metali znajdujących się na konkretnym stopniu utlenienia. Na przykład jony Fe^{2+} są bez problemu pobierane do cytoplazmy, podczas gdy jony Fe^{3+} mu-

szą zostać najpierw albo zredukowane albo pobrane w formie schelatowanej (HAYDON i COBBETT 2007, PALMER i GUERINOT 2009).

Po pobraniu ze środowiska jony metali mogą zostać: przekazane do następnej komórki przez plazmodesmy (droga symplastyczna), wypompowane z cytozolu przez błonę komórkową na zewnątrz komórki lub przetransportowane do organelli komórkowych (do chloroplastów, mitochondriów i aparatu Golgiego) lub do wakuoli, gdzie ulegają sekwestracji (JADIA i FULEKAR 2009, KRZESŁOWSKA i współaut. 2010).

Opisany wcześniej transport metali na małą odległość (z gleby do komórki korzenia) jest pierwszym etapem transportu dalekiego, do pędu i do nasion (Ryc. 2). Oczywiście jest, że niezbędne metale śladowe muszą trafić także do dalszych komórek, a nie tylko do komórek korzenia. Jony metali, głównie w postaci skompleksowanej, są transportowane od komórek epidermy drogą symplastyczną do perycyklu, skąd są aktywnie przenoszone (ładowane) do ksylemu. Dzięki ruchowi wymuszonemu przez transpi-



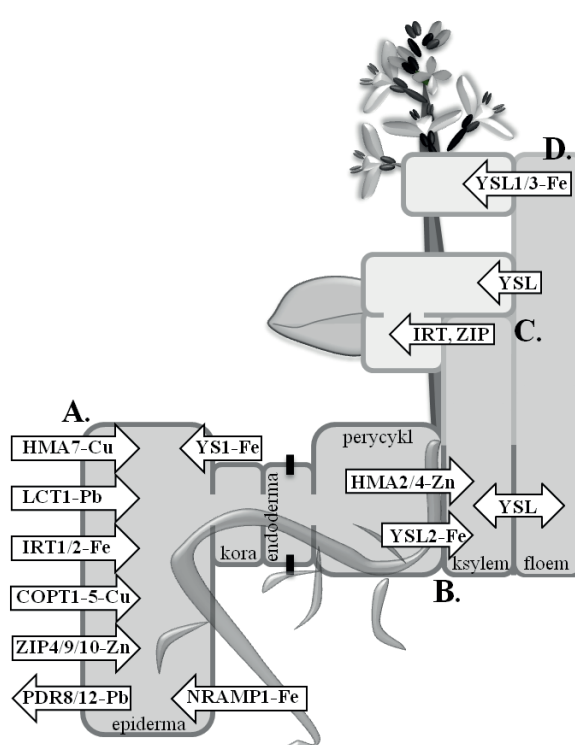
Ryc. 1. Białka uczestniczące w transporcie metali w komórce roślinnej.

A) Transportery zlokalizowane w tonoplazmie: przenoszące metale do wakuoli (HMA3 transportujący Zn^{2+} ; MTP1 i MTP3 transportujące Zn^{2+} ; MRP3 transportujący Cu^{2+} ; CAX1-4 transportujące Cd^{2+}) oraz wypompowujące metale z wakuoli (NRAMP3 i NRAMP4 transportujące Fe^{2+}). B) Transporter przenoszący metale do Aparatu Golgiego: HMA7 transportujący Cu^{2+} . C) Transportery wprowadzające metale do chloroplastu: białka zlokalizowane w błonie otaczającej chloroplast (HMA1 transportujący Zn^{2+} ; HMA6 transportujący Cu^{2+}) i umiejscowione w błonie tylakoidalnej (HMA8 transportujący Cu^{2+}). Więcej informacji o specyficzności jonowej powyższych transporterów znajduje się w tekście oraz w tabeli Tabeli 1.

rację skompleksowane metale trafiają następnie do części nadziemnej, gdzie są aktywnie pobierane z ksylemu i transportowane dalej drogą symplastyczną. Część metali jest aktywnie transportowana w korzeniu do floemu i tą drogą trafia do pędu. Transport metali przez floem jest niezbędny dla tkanek nadziemnych, do których substancje odżywcze nie są doprowadzane przez ksylem. Nasiona są połączone z rośliną macierzystą tylko dzięki wiązkom floemu; z kolei w nowych liściach wiązki floemu szybciej się różnicują i pełnią swoją funkcję, zanim elementy trachealne w pełni się rozwiną (PALMER i GUERINOT 2009).

W pobieraniu oraz w transporcie metali przez błony uczestniczą transportery należące do kilku rodzin białek (Tabela 1):

- ZIP – transportery Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} ,
- YSL – transportery Fe^{2+} ,



Ryc. 2. Transport jonów metali od korzenia do pędu i nasion.

Białka uczestniczą w: transporcie jonów metali śladowych przez błonę komórkową w rejonie epidermy (A); ładowaniu metali do ksylemu i floemu (transport daleki) (B); wyładowywaniu metali z wiązek przewodzących do liści (C) i nasion (D). Po pobraniu jonu metalu przez roślinę (A) jest on następnie transportowany drogą symplastyczną do perycyklu (B), omijając w ten sposób pasemka Caspary'ego w rejonie endodermy (zaznaczone na rycinie na czarno). Po załadunku do wiązek przewodzących jony są translokowane do liści (C) (za pośrednictwem ksylemu) lub transportowane do nasion (D) (przez floem).

- NRAMP – transportery: Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} ,
- ATP-azy typu CPx (P_{1B}) – transportery pompujące Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mo^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} ,
- transportery ABC – pompujące: Pb^{2+} , Cd^{2+} oraz ich kompleksy/koniugaty,
- COPT – transportery Cu^{2+} ,
- CDF – transportery: Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} ,
- CAX – transportery: Ca^{2+} , Cd^{2+} ,
- IREG – transportery: Ni^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} .

Energia niezbędna do transportu metali przez błony pochodzi z dwóch źródeł: z rozkładu ATP (transport pierwotny) lub z pierwotnej siły protonomotorycznej, wytwarza-

Tabela 1. Znane białka biorące udział w transporcie metali śladowych w roślinach.

Białko transportujące	Ligand	Lokalizacja subkomórkowa transportera	Funkcja
ZIP:			
AtZIP4,9,10, IRT3	Zn ²⁺	błona komórkowa	pobieranie do korzenia
AtZIP1,3,12	Zn ²⁺	błony endoplazmatyczne	
TcZNT1 (~ AtZIP4)	Zn ²⁺ , Cd ²⁺	błona komórkowa	pobieranie do korzenia
AtIRT1	Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	błona komórkowa	pobieranie do korzenia
AtIRT2	Fe ²⁺	błona komórkowa	pobieranie do korzenia
AtYSL1, AtYSL3	Fe ²⁺ +kompleksy	błona komórkowa	transport do nasion
AtYSL2	Fe ²⁺ +kompleksy	błona komórkowa	transport daleki
OsYSL15 (≈YSL)	Fe ²⁺ +kompleksy	błona komórkowa	pobieranie do korzenia
AtNRAMP1	Fe ²⁺	błona komórkowa	pobieranie do korzenia
AtNRAMP3, AtNRAMP4	Fe ²⁺	tonoplast	remobilizacja z wakuoli
OsNRAMP2			
HMA1-4:	Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺		
AtHMA1		błona otaczająca chloroplast	pobieranie do chloroplastu
AtHMA2,4, AhHMA4		błona komórkowa	transport daleki
AtHMA3		tonoplast	transport do wakuoli
HMA5-8:	Cu ²⁺ , Ag ²⁺		
AtHMA5			
AtHMA6 (PAA1)		błona otaczająca chloroplast	pobieranie do chloroplastu
AtHMA7			transport do aparatu Golgiego
AtHMA8 (PAA2)		błona tylakoidalna	transport do przestrzeni tylakoidalnej
AtMRP3	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺ +kompleksy,	tonoplast	transport do wakuoli
AtATM3	Pb ²⁺ +kompleksy,		
AtPDR8, AtPDR12	Cd ²⁺ +kompleksy, Pb ²⁺ +kompleksy,	błona komórkowa	usuwanie na zewnątrz komórki
COPT1-5	Cu ²⁺		pobieranie do korzenia
AtMTP1 (ZAT1), AtMTP3, AhMTP1-3	Zn ²⁺	tonoplast	transport do wakuoli
TgMTP1t1	Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺	błona komórkowa	usuwanie na zewnątrz komórki
TgMTP1t2	Ni ²⁺	błona komórkowa	usuwanie na zewnątrz komórki
CAX1-4	Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺	tonoplast	transport do wakuoli
LCT1	Pb ²⁺ , Cd ²⁺	błona komórkowa	pobieranie do korzenia

At – *Arabidopsis thaliana*; Ah – *A. halleri*; Os – *Oryza sativa*; Tg – *Thlaspi goesingense*; Tc – *T. caerulescens*

nej przez pompy protonowe (transport wtórny). Energię z rozkładu ATP wykorzystują transportery z rodziny ABC oraz P_{1B} -ATP-azy, podczas gdy pozostałe białka transportujące

wykorzystują prawdopodobnie utrzymywany przez pierwotne pompy protonowe elektrochemiczny gradient protonów (MIGOŁKA i współaut. 2007).

BIAŁKA ZIP

Białka ZIP (ang. zinc-iron permease) to białka błonowe, odpowiedzialne za pobieranie kationów dwuwartościowych. Do tej rodziny należą transportery odpowiedzialne za transport jonów Zn^{2+} (ang. zinc regulated transporters, ZRT) i Fe^{2+} (ang. iron regulated transporters, IRT). Białka ZIP posiadają osiem międzybłonowych domen i są obecne zarówno w komórkach grzybów, bakterii, zwierząt, jak i roślin. Najwyższą ekspresję tych transporterów obserwuje się w komórkach korzeni, w warstwie epidermy (ROOSENS i współaut. 2008, PALMER i GUERINOT 2009).

Spośród transporterów pobierających jony Zn^{2+} warto wyróżnić białka kodowane przez geny *AtZIP1-5*, *AtZIP9-12* oraz *AtIRT3* (MAESTRI i współaut. 2010). Przy czym wiadomo, że ZIP4, ZIP9, ZIP10 oraz IRT3 mediuje pobieranie jonów cynku do cytoplazmy (transport przez błonę komórkową) (Ryc. 2A), a ZIP1, ZIP3 i ZIP12 uczestniczą w wewnątrzkomórkowym transporcie przez błony (ROOSENS i współaut. 2008, MAESTRI i współaut. 2010).

Badania ROOSENS i współaut. (2008) oraz MAESTRI i współaut. (2010) wskazują na ważną rolę białek ZIP w akumulacji metali u dwóch znanych hiperakumulatorów. W korzeniach *Arabidopsis halleri* i *Thlaspi caerulescens* (gromadzących cynk) w warunkach deficytu cynku wykryto podwyższenie poziomu ekspresji genów *ZIP4*, *ZIP10* i *IRT3*. W tych warunkach podwyższenie ekspresji genu kodującego ZIP4 u *T. caerulescens* (homolog ZIP4 z tej rośliny nazywany jest także *TcZNT1*) zaobserwowano także w pędzie. Poza pobieraniem jonów Zn^{2+} ZNT1 może transportować także jony Cd^{2+} (MAESTRI i współaut. 2010).

Do rodziny ZIP, jak już wcześniej wspomniano, należą także transportery żelaza. Zidentyfikowany u *A. thaliana* gen *AtIRT1* koduje przenośnik będący najważniejszym transporterem jonów Fe^{2+} przez błonę komórkową korzeni (Ryc. 2A) (PALMER i GUERINOT 2009). Transporter ten może pobierać także inne jony metali, m.in.: Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} . Inny ważny transporter jonów żelaza to *AtIRT2* (Ryc. 2A) (VERT i współaut. 2009).

BIAŁKA YSL

Białka YSL (ang. yellow stripe-like) modulują pobieranie (u jednoliściennych roślin) i transport skompleksowanych metali (u roślin jedno- i dwuliściennych). Badania wskazują, że białka te transportują głównie chelaty Fe^{2+} , a w dalszej kolejności Zn^{2+} , Ni^{2+} i Cu^{2+} . U roślin jednoliściennych białka YSL zlokalizowane w plazmalemmie korzeni (Ryc. 2A) uczestniczą w pobieraniu z gleby metalu skompleksowanego z kwasem mugoinowym (MA). Pierwszy transporter z tej rodziny, YS1, pobierający kompleksy Fe-MA został zidentyfikowany u kukurydzy. W komórkach ryżu (*Oryza sativa*) obecne jest białko OsYSL15, homologiczne do YS1 i pełniące tą

samą funkcję (HAYDON i COBBETT 2007, PALMER i GUERINOT 2009).

Jony cynku i żelaza są transportowane w wiążkach przewodzących w postaci chelatów, głównie z nikotynoaminą (NA). Transportery, które uczestniczą w ładowaniu w korzeniu i w wyładowaniu tych kompleksów w pędzie, należą najprawdopodobniej do rodziny YSL. Uważa się, że białko *AtYSL2* bierze udział w transporcie kompleksów żelaza w korzeniu do wiązek przewodzących (Ryc. 2B), a białka *AtYSL1* i *AtYSL3* są niezbędne przy ładowaniu Fe^{2+} do nasion (Ryc. 2D) (PALMER i GUERINOT 2009, PUIG i PE ARRUBIA 2009, VERBRUGGEN i współaut. 2009).

BIAŁKA NRAMP

Białka z rodziny NRAMP (ang. natural resistance associated macrophage protein) są odpowiedzialne za transport dwuwartościowych kationów, głównie jonów Fe^{2+} u bakterii, grzybów, roślin i zwierząt. Transportery z tej rodziny uczestniczą w transporcie kationów metali do cytozolu z wakuoli. Białka *AtNRAMP3* i *AtNRAMP4* (Ryc. 1A) biorą udział w przenoszeniu Fe^{2+} przez tonoplast, np. w trakcie kiełkowania uczestniczą w odzyskiwaniu żelaza zdeponowanego w wakuoli (PALMER i GUERINOT 2009, OOMEN i współaut. 2009). Podobną rolę najprawdopodobniej pełni także transporter *OsNRAMP2* zidentyfikowany w komórkach korzeni ryżu

(TAKAHASHI i współaut. 2009). *AtNRAMP3/4* mogą też brać udział w komórkach roślinnych w remobilizacji z wakuoli jonów kadmu (LUX i współaut. 2011). Białka z rodziny NRAMP mają szeroką specyficzność i transportują także inne jony metali, np. Zn^{2+} , Mn^{2+} oraz Cd^{2+} (KRZESŁOWSKA i współaut. 2010). Białka NRAMP mogą także pobierać metale ze środowiska zewnętrznego (w tym ze ściany komórkowej); białko *AtNRAMP1* zidentyfikowane u *A. thaliana* jest integralnym białkiem błony komórkowej i transportuje jony Fe^{2+} z gleby (Ryc. 2A) (PUIG i PE ARRUBIA 2009).

ATP-AZY METALI CIĘŻKICH

ATP-azy metali ciężkich (zwane także ATP-azami typu CPx, $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATP-azami lub HMA; ang. heavy metal transporting ATP-ase) wykorzystują energię pochodzącą z hydrolizy ATP do translokacji substancji w poprzek błon biologicznych. ATP-azy są uważane za potencjalne transportery metali, takich jak kadm, miedź, cynk i ołów (COLANGELO i GUERINOT 2006). ATP-azy typu CPx ($\text{P}_{1\text{B}}$) mają 8 domen transbłonowych oraz posiadają wspólny, konserwowany, wewnątrzmembranowy motyw cysteiny-proliny-cysteiny, cysteiny-proliny-histydyny lub cysteiny-proliny-seryny, niezbędny do chelatowania, a co za tym idzie do translokacji metali przez błony. Białka HMA usuwają metale z cytoplazmy lub są odpowiedzialne za ich sekwestrację poprzez np. zatrzymywanie metali w wakuolach, w aparacie Golgiego czy w siateczce śródplazmatycznej (COLANGELO i GUERINOT 2006, KRZESŁOWSKA i współaut. 2010).

Osiem ATP-az zidentyfikowanych u *A. thaliana* charakteryzuje się stosunkowo małym podobieństwem między sobą i transportuje odmienne metale. Białka z grupy HMA1-HMA4 transportują Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , a białka HMA5-HMA8 – Cu^{2+} i Ag^{2+} (KRZESŁOW-

SKA i współaut. 2010). U *A. thaliana* *AtHMA2* i *AtHMA4* biorą udział w translokacji cynku z korzeni do pędów (Ryc. 2B), uczestnicząc w załadowywaniu i rozładowywaniu cynku do/z floemu i transporcie do/z ksylemu. W wiązkach przewodzących metale są transportowane do pędu najprawdopodobniej w formie kompleksów z nikotynoaminą lub z kwasami organicznymi (PALMER i GUERINOT 2009, MAESTRI i współaut. 2010). *AtHMA4*, poza jonami cynku, transportuje także Cd^{2+} , w przypadku podwyższonego stężenia obu tych metali. Homolog białka *AtHMA4* u hiperakumulatora *Arabidopsis halleri* pełni podobną rolę, translokując jony Zn^{2+} i Cd^{2+} do ksylemu. Najprawdopodobniej *AtHMA3* uczestniczy także w transporcie jonów Cd^{2+} do wakuoli (LUX i współaut. 2011). Wiadomo także, że transporter *AtHMA7* jest odpowiedzialny za dostarczanie jonów Cu^{2+} do aparatu Golgiego (Ryc. 1B), a *AtHMA6* (zlokalizowany w błonie otaczającej chloroplast) i *AtHMA8* (znajdujący się w tonoplaście) transportują ten pierwiastek odpowiednio do chloroplastu i wakuoli (Ryc. 1C) (PUIG i PE ARRUBIA 2009, CATTY i współaut. 2011).

BIAŁKA ABC

Kolejną rodziną białek transportujących metale jest grupa transporterów ABC (ang. ATP-binding cassette), wykorzystujących energię uwalnianą podczas hydrolizy wiązanych cząsteczek ATP. Białka z tej rodziny

transportują różne substraty, m.in.: jony, peptydy, cukrowce, lipidy, barwniki, ksenobiotyki i antybiotyki. Dwie podrodziny transporterów ABC: MRP i PDR, uczestniczą w transporcie chelatów metali. Uważa się, że rodzi-

na ta odgrywa dużą rolę w utrzymywaniu homeostazy metali śladowych i jest ważna dla hiperakumulacji, szczególnie dla sekwestracji metali w wakuolach (JASIŃSKI i FIGLE-ROWICZ 2006, VERBRUGGEN i współaut. 2009).

U roślin *A. thaliana* zidentyfikowano szereg roślinnych transporterów ABC. Są to białka: *AtMRP3*, *AtATM3*, *AtPDR8*, *AtPDR12*. *AtMRP3* transportują najprawdopodobniej jony Cd^{2+} i/lub kompleksy tego metalu przez tonoplast do wakuoli. Aktywacja transportera następuje także pod wpływem jonów miedzi (Ryc. 1A) i w niewielkim stopniu cynku (LUX

i współaut. 2011). *AtATM3* najprawdopodobniej transportuje kompleksy Pb^{2+} , a *AtPDR8* – jony Cd^{2+} i Pb^{2+} i/lub kompleksy tych metali (PILON i współaut. 2009, KRZESŁOWSKA i współaut. 2010). *AtPDR8* i *AtPDR12* są zlokalizowane w błonie komórkowej i uważa się, że ich rola polega na usuwaniu metali i ich koniugatów z protoplastu (Ryc. 2A) (LUX i współaut. 2011). Rośliny wykazujące zwiększoną aktywność *AtPDR8* i *AtPDR12* charakteryzowały się większą odpornością na Cd^{2+} i Pb^{2+} (KIM i współaut. 2007, WANG i współaut. 2011).

BIAŁKA COPT

Białka z rodziny COPT (ang. copper transporter) uczestniczą w pobieraniu metali ciężkich, szczególnie jonów miedzi. U *A. thaliana* zidentyfikowano pięć transporterów tego

typu: COPT1-COPT5. Najprawdopodobniej ich rola polega na pobieraniu jonów Cu^{2+} przez komórki roślin (Ryc. 2A) (PALMER i GUERINOT 2009, KRZESŁOWSKA i współaut. 2010).

BIAŁKA CAX

Metale śladowe mogą także przenikać do komórki pod wpływem działania pomp protonowych i antyporterów. Pompy protonowe (np. V-ATPaza, PPaza) wykorzystują energię z hydrolizy cząsteczek ATP do aktywnego przepompowywania jonów H^+ przez tonoplast do wakuoli. Powstający gradient stężenia protonów i różnica potencjałów umożliwia następnie antyporterom transport jonów metali z cytozolu do wakuoli, przy równocze-

snym przemieszczeniu jonów H^+ z wakuoli do cytozolu (MIGOCKA i współaut. 2007). W komórkach roślin *T. caerulescens*, *A. halleri*, *A. thaliana* zidentyfikowano w błonie tonoplastu cztery antyportery $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$: CAX1, CAX2, CAX3 i CAX4. Badania te wskazują, że białka CAX mogą transportować także jony kadmu, cynku i manganu (Ryc. 1A) (LUX i współaut. 2011, RASCIO i NAVARI-IZZO 2011, PUNSHON i współaut. 2012).

BIAŁKA CDF

CDF (ang. cation diffusion facilitators), inna nazwa MTP (ang. metal tolerance protein), to rodzina białek związanych z transportem Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} . Białka te są homodimerami i transportują jony przez błonę komórkową lub wakuolarną na drodze antyportu H^+/Me , usuwając metale z cytozolu do organelli lub na zewnątrz komórki. Pierwszym opisanym białkiem z rodziny CDF był zidentyfikowany u *A. thaliana* transporter cynku ZAT1, później nazwany *AtMTP1*, transportujący cynk do wakuoli (Ryc. 1A). Podobną rolę jak *AtMTP1* pełni także *AtMTP3*. Homologi *AtMTP1* wykryto także u hiperakumulatora *T. goesingense*.

W gatunku tym białko *TgMTP1t1* transportuje jony Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , natomiast białko *TgMTP1t2* – Ni^{2+} . Oba homologi zlokalizowane są w błonie komórkowej i usuwają jony z cytozolu poza komórkę. Z kolei u *Arabidopsis halleri*, innego hiperakumulatora, wykryto trzy transportery *AhMTP1-3* zlokalizowane w tonoplaście i transportujące jony Zn^{2+} z cytoplazmy do wakuoli. Badania wskazują, że przedstawiciele rodzaju *Arabidopsis* wykazujące cechę zwiększonej tolerancji na metale śladowe posiadają dwie lub więcej kopii transportera MTP1 (DRÄGER i współaut. 2004, MAESTRI i współaut. 2010).

BIAŁKA IREG

Rodzina roślinnych transporterów IREG należy do homologów zwierzęcych kanałów dla cyklicznych nukleotydów. Te nie-selektywne kanały są zlokalizowane w błonie komórkowej i przepuszczają zarówno jedno, jak i dwuwartościowe kationy metali. Najbardziej znanym białkiem należącym do tej rodziny jest LCT1 (Ryc. 2A), mogący przemieszczać Ca^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} . Uważa się, że LCT1 uczestniczy w detoksykacji kadmu i

ołowiu w komórkach roślin. LCT1 może także przyczyniać się do zwiększonej akumulacji ołowiu w korzeniach, w warunkach niskiego stężenia jonów Ca^{2+} . W przypadku tego kanału pomiędzy jonami miedzi i ołowiu występuje konkurencja o transporter, przy czym wapń ma większe powinowactwo do przenośnika (WOJAS i współaut. 2007, KRZESŁOWSKA i współaut. 2010).

PODSUMOWANIE

Badania ostatnich lat pozwalają na coraz lepsze zrozumienie transportu metali śladowych z gleby poprzez korzeń i do pędu (MAESTRI i współaut. 2010). Dzięki tej wiedzy powstało już wiele transgenicznych roślin wykazujących podwyższoną ekspresję genów przenośników błonowych i charakteryzujących się większą tolerancją na metale śladowe (KOTRBA i współaut. 2009). Wciąż jednak brakuje danych o specyficzności tkankowej i lokalizacji subkomórkowej wielu transporterów. Równie ważne, jeśli nie najważniejsze, będzie dokładne określenie w której fazie rozwoju każdy z tych przenośników pełni swoją funkcję (KÜPPER i KOCHIAN 2010). Dotychczasowe eksperymenty, badające zmiany ekspresji genów kodujących transportery

metali, miały na celu wyłonić pulę genów-kandydatów, zaangażowanych w odpowiedź rośliny na obecność metali śladowych (PALMER i GUERINOT 2009). Niestety, zwykle nie odpowiadały na pytania: Czy dane białko jest bezpośrednio związane z cechą tolerancji na metale, czy też podlega pośredniej regulacji (np. z powodu zaburzonej homeostazy w komórce)? Dopiero badania zmian ekspresji *in situ* pozwolą zbliżyć się do odpowiedzi na te pytania (KÜPPER i KOCHIAN 2010).

PODZIĘKOWANIA

Autorka dziękuje pani prof. dr hab. Barbarze Tomaszewskiej za wielką pomoc przy wyglądaniu artykułu.

ROŚLINNE TRANSPORTERY BŁONOWE METALI ŚLADOWYCH

Streszczenie

Metale śladowe obecne w roztworze glebowym można podzielić na dwie grupy: metale konieczne do prawidłowego funkcjonowania komórek roślinnych (m.in. Fe, Cu, Mn, Co, Zn, Ni) oraz metale niekonieczne (np. Cd, Hg, Pb, Cr). Obecne w roślinach białka transportujące niezbędne metale z gleby do korzenia i dalej do pędu charakteryzują się szeroką specyficznością, stanowiąc drogę wnikania także dla metali niekoniecznych. Utrzymywanie homeostazy

poprzez kontrolowanie pobierania, transportu, wypompowywania i sekwestracji tych pierwiastków jest kluczowe dla prawidłowego działania organizmów. Praca ta została poświęcona krótkiej charakterystyce zidentyfikowanych do tej pory roślinnych transporterów błonowych, należących do następujących rodzin białek: ZIP, YSL, NRAMP, $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATP-az, transporterów ABC, COPT, CAX, CDF i IREG.

TRACE METALS MEMBRANE TRANSPORTERS IN PLANTS

Summary

Trace metals present in soil can be divided into two groups: essential metals indispensable for proper functioning of plant cells (e.g. Fe, Cu, Mn, Co, Zn, Ni), and non-essential metals (e.g. Cd, Hg, Pb, Cr). Transporters for essential trace metals in plants usually have a wide specificity and can equally transport non-essential metals. Maintaining homeostasis

by controlling the uptake, transport, removal and sequestration of metals is crucial for organisms. This work is dedicated to a short characterization of identified plant membrane transporters, belonging to several protein families: ZIP, YSL, NRAMP, $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases, ABC transporters, COPT, CAX, CDF and IREG.

LITERATURA

- CATTY P., BOUTIGNY S., MIRAS R., JOYARD J., ROLLAND N., SEIGNEURIN-BERNY D., 2011. *Biochemical characterization of AtHMA6/PAA1, a chloroplast envelope Cu(I)-ATPase*. J. Biol. Chem. 286, 36188–36197.
- COLANGELO E. P., GUERINOT M. L., 2006. *Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants*. Cur. Opin. Plant Biol. 9, 322–330.
- DRÄGER D., DEBROSSES-FONROUGE A.-G., KRACH C., CHARDONNENS A., MEYER R., SAUMITOU-LAPRADE P., KRÄMER U., 2004. *Two genes encoding Arabidopsis halleri MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels*. Plant J. 39, 425–439.
- HAYDON M. J., COBBETT C. S., 2007. *Transporters of ligands for essential metal ions in plants*. New Phytol. 174, 499–506.
- JADIA C. D., FULEKAR M. H., 2009. *Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques*. Afr. J. Biotechnol. 8, 921–928.
- JASIŃSKI M., FIGLEROWICZ M., 2006. *Roślinne transportery ABC – rodzina z tradycjami*. Postępy Biochemii 52, 296–302.
- KIM D.-Y., BOVET L., MAESHIMA M., MARTINOIA E., LEE Y., 2007. *The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance*. Plant J. 50, 207–218.
- KOTRBA P., NAJMANOVA J., MACEK T., RUMIL T., MACKOVA M., 2009. *Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloids soil and sediment pollution*. Biotechnol. Adv. 27, 799–810.
- KRÄMER U., TALKE I. N., HANIKENNE M., 2007. *Transition metal transport*. Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 581, 2263–2272.
- KRZESŁOWSKA M., 2011. *The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy*. Acta Physiol. Plant. 33, 35–51.
- KRZESŁOWSKA M., SAMARDAKIEWICZ S., WOŹNY A., 2010. *Metale śladowe. [W:] Reakcje komórek roślin na czynniki stresowe*. Tom 2. WOŹNY A., GOŹDZICKA-JÓZEFIK A. (red.). Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Poznań, 90–146.
- KÜPPER H., KOCHAN L. V., 2010. *Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, Thlaspi caerulescens (Ganges population)*. New Phytol. 185, 11–129.
- LUX A., MARTINKA M., VACULIK M., WHITE P. J., 2011. *Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review*. J. Exp. Bot. 62, 21–37.
- MAESTRI E., MARMIROLI M., VISIOLI G., MARMIROLI N., 2010. *Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment*. Environ. Exp. Bot. 68, 1–12.
- MIGOCKA M., NOWOJSKA E., KŁOBUS G., 2007. *Wtórne transportery metali ciężkich u roślin*. Postępy Biochemii 53, 272–279.
- MIRANSARI M., 2011. *Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals*. Biotechnol. Adv. 29, 645–653.
- NAGAJYOTI P. C., LEE K. D., SREEKANTH T. V. M., 2010. *Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review*. Environ. Chem. Lett. 8, 199–216.
- OOMEN R., WU J., LELIVRE F., BLANCHET S., RICHAUD P., BARBIER-BRYGOO H., AARTS M., THOMINE S., 2009. *Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*. New Phytol. 181, 637–650.
- PALMER C. M., GUERINOT M. L., 2009. *Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants*. Nature Chem. Biol. 5, 333–340.
- PERALTA-VIDEA J. R., LOPEZ M. L., NARAYAN M., SAUPE G., GARDEA-TORRESDEY J., 2009. *The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 41, 1665–1677.
- PILON M., COHU C. M., RAVET K., ABDEL-GHANY S. E., GAYMARD F., 2009. *Essential transition metal homeostasis in plants*. Cur. Opin. Plant Biol. 12, 347–357.
- PUIG S., PE ARRUBIA L., 2009. *Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants*. Cur. Opin. Plant Biol. 12, 299–306.
- PUNSHON T., HIRSCHI K., YANG J., LANZIROTTI A., LAI B., GUERINOT M. L., 2012. *The role of CAX1 and CAX3 in elemental distribution and abundance in Arabidopsis seed*. Plant Physiol. 158, 352–362.
- RASCIO N., NAVARI-IZZO F., 2011. *Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?* Plant Sci. 180, 169–181.
- ROOSENS N., WILLEMS G., SAUMITOU-LAPRADE P., 2008. *Using Arabidopsis to explore zinc tolerance and hyperaccumulation*. Trends Plant Sci. 13, 208–215.
- SCHRÖDER P., 2009. *Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts*. Environ. Exp. Bot. 67, 10–22.
- SIWEK M., 2008. *Biologiczne sposoby oczyszczania środowiska – fitoremediacja*. Wiadomości Botaniczne 52, 23–28.
- TAKAHASHI M., NOZOYE T., KITAJIMA N., FUKUDA N., HOKURA A., TERADA Y., NAKAI I., ISHIMARU Y., KOBAYASHI T., NAKANISJI H., NISHIZAWA N. K., 2009. *In vivo analysis of metal distribution and expression of metal transporters in rice seedling germination process by microarray and X-ray Fluorescence Imaging of Fe, Zn, Mn, and Cu*. Plant Soil 325, 39–51.
- VERBRUGGEN N., HERMANS C., SCHAT H., 2009. *Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants*. New Phytol. 181, 759–776.
- VERKLEIJ J. A. C., GOLAN-GOLDHIRSH A., ANTOSIEWICZ D. M., SCHWITZGUÉBEL J. P., SCHRÖDER P., 2009. *Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts*. Environ. Exp. Bot. 67, 10–22.
- VERT G., BARBERON M., ZELAŹNY E., SÉGUÉLA M., BRIAT J.-F., CURIE C., 2008. *Arabidopsis IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells*. Planta 229, 1171–1179.
- WANG Y., ZONG K., JIANG L., SUN J., REN Y., ZEHUA S., WEN C., CHEN X., CAO S., 2011. *Characterization of an Arabidopsis cadmium-resistant mutant cdr3-1D reveals a link between heavy metal resistance as well as seed development and flowering*. Planta 233, 697–706.
- WOJAS S., RUSZCZYŃSKA A., BULSKA A., WOJCIECHOWSKI M., ANTOSIEWICZ D. M., 2007. *Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by ICT1*. Environ. Poll. 147, 584–592.