

KAROLINA MAŁAS, MAGDALENA MIGOCKA

*Zakład Fizjologii Molekularnej Roślin  
Instytut Biologii Eksperymentalnej  
Uniwersytet Wrocławski  
Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław  
E-mail: karolina.malas@uwr.edu.pl*

## FIZJOLOGICZNA FUNKCJA BIAŁEK CDF TRANSPORTUJĄCYCH KATIONY METALI U ORGANIZMÓW EUKARIOTYCZNYCH

### WSTĘP

Metale ciężkie stanowią bardzo różnorodną grupę pierwiastków, charakteryzujących się specyficznymi właściwościami fizykochemicznymi i biologicznymi. Kryteria wyodrębnienia tej grupy nie są jednoznaczne i bazują głównie na gęstości, masie i liczbie atomowej oraz toksycznych właściwościach zaliczanych do niej pierwiastków (DUFFUS 2002). W biologii, termin ten jest najczęściej używany do określenia pierwiastków potencjalnie toksycznych dla środowiska i organizmów żywych (DUFFUS 2002). Obejmują one zarówno metale i metaloidy balastowe, niepełniące funkcji biologicznych, takie jak Cd, Pb, As i Sb, jak i mikroelementy, które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórek organizmów żywych, takie jak Zn, Mn, Cu, Co, Fe, Mo i Ni (APPENROTH 2010). Znaczenie biologiczne poszczególnych mikroelementów jest bardzo różnorodne i wynika przede wszystkim z ich właściwości fizykochemicznych, warunkujących zdolność do tworzenia wiązań jonowych i koordynacyjnych z grupami aminokwasowymi białek, oraz zdolności do oddawania i przyjmowania elektronów. W związku z tym, funkcjonują one jako kofaktory wielu enzymów komórkowych, jako elementy strukturalne białek oddziałujących z DNA, czy elementy przenośników elektronów w procesach fotosyntezy i oddychania, warunkując prawidłowy przebieg podstawowych i bardziej złożonych procesów metabolicznych komórki.

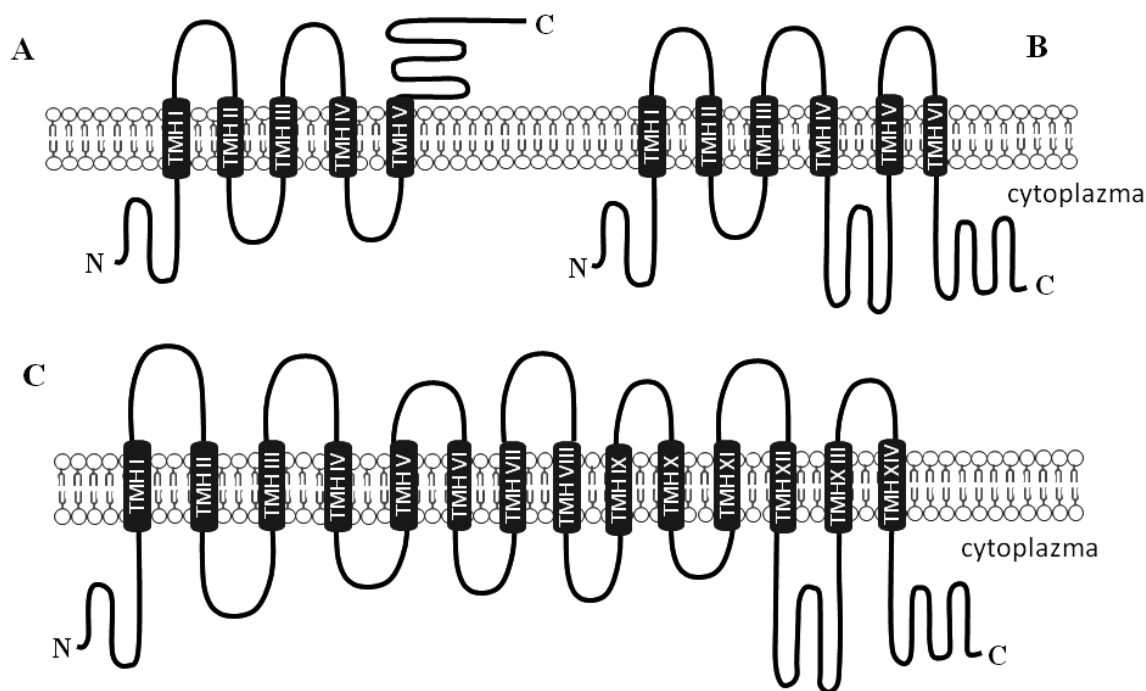
Chociaż wszystkie mikroelementy są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania

komórek, nadmiar jonów każdego metalu ciężkiego w komórkach powoduje efekty toksyczne. Poprzez łatwe wiązanie się do grup hydroksylowych, karboksylowych, oksymowych, iminowych i tiolowych białek, metale zaburzają aktywność wielu enzymów i białek strukturalnych (NIEBOER i RICHARDSON 1980). Konkuruje z innymi jonami metali o miejsce wiązania w transporterach lub metaloproteinach, metale w nadmiarze powodują niedobory innych metali korzystnych (ASSCHE i CLIJSTERS 1990). Dodatkowo, wtórnym efektem nadmiaru jonów metali aktywnych w reakcjach oksydoredukcyjnych jest często zaburzenie równowagi reaktywnych form tlenu w komórkach, powodujące stres oksydacyjny (SCHÜTZENDÜBEL i POLLE 2002).

Zatem zarówno nadmiar, jak i niedobór mikroelementów może prowadzić do poważnych zaburzeń fizjologicznych w komórkach, skutkujących zmianami chorobowymi, a nawet śmiercią, w związku z czym organizmy żywe muszą precyzyjnie regulować poziom tych pierwiastków w komórkach. Wszystkie organizmy wykształciły w trakcie ewolucji szereg bardzo różnorodnych mechanizmów, zapewniających im z jednej strony ciągłe pobieranie jonów niezbędnych metali do komórek, a z drugiej strony, ochronę przed nadmierną akumulacją tych jonów w cytoplazmie. Obejmują one transport jonów metali przez błony komórkowe, chelatację (kompleksowanie) tych jonów na obszarze cytoplazmy oraz ich sekwestrację w kompartmentach komórkowych lub eksport poza komórkę (CLEMENS 2001). Transport jonów metali przez błony komórkowe wspomaga-

ny jest przez białka błonowe, których aktywność decyduje o tolerancji organizmów zarówno na nadmiar, jak i na niedobór mikroelementów. Wśród nich szczególną rolę przypisuje się białkom z rodziny CDF (ang. cation diffusion facilitator), które uczestniczą nie tylko w detoksykacji komórek z nadmiaru metali, ale także w dostarczaniu mikroelementów do tych komórek i tkanek, gdzie są one niezbędne (MONTANINI i współaut. 2007). Białka CDF zostały po raz pierwszy opisane w 1995 r. u bakterii (NIES i SILVER 1995) i od tego czasu geny kodujące homologi tych białek są stale identyfikowane w genomach organizmów należących do wszystkich trzech domen filogenetycznych: archebakterii, eubakterii i eukariotów (HANEY i współaut. 2005, MONTANINI i współaut. 2007). Liczba tych białek u organizmów modelowych jest bardzo zróżnicowana: jak dotąd zidentyfikowano 4 transportery CDF u bakterii *Bacillus subtilis*, 5 u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), 6 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, 10 u człowieka i ryżu (*Oryza sativa*), modelowej rośliny jednoliściennej, 12 u modelowej rośliny dwuliściennej *Arabidopsis thaliana*, a 21 u modelowego drzewa, topoli (*Populus trichocarpa*) (GUSTIN i współaut. 2011). Dotychczasowe badania nad tymi białkami jednoznacznie wskazują, że są to transportery dwuwartościowych kationów metali ciężkich, o pro-

mieniu jonowym o długości od 72 do 97 pm (NIES 2003, MONTANINI i współaut. 2007). Dokładne poznanie funkcji tych białek oraz mechanizmów regulujących ich aktywność, to aktualny cel badań naukowych prowadzonych zarówno na organizmach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Ich wyniki pomogą w badaniu molekularnych podstaw ludzkich chorób wynikających z zaburzonej homeostazy cynku (choroby neurodegeneracyjne, niedobór cynku u noworodków) oraz naturalnej tolerancji lub wrażliwości bakterii, drożdży i roślin na stres wywołany metalami ciężkimi. Stosunkowo duża liczba i różnorodność białek CDF u roślin wyższych może wynikać ze specyficznego trybu życia tych organizmów. Rośliny nie mają zdolności przemieszczania się i unikania stresu związanego z nadmiarem lub deficytem metali ciężkich, w związku z czym wykształcenie różnorodnych funkcjonalnie białek może stanowić istotny mechanizm adaptacyjny roślin do zmiennej dostępności tych pierwiastków. Badania prowadzone na roślinnych białkach CDF mają nierzadko charakter aplikacyjny: przypuszcza się, iż pełna charakterystyka molekularna i funkcjonalna tych białek będzie w niedalekiej przyszłości służyć biotechnologii roślin dla celów fitoremediacji (oczyszczania gleb zanieczyszczonych metalami) i biofortyfikacji (wzbogacaniu roślin w mikroelementy, takie jak Fe i Zn, których



Ryc. 1. Topologia błonowa białek z rodziny CDF; (A) białko z 5 transbłonowymi helisami na przykładzie CsMTP8; (B) białko z 6 transbłonowymi helisami na przykładzie AtMTP1; (C) białko z 14 transbłonowymi helisami na przykładzie AtMTP12. Rycinę wykonano używając bazy Servier Medical Art (<http://www.servier.com>).

niedobory w diecie ludzi i zwierząt prowadzą do poważnych zaburzeń chorobowych) (ETIM 2012, BASHIR i współaut. 2013).

Niniejsza praca przeglądowa stanowi podsumowanie najnowszych wyników badań wyjaśniających strukturę, filogenezę i biologiczną rolę białek CDF u organizmów eukariotycznych oraz szczegółowo omawia funkcje tych białek u roślin.

## STRUKTURA I FILOGENEZA BIAŁEK CDF

Analizy sekwencji aminokwasowych i badania krystalograficzne sugerują, że zdecydowana większość transporterów CDF to białka posiadające cztery do sześciu transbłonowych helis TMH (ang. transmembrane helix), z końcami aminowym (N) i karboksylowym (C) skierowanymi do cytoplazmy (WEI i FU 2006, MONTANINI i współaut. 2007) (Ryc. 1). Wyjątek stanowią pojedyncze białka tej rodziny zawierające w swojej strukturze 12 (drożdżowe Msc2), 14 (roślinne MTP12), a nawet 15 (ludzkie ZnT5) helis transbłonowych (LI I KAPLAN 2001, KAMBE i współaut. 2002). Większość białek CDF posiada region bogaty w histydyny i/lub seryny, znajdujący się pomiędzy TMH IV i TMH V na końcach C lub N, który prawdopodobnie działa jako domena wiążąca metal od strony cytoplazmy (MONTANINI i współaut. 2007) (Ryc. 1). Najbardziej konserwatywnymi regionami białek CDF są transbłonowe helisy I, II, V i VI (HANEY i współaut. 2005). Wśród nich, helisy II, V i VI zawierają reszty aminokwasowe, kluczowe dla funkcji transporterów CDF, w związku z czym przypisuje się im rolę w formowaniu kanału transportującego kationy metali (MONTANINI i współaut. 2007). W 1997 r. w obrębie jednej z tych konserwatywnych helis, TMH II, wyróżniono domenę sygnaturową, która miała być charakterystyczna dla całej rodziny białek CDF (PAULSEN I SAIER 1997). Późniejsze analizy większej liczby tych białek z różnych organizmów wykazały, że domena sygnaturowa obejmuje nie tylko transbłonową helisę II, ale również początek transbłonowej helisy III oraz pętlę cytoplazmatyczną łączącą obydwie helisy (MONTANINI i współaut. 2007) (Ryc. 1). Taka modyfikacja domeny sygnaturowej umożliwiła łatwiejszą identyfikację wielu nowych białek rodziny CDF u różnych organizmów (MONTANINI i współaut. 2007). Eksperymentalne badania bakteryjnych, roślinnych i zwierzęcych białek CDF wyraźnie wskazują, że transportery tej rodziny tworzą w błonach homo-oligomeryczne lub hetero-oligomeryczne kompleksy, które transportują jony metali na drodze antyportu  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+(\text{K}^+)$  z cytoplazmy poza komórkę lub do kompartmentów

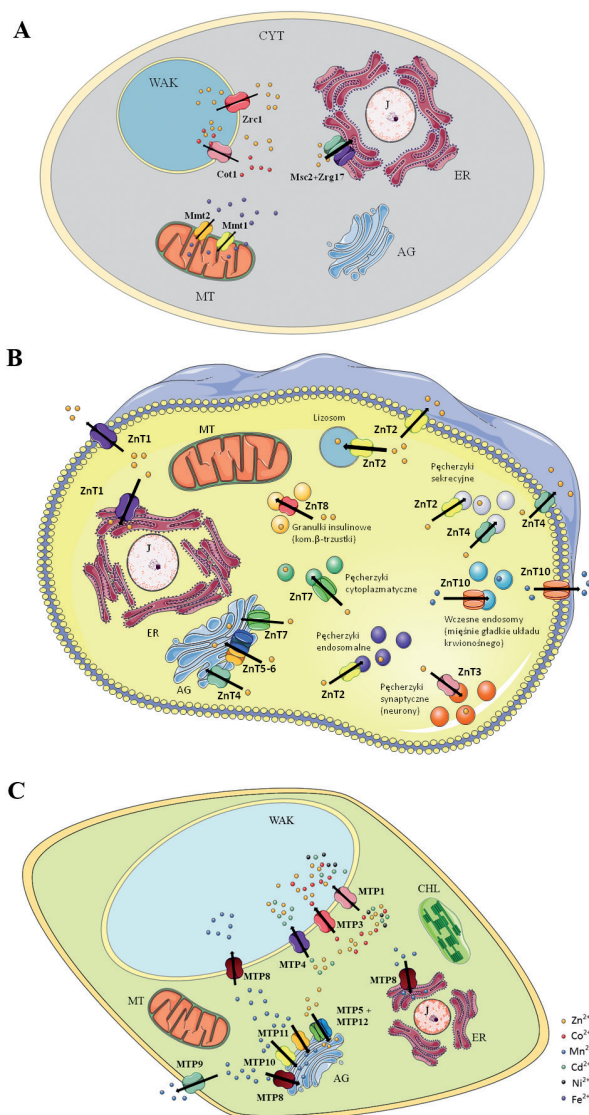
wewnątrzkomórkowych, takich jak wakuola, aparat Golgiego i siateczka śródplazmatyczna (BLOSS i współaut. 2002, GUFFANTI i współaut. 2002, MACDIARMID i współaut. 2002, BLAUDEZ i współaut. 2003, WEI i współaut. 2004, HANEY i współaut. 2005, MONTANINI i współaut. 2007, RICACHENEVSKY i współaut. 2013, FUJIWARA i współaut. 2015).

Kompleksowe analizy filogenetyczne białek CDF zidentyfikowanych u różnych, czasem bardzo odległych filogenetycznie organizmów wykazały, że wśród białek tej rodziny można wyróżnić trzy główne grupy, które różnią się powinowactwem do transportowanych jonów metali: grupę Zn-CDF, zawierającą białka transportujące głównie cynk, grupę Zn/Fe-CDF, zawierającą białka transportujące głównie cynk i żelazo oraz grupę Mn-CDF, zawierającą białka transportujące głównie mangan (MONTANINI i współaut. 2007). Co ciekawe, dotychczas scharakteryzowane białka CDF ssaków transportują tylko cynk i mangan, natomiast homologiczne białka u bakterii, drożdży i roślin są bardziej zróżnicowane strukturalnie i funkcjonalnie, gdyż wykazują zdolność do transportu metali ciężkich takich jak cynk, kobalt, żelazo, kadm, nikiel i mangan (NIES 2003, MONTANINI i współaut. 2007).

## BIAŁKA CDF U DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* to modelowe organizmy eukariotyczne o najprostszej budowie, tanie w hodowli i łatwe do manipulacji genetycznych, stąd badania nad funkcją ich genów i białek, w tym transporterów z rodziny CDF, są bardzo zaawansowane. Do tej pory u drożdży zidentyfikowano i scharakteryzowano funkcjonalnie sześć białek CDF. Według klasyfikacji filogenetycznej MONTANINI i współaut. (2007), cztery z tych białek: Zrc1, Cot1, Zrg17 i Msc2, należą do grupy Zn-CDF, natomiast pozostałe dwa białka: Mmt1 i Mmt2, klasyfikują się do grupy Zn/Fe-CDF. Lokalizację i specyficzność substratową scharakteryzowanych białek przedstawiono na Ryc. 2A. Białko Zrc1 (ang. zinc resistance conferring) jest wakuolarnym transporterem cynku, który funkcjonuje na zasadzie antyportu  $\text{Zn}^{2+}/\text{H}^+$  (KAMIZONO i współaut. 1989, MIYABE i współaut. 2001, MACDIARMID i współaut. 2002). W warunkach fizjologicznych Zrc1 odpowiada za akumulację cynku w wakuoli, tworząc wewnątrzkomórkowy rezerwuuar tego metalu, z którego komórka może korzystać w warunkach niedoboru cynku w środowisku. W warunkach jego podwyższonego stężenia w środowisku, katalizowana przez Zrc1 akumulacja cynku w wakuoli stanowi główny





Ryc. 2. Lokalizacja i specyficzność substratowa białek CDF w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (A), ssaków (B) i roślin (C); J – jądro komórkowe, CYT – cytoplazma, WAK – wakuola, AG – aparat Golgiego, ER – siateczka śródplazmatyczna, MT – mitochondrium, CHL – chloroplast. Rycinę wykonano używając bazy Servier Medical Art (<http://www.servier.com>).

mechanizm obronny drożdży przed toksycznym oddziaływaniem tego metalu na ich komórki (MIYABE i współaut. 2001, MACDIARMID i współaut. 2003). Homologiczne białko Cot1 (ang. Cobalt Toxicity), którego sekwencja jest w 60% identyczna z sekwencją białka Zrc1, również lokalizuje się w błonie wakuolarniej komórek drożdży (Ryc. 2A). W porównaniu z Zrc1, Cot1 wykazuje szerszą specyficzność substratową, transportując do wakuoli nie tylko jony  $Zn^{2+}$ , ale także jony  $Co^{2+}$  (CONKLIN i współaut. 1992, LI I KAPLAN 1998), jednak fizjologiczna funkcja tego białka wiąże się

przede wszystkim z odpornością drożdży na toksyczne stężenia kobaltu w środowisku. Białko Msc2 (ang. meiotic sister-chromatid recombination), należące do tej samej grupy transporterów CDF (Zn-CDF), lokalizuje się głównie w błonach siateczki śródplazmatycznej (ER) (Ryc. 2A), choć niewielkie ilości tego białka wykryto również w błonach aparatu Golgiego (LI I KAPLAN 2001, ELLIS i współaut. 2004). W przeciwieństwie do białek Zrc1 i Cot1, zawierających w swojej strukturze 6 helis transbłonowych, białko Msc2 tworzy 12 helis transbłonowych i aby pełnić swoją funkcję, a więc transportować cynk z cytoplazmy do siateczki śródplazmatycznej, musi utworzyć kompleks z innym białkiem CDF, Zrg17 (ang. zinc regulated gene) (LI I KAPLAN 2001). Białko Zrg17 także lokalizuje się w błonach siateczki śródplazmatycznej (Ryc. 2A), ale tworzy tylko 6 transbłonowych helis (LI I KAPLAN 2001). Aktywność tego białka podlega regulacji na poziomie transkrypcji w zależności od stężenia cynku w komórce: rośnie w wypadku niedoboru cynku, a maleje w wypadku jego nadmiaru, dlatego poziom Zrg17 w siateczce determinuje aktywność całego hetero-oligomeru Msc2-Zrg17 (ELLIS i współaut. 2005, WU i współaut. 2011). Dwa ostatnie białka CDF drożdży, Mmt1 i Mmt2 (ang. Mitochondrial Metal Transporter), cechują się bardzo wysokim podobieństwem sekwencji aminokwasowych. Obydwa lokalizują się w błonie mitochondrialnej drożdży i odpowiadają za eksport żelaza z mitochondriów do cytoplazmy komórek drożdży, chroniąc mitochondria przed toksycznym oddziaływaniem żelaza (Ryc. 2A) (LI i współaut. 2014). Jak dotąd, są to pierwsze eukariotyczne białka CDF, dla których wykazano udział w transporcie jonów żelaza.

## BIAŁKA CDF U SSAKÓW

U ssaków zidentyfikowano 10 białek CDF, które nazwano ZnT/SLC30A (ang. zinc transporters/solute-linked carrier 30A). Pierwszy z tych transporterów, ZnT1, został opisany już w 1995 r i od tego momentu trwają intensywne prace nad określeniem funkcji poszczególnych przedstawicieli tej grupy białek (PALMITER I FINDLEY 1995). Do tej pory scharakteryzowano 9 białek ZnT (ZnT1-ZnT8 i ZnT10) (COUSINS i współaut. 2006). Większość z nich zaliczana jest do grupy transporterów cynkowych (Zn-CDF), odpowiadających za wypływ cynku z cytoplazmy lub sekwestrację tego metalu w organellach komórkowych oraz pęcherzykach (COUSINS i współaut. 2006). Zdecydowana większość tych transporterów posiada 6 transbłonowych helis z N- i C-końcem białka po stronie cytoplazmatycznej, charakte-

rystyczną pętlę histydynową (PALMITER I HUANG 2004) oraz tworzy homo-oligomery lub hetero-oligomery (ISHIHARA i współaut. 2006; KAMBE 2012) transportujące metal na zasadzie antyportu  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$  (COUSINS i współaut. 2006). Geny *ZnT1*, *ZnT4*, *ZnT5*, *ZnT6* i *ZnT7* ulegają ekspresji w całym organizmie natomiast produkty genów *ZnT2*, *ZnT3*, *ZnT8* i *ZnT10* są tkankowo- i rozwojowo-specyficzne (KAMBE 2012). Ich ekspresja jest dodatkowo regulowana na poziomie transkrypcji i potranskrypcyjnie przez cynk a także stany zapalne, liposacharydy, glukozę, hormony, cytokiny (KAMBE 2012). Gen *ZnT2* ulega ekspresji w tkankach wydzielniczych takich jak np. gruczoły sutkowe, nerki czy trzustka (HUANG i współaut. 2013). Do ekspresji genu *ZnT8* dochodzi w komórkach  $\alpha$ ,  $\beta$  i PP trzustki oraz w pęcherzykach tarczycy i pancerzy nadnerczy (HUANG i współaut. 2013), natomiast ekspresja genu *ZnT10* zachodzi głównie w mózgu oraz wątrobie (QUADRI i współaut. 2012).

Lokalizacja komórkowa ssaczych białek ZnT jest bardzo zróżnicowana (Ryc. 2B). Białko *ZnT1* występuje głównie w błonie komórkowej, gdzie wydziela jony cynku z cytoplazmy poza komórkę (KAMBE 2012), jednak wykryto je również w retikulum endoplazmatycznym ludzkich keratynocytów (LAZARCZYK i współaut. 2008). Ze względu na zdolność do wydzielania cynku poza komórki, biologiczna rola *ZnT1* polega przede wszystkim na detoksykacji komórek z nadmiaru tego metalu. Funkcja tego białka jest szczególnie istotna w tkankach narażonych na nagłą podwyższoną akumulację cynku, takich jak mózg, gdzie stężenie tego metalu wzrasta stosunkowo szybko w stanach niedokrwienia lub zawału serca, czy nerki, zagęszczające cynk podczas filtracji moczu (COUSINS I MCMAHON 2000, NOLTE i współaut. 2004). Transporter *ZnT2* lokalizuje się w lizosomach, w pęcherzykach endosomalnych oraz w błonie komórkowej i transportuje cynk do pęcherzyków wydzielniczych komórek nabłonka (LEE i współaut. 2015). Białko to jest niezbędne w czasie laktacji, gdyż transportuje cynk do mleka produkowanego przez gruczoły mleczne, wpływa na prawidłowy skład mleka (zawartość laktozy, lipidów i białka) oraz warunkuje prawidłowy rozwój i strukturę gruczołów mlecznych (LEE i współaut. 2015). Białko *ZnT4* zlokalizowano w błonie komórkowej i w pęcherzykach aparatu trans-Golgiego (McCORMICK I KELLEHER 2012). Badania wykazały, że, podobnie jak *ZnT2*, *ZnT4* pełni kluczową rolę w funkcjonowaniu gruczołów mlecznych i produkcji wartościowego mleka u ssaków. Mutacja genu kodującego to białko u myszy powoduje produkcję mleka „letalnego”, o obniżo-

nej wartości odżywczej, niewystarczającej do wyżywienia potomstwa. Wykazano, że cynk dostarczany przez *ZnT4* do pęcherzyków sekretorycznych gruczołów jest wykorzystywany do aktywacji dwóch enzymów: galaktozylo-transferazy, niezbędnej do produkcji laktozy, i anhidrazy węglanowej VI, wydzielanej bezpośrednio do mleka, zapewniającej utrzymanie odpowiedniego pH w przewodzie pokarmowym noworodków (McCORMICK I KELLEHER 2012). Gen kodujący białko *ZnT3* ulega ekspresji głównie w hipokampie i korze mózgowej oraz w jądrach (SENSI i współaut. 2009). Przypuszcza się, że produkt białkowy tego genu odpowiada za akumulację cynku w pęcherzykach synaptycznych neuronów glutaminergicznych (SENSI i współaut. 2009). Wysoki poziom białka *ZnT5* wykryto w trzustce. Badania wykazały, że białko to uczestniczy w produkcji insuliny poprzez dostarczanie do pęcherzyków wydzielniczych komórek  $\beta$  trzustki cynku niezbędnego do formowania kryształów insulinowych. Co ciekawe, *ZnT5*, podobnie jak drożdżowe białko *Msc2*, różni się strukturalnie od pozostałych białek ZnT (posiada aż 15 transbłonowych helis) i tworzy hetero-oligomery z białkiem *ZnT6*, które również lokalizuje się w błonach aparatu Golgiego (FUKUNAKA i współaut. 2009). Kompleks *ZnT5-ZnT6* u ssaków jest prawdopodobnie funkcjonalnym odpowiednikiem kompleksu *Msc2-Zrg17* u drożdży; obydwa kompleksy zaopatrują pęcherzyki drogi wydzielniczej w cynk niezbędny do funkcjonowania obecnych w nich białek. Podobnie jak białka *ZnT5* i *ZnT6*, białko *ZnT7* także występuje w błonach aparatu Golgiego i odpowiada za transport cynku z cytoplazmy do wnętrza aparatu (KIRSCHKE I HUANG 2003). Poza tym, *ZnT7* wykryto także w pęcherzykach cytoplazmatycznych innych od tych, w których zlokalizowano *ZnT2*, *ZnT3*, *ZnT4*, *ZnT5* i *ZnT6*, co sugeruje udział białek tej rodziny w transporcie cynku do różnych kompartmentów pęcherzykowych (KIRSCHKE I HUANG 2003). Stosunkowo wysoki poziom tego białka w komórkach dwunastnicy wskazuje na jego istotny udział w absorpcji cynku z przewodu pokarmowego (KIRSCHKE I HUANG 2003). Podobnie jak *ZnT5*, *ZnT8* występuje przede wszystkim w granulach insulinowych komórek  $\beta$ -trzustki i warunkuje prawidłową produkcję insuliny, dostarczając cynk do wnętrza pęcherzyków drogi wydzielniczej (WIJESEKARA i współaut. 2010). Ostatnie scharakteryzowane białko tej rodziny u ssaków, *ZnT10*, lokalizuje się we wczesnych endosomach mięśni gładkich układu krwionośnego oraz w błonie komórkowej, ale różni się od pozostałych białek ZnT specyficznością substratową – uczestniczy w utrzymaniu wewnątrzkomórkowej ho-



meostazy manganu, a nie cynku (PATRUSHEV i współaut. 2012, QUADRI i współaut. 2012). Za odmienną selektywność tego białka odpowiada prawdopodobnie reszta asparaginianu w TMH II, w miejscu której w białkach ZnT1-ZnT8 występuje reszta histydynowa. Białko ZnT9 nie zostało dotychczas zlokalizowane i scharakteryzowane (KOLAJ-ROBIN i współaut. 2015).

### BIĄŁKA CDF U ROŚLIN

U roślin białka CDF określane są jako białka tolerancji na metale (ang. metal tolerance proteins, MTP). W genomie modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano geny kodujące 12 białek MTP (AtMTP1-AtMTP12), które zaklasyfikowano do wszystkich 3 głównych filogenetycznych grup transporterów CDF: grupy Zn-CDF zawierającej białka AtMTP1-5 i AtMTP12, grupy Zn/Fe-CDF zawierającej białka AtMTP6 i AtMTP7, i grupy Mn-CDF zawierającej białka AtMTP8-AtMTP11 (MONTANINI i współaut. 2007, GUSTIN i współaut. 2011). Szczegółowa analiza filogenetyczna, obejmująca tylko białka CDF zidentyfikowane u roślin wyższych, paproci, mchów widlaków i glonów wykazała, że w obrębie trzech grup głównych można wydzielić mniejsze grupy filogenetyczne: G1, G5 i G12 (w grupie Zn-CDF), G6 i G7 (w grupie Zn/Fe-CDF) oraz G8 i G9 (w grupie Mn-CDF), których nomenklatura bazuje na numeracji białek MTP *A. thaliana*, występujących w poszczególnych grupach (GUSTIN i współaut. 2011). Nie wszystkie białka CDF (MTP) u roślin zostały scharakteryzowane funkcjonalnie. Do tej pory ustalono funkcję i lokalizację ośmiu z dwunastu roślinnych homologów transporterów AtMTP1-AtMTP12 (Ryc. 2C).

#### GRUPA Zn-CDF

U roślin grupa Zn-CDF obejmuje trzy grupy białek związanych z transportem cynku: grupę 1 (MTP1-MTP4), grupę 5 (MTP5) i grupę 12 (MTP12). Białka występujące w tej grupie zawierają wysoce konserwatywne motywy, bogate w reszty histydynowe i asparaginianowe w transbłonowych helisach II i V (MONTANINI i współaut. 2007).

#### Grupa 1

Białka grupy I to najlepiej dotąd poznane transportery MTP u roślin. Powstały one w wyniku duplikacji genu kodującego przodka wspólnego dla całej grupy, która nastąpiła przed rozdzieleniem się roślin jednoliściennych i dwuliściennych i dała początek przodkom dwóch oddzielnych linii białek: MTP1/2/3 i MTP4 (GUSTIN i współaut. 2011). Jednak w trakcie ewolucji, geny

kodujące białka MTP4 u roślin jednoliściennych zostały prawdopodobnie utracone (GUSTIN i współaut. 2011). Kolejne duplikacje przodka genów *MTP1/2/3*, do których doszło u niektórych roślin dwuliściennych, doprowadziły do powstania najpierw dwóch przodków genów *MTP1/2* i *MTP3*, a następnie do wyróżnicowania się trzech odrębnych genów *MTP1*, *MTP2* i *MTP3* (GUSTIN i współaut. 2011). Pierwszym scharakteryzowanym roślinnym białkiem grupy I był transporter MTP1 *Arabidopsis thaliana*, określany na początku jako białko AtZAT1 (VAN DER ZAAL i współaut. 1999). Jego duże podobieństwo do wcześniej scharakteryzowanych ssaczych transporterów cynku ZnT2, ZnT3 i ZnT4 sugerowało, że uczestniczy on w transporcie cynku, co potwierdzono w badaniach eksperymentalnych (VAN DER ZAAL i współaut. 1999). Postępujące sekwencjonowanie genomów roślinnych pozwoliło zidentyfikować geny kodujące homologiczne białka i ustalić funkcję tych białek u gatunków takich jak topola (hybryda *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*), tytoń (*Nicotiana glauca* i *Nicotiana tabacum*), ryż (*Oryza sativa*), ogórek (*Cucumis sativus*), jęczmień (*Hordeum vulgare*) oraz hiperakumulatorów *Thlaspi goesingense* i *Arabidopsis halleri*. Wszystkie dotychczasowe badania wskazują, że białka MTP1 pełnią podobną funkcję u różnych gatunków roślin. Charakterystyczne cechy ich budowy to: 6 helis transbłonowych, domena bogata w histydyny zlokalizowana między helisami IV i V, a także motyw zamka leucynowego, który jest niezbędny do aktywności transportowej tych białek (BLAUDEZ i współaut. 2003, SHINGU i współaut. 2005, KAWACHI i współaut. 2008, YUAN i współaut. 2012, MENGUER i współaut. 2013, FUJIWARA i współaut. 2015). Ich wspólną cechą jest także zdolność do homo-oligomeryzacji, w której uczestniczą mostki siarczkowe reszt cysteinowych budujących białka (BLOSS i współaut. 2002, BLAUDEZ i współaut. 2003, MIGOCKA i współaut. 2014a).

Niemal wszystkie scharakteryzowane dotąd białka MTP1 lokalizują się w błonie wakuolarnej (PERSANS i współaut. 2001, BLAUDEZ i współaut. 2003, DRÄGER i współaut. 2004, KOBAE i współaut. 2004, DESBROSSES-FONROUGE i współaut. 2005, SHINGU i współaut. 2005, KAWACHI i współaut. 2008, SHAHZAD i współaut. 2010, PODAR i współaut. 2012, MENGUER i współaut. 2013, MIGOCKA i współaut. 2014a). Wyjątek stanowi białko TgMTP1, które w heterologicznych systemach ekspresyjnych lokalizuje się zarówno w błonie komórkowej (w protoplastach *A. thaliana* i w drożdżach), jak i w błonie wakuolarnej (w roślinach *A. thaliana*) (KIM i współaut. 2004, GUSTIN i współaut. 2009). Badania z

wykorzystaniem drożdży jako heterologicznych systemów ekspresji genów białek MTP1 wykazały, że transport jonów metali z ich udziałem odbywa się na zasadzie antyportu  $\text{Me}^{2+}/\text{H}^+$  (BLAUDEZ i współaut. 2003, SHINGU i współaut. 2005, KAWACHI i współaut. 2008, MIGOCKA i współaut. 2014a). Gradient protonów, wykorzystywany jako źródło energii dla tego transportu, generowany jest przez wakuolarną pompę protonową V-ATPazę (BLAUDEZ i współaut. 2003, SHINGU i współaut. 2005, KAWACHI i współaut. 2008, MIGOCKA i współaut. 2014a). Przypuszcza się, że w komórkach roślinnych źródłem siły protonomotorycznej dla białek MTP1 może być również wakuolarna pirofosfataza (KAWACHI i współaut. 2008).

Mimo dużego podobieństwa sekwencji białek MTP1 u różnych roślin, ich specyficzność substratowa jest dosyć zróżnicowana. Białka *Arabidopsis* (AtMTP1) i topoli (PtdMTP1) są wysoce specyficzne wobec cynku, natomiast białka innych roślin wykazują szerszą specyficzność i transportują różne metale, takie jak: cynk, nikiel, kadm czy kobalt (BLAUDEZ i współaut. 2003, KOBAE i współaut. 2004, PODAR i współaut. 2012). Badania kinetyki transportu jonów metali przez białka MTP1 sugerują, że są to transportery o niskim powinowactwie do substratu, funkcjonujące w warunkach znacznie podwyższonych stężeń metali w komórkach, charakterystycznych dla warunków stresowych (KAWACHI i współaut. 2008). Powinowactwo i specyficzność białek MTP1 do metali są w dużym stopniu determinowane przez pętlę histydynową zlokalizowaną między helisami IV i V. Usunięcie głównego fragmentu tej pętli z białka AtMTP1 powoduje bowiem 2-krotny wzrost  $K_m$  białka dla cynku i 12-krotny wzrost szybkości transportu metalu przez to białko (KAWACHI i współaut. 2008). Drożdże z ekspresją genu kodującego zmodyfikowane białko cechują się hipertolerancją na Zn i tolerancją na Co (KAWACHI i współaut. 2008). Sugeruje się, że region bogaty w reszty histydynowe może tworzyć swoistą „kieszę buforującą”, wiążącą cytoplazmatyczne jony cynku, którą „wysyca” dopiero jego podwyższone stężenie w komórce (KAWACHI i współaut. 2008). „Wysycenie” pętli histydynowej jonami cynku prawdopodobnie aktywuje ich transport przez błonę wakuolarną (KAWACHI i współaut. 2008). Całkowita delecja pętli histydynowej powoduje dysfunkcję białka AtMTP1, a wymiana pętli między białkami AtMTP1 i HvMTP1 (zdolnego do transportu zarówno cynku jak i kobaltu) powoduje wymianę specyficzności substratowych między nimi, co ostatecznie potwierdza jej funkcję w transporcie jonów metali i determinacji specyficzności sub-

stratowej białek MTP1 (KAWACHI i współaut. 2008, PODAR i współaut. 2012). Oprócz pętli histydynowej, specyficzność substratową białek MTP1 determinują także konserwatywne aminokwasy helis transbłonowych II i V, które tworzą por dla jonu transportowanego przez błonę, oraz aminokwasy końcowych domen cytozolowych (CTD) (KAWACHI i współaut. 2012). Kluczowym elementem dla funkcji tych białek jest również ostatnia reszta leucynowa z motywu zamka leucynowego (KAWACHI i współaut. 2012).

Wyjątkowo cennych informacji dostarczyły badania nad białkami MTP1 u hiperakumulatorów metali ciężkich *Thlaspi goesingense* i *Arabidopsis halleri*, dowodzące kluczowej ich funkcji w determinacji fenotypu zwiększonej tolerancji hiperakumulatorów na cynk i kadm. Transkrypcja genów MTP1 u roślin niebędących hiperakumulatorami jest utrzymywana na względnie stałym poziomie, bez względu na wzrastające stężenie cynku w środowisku (VAN DER ZAAL i współaut. 1999, BLAUDEZ i współaut. 2003, KOBAE i współaut. 2004, DESBROSSES-FONROUGE i współaut. 2005, SHINGU i współaut. 2005, PODAR i współaut. 2012, MIGOCKA i współaut. 2014a). *Thlaspi goesingense* ma tylko jedną kopię genu MTP1, ale jego ekspresja jest bardzo wysoka i prowadzi do powstania dwóch alternatywnych transkryptów: *TgMTP1t1*, kodującego białko transportujące jony  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ , oraz *TgMTP1t2*, kodującego białko transportujące jony  $\text{Ni}^{2+}$  (PERSANS i współaut. 2001). *Arabidopsis halleri* ma aż pięć paralogów białka MTP1 (A1, A2, B, C, D), które różnią się nieznacznie kilkoma aminokwasami w obrębie N-końcowej domeny cytoplazmatycznej oraz pętli bogatej w histydyny (SHAHZAD i współaut. 2010). Wszystkie paralogi wykazują zdolność do transportu cynku, ale wydajność tego transportu jest zróżnicowana. Najbardziej wydajne są paralogi A1 i A2, wysoce homologiczne do AtMTP1; najmniejszą wydajność wykazuje paralog B, natomiast paralogi C i D cechują się pośrednią wydajnością transportu (SHAHZAD i współaut. 2010). Zwiększona ilość transkryptów białek MTP1 u hiperakumulatorów, a w konsekwencji zwiększona ilość białek MTP1 w błonach wakuolarnych ich komórek pozwala tym roślinom na zwiększoną akumulację cynku w wakuolach i zwiększa ich tolerancję na ten metal. *Arabidopsis halleri* może zakumulować nawet do stu razy więcej cynku w liściach niż *Arabidopsis thaliana* (DRÄGER i współaut. 2004, GUSTIN i współaut. 2009, SHAHZAD i współaut. 2010). Zmiany w regulacji transkrypcji genów MTP1 i duplikacje tych genów przyczyniły się zatem do adaptacji roślin *Thlaspi goesingense* i *Arabidopsis halleri* do życia w

środowiskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi.

Oprócz MTP1, w grupie 1 białek Zn-CDF scharakteryzowano także białka MTP3 (AtMTP3) i MTP4 (CsMTP4). AtMTP3 strukturalnie bardzo przypomina białko AtMTP1: ma 6 transbłonowych helis, końce aminowy i karboksylowy po stronie cytoplazmy oraz pętlę bogatą w histydyny. Największą ilość transkryptu genu *AtMTP3* wykryto w korzeniach, które prawdopodobnie są głównym miejscem ekspresji tego genu (ARRIVAUULT i współaut. 2006). Poziom transkryptu genu zwiększa się istotnie w odpowiedzi na podwyższone stężenie manganu, cynku i kobaltu oraz niedobór żelaza w środowisku (ARRIVAUULT i współaut. 2006). Badania z wykorzystaniem drożdży wykazały jednak, że AtMTP3 transportuje tylko jony cynku i kobaltu (ARRIVAUULT i współaut. 2006). Podobnie jak AtMTP1, AtMTP3 lokalizuje się w błonie wakuolarnej komórek *A. thaliana* (ARRIVAUULT i współaut. 2006). Kontrolowana sekwestracja cynku w wakuolach epidermy i skórki korzenia z udziałem AtMTP3 prawdopodobnie stanowi element regulacji dalekiego transportu tego metalu z korzeni do pędów *Arabidopsis thaliana*.

Jedynie scharakteryzowane białko typu MTP4 pochodzi z ogórka. Gen kodujący to białko ulega ekspresji we wszystkich organach wegetatywnych oraz w okwiatach i owocach, ale nie w słupku czy pręcikach (MIGOCKA i współaut. 2014a). Pod wieloma względami białko CsMTP4 przypomina białka MTP1, w tym białko CsMTP1 ogórka: ma podobną topologię i skład aminokwasowy, lokalizuje się w błonie wakuolarnej i transportuje jony cynku i kadmu (MIGOCKA i współaut. 2014a). Podobnie jak białka MTP1, białko MTP4 występuje w postaci homo-oligomerów w błonie, powstających prawdopodobnie w wyniku tworzenia mostków dwusiarczkowych (MIGOCKA i współaut. 2014a). Obydwa białka różnią się jednak znacznie liczbą reszt histydynowych w konserwatywnej pętli histydynowej: pętla CsMTP4 zawiera prawie dwa razy mniej reszt histydynowych niż pętla CsMTP1 (MIGOCKA i współaut. 2014a). Zredukowana zawartość reszt histydynowych jest prawdopodobnie przyczyną tego, że białko CsMTP4 wykazuje czterokrotnie niższe powinowactwo do cynku niż białko CsMTP1. Co ciekawe, mimo iż poziom transkryptu genu *CsMTP4* nie zwiększa się w warunkach podwyższonego stężenia cynku, w tych samych warunkach tonoplastowy poziom białka CsMTP4 wzrasta wielokrotnie (MIGOCKA i współaut. 2014a). Wydaje się zatem, że aktywność CsMTP4 może być regulowana przez cynk na poziomie potranskrypcyjnym

lub potranslacyjnym (MIGOCKA i współaut. 2014a).

#### Grupy 5 i 12

Grupy 5 i 12 zawierają odpowiednio, białka MTP5 i MTP12, które pochodzą od wspólnego przodka i występują w pojedynczych kopiach u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych (GUSTIN i współaut. 2011). O ile białka MTP5 przypominają swoją budową większość transporterów CDF, białka MTP12 znacznie się od nich różnią. Białko AtMTP12 *A. thaliana* ma aż 14 transbłonowych helis i jest około dwukrotnie większe od białek MTP1-MTP4 czy MTP5 (FUJIWARA i współaut. 2015). Podobnie jak białka grupy 1, białka MTP12 mają jednak pętlę bogatą w reszty histydynowe między TMH XII i TMH XIII oraz te same konserwatywne reszty aminokwasowe w TMH X i TMH XIII (FUJIWARA i współaut. 2015). W przeciwieństwie do białek grupy 1, białka AtMTP5 i AtMTP12 lokalizują się w błonach aparatu Golgiego, gdzie tworzą heterodimerski kompleks (FUJIWARA i współaut. 2015). Poziom białka AtMTP12 w komórkach *A. thaliana* jest utrzymywany na stałym poziomie, niezależnie od stężenia cynku w środowisku (FUJIWARA i współaut. 2015). Kompleks AtMTP5-AtMTP12 nie komplementuje fenotypu nadwrażliwości drożdży na cynk, ale komplementuje fenotyp nadwrażliwości drożdży na niedobór tego metalu w podłożu (FUJIWARA i współaut. 2015). Wydaje się zatem, że kompleks AtMTP5-AtMTP12 uczestniczy raczej w dostarczaniu jonów cynku do światła cystern (gdzie metal jest niezbędny do aktywności i syntezy enzymów zależnych od cynku), niż w detoksykacji komórek z nadmiaru tego metalu (FUJIWARA i współaut. 2015).

#### GRUPA Zn/Fe-CDF

Roślinne białka grupy Zn/Fe-CDF należą do dwóch grup białek: grupy 6 (MTP6) i grupy 7 (MTP7) (GUSTIN i współaut. 2011). Ich specyficzność substratowa przewidywana jest tylko na podstawie badań przeprowadzonych na homologicznych białkach drożdżowych (Mmt1 i Mmt2) (LANGE i współaut. 1999, LI i współaut. 2014) i bakteryjnych (EcFieF, WmFieF) (WEI i współaut. 2004, WEI I FU 2005, LU I FU 2007, COUDRAY i współaut. 2013), bowiem białka roślinne nie były dotąd charakteryzowane funkcjonalnie. W transbłonowych helisach II i V tych białek występują wysoce konserwatywne motywy bogate w reszty histydynowe i asparaginianowe (w grupie 6), histydynowe i walinowe (TMH II) lub walinowe i asparaginianowe (TMH V) (w grupie 7) (MONTANINI i współaut. 2007). Charakterystyczną cechą opisanych



dotąd białek Zn/Fe-CDF jest ich zdolność do transportu jonów żelaza (GRASS i współaut. 2005). Oprócz żelaza, ich substratami mogą być także jony cynku, kobaltu, kadmu czy niklu (MONTANINI i współaut. 2007). Żadne z dotąd badanych białek Zn/Fe-CDF nie wykazywało zdolności do transportu jonów manganu (MONTANINI i współaut. 2007). Podobnie jak geny kodujące białka z grup 5 i 12, geny białek grup 6 i 7 występują w genomie w postaci jednej kopii (GUSTIN i współaut. 2011).

#### GRUPA Mn-CDF

Do grupy białek Mn-CDF należą białka grup 8 i 9 pochodzące od wspólnego przodka, którego gen uległ duplikacji, a następnie różnicowaniu prawdopodobnie przed lub w czasie wychodzenia roślin na ląd (GUSTIN i współaut. 2011). Kolejne duplikacje w obrębie genów białek grupy 9, do których doszło przed rozdzieleniem się roślin jednoliściennych od dwuliściennych, doprowadziły do powstania genów kodujących białka MTP9, MTP10 i MTP11 (GUSTIN i współaut. 2011). Scharakteryzowane dotąd roślinne białka Mn-CDF to wysoce specyficzne transportery manganu o masie ok. 45 kDa, tworzące 4 lub 5 transbłonowych helis i występujące w błonie w postaci homo-dimerów (DELHAIZE i współaut. 2003, CHEN i współaut. 2013, MIGOCKA i współaut. 2014, PEDAS i współaut. 2014, EROGLU i współaut. 2015). Wyjątek stanowi białko MTP9 ogórka zdolne do transportu jonów  $Mn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$  (MIGOCKA i współaut. 2015). W transbłonowych helisach II i V tych białek występują wysoce konserwatywne motywy DxxxD (x-dowolny aminokwas) (MONTANINI i współaut. 2007).

#### Grupa 8

Białka MTP8 scharakteryzowano u różnych gatunków roślin: hyperakumulatora manganu *Stylosanthes hamata* (ShMTP8), ryżu (*OsMTP8.1*), ogórka (*CsMTP8*), jęczmienia (*HvMTP8.1*, *HvMTP8.2*) i *A. thaliana* (*AtMTP8*) (DELHAIZE i współaut. 2003, CHEN i współaut. 2013, MIGOCKA i współaut. 2014b, PEDAS i współaut. 2014, EROGLU i współaut. 2015). Większość z nich lokalizuje się w błonie wakuolarnej i odpowiada za transport jonów manganu do wakuoli na drodze antyportu  $Mn^{2+}/H^{+}$  (DELHAIZE i współaut. 2003, CHEN i współaut. 2013, MIGOCKA i współaut. 2014b, PEDAS i współaut. 2014, EROGLU i współaut. 2015). Wyjątek stanowią białka *HvMTP8.1* i *HvMTP8.2*, które lokalizują się w błonach aparatu Golgiego i odpowiadają za sekwestrację jonów metalu w cysterbach aparatu (PEDAS i współaut. 2014).  $K_m$  dla transportu jonów manganu przez białko ogórka *CsMTP8* wynosi w przybliżeniu 2,5

$\mu M$ , co sugeruje że białka MTP8 wykazują niskie powinowactwo do jonów tego metalu i są aktywowane w warunkach podwyższonego stężenia jonów  $Mn^{2+}$  w komórce (MIGOCKA i współaut. 2014b). Poziom białek MTP8 u ogórka i ryżu, roślin, które nie są hiperakumulatorami Mn, zwiększa się znacznie w warunkach podwyższonych stężeń tego metalu w środowisku (CHEN i współaut. 2013, MIGOCKA i współaut. 2014b), natomiast poziom białka MTP8 u hiperakumulatora Mn *S. hamata* jest konstytutywnie bardzo wysoki, na skutek zwielokrotnienia kopii genów kodujących to białko (DELHAIZE i współaut. 2003, PEITER i współaut. 2007). Wydaje się zatem, że wakuolarne białka MTP8 odpowiadają za detoksykację komórek roślinnych z nadmiaru manganu poprzez zwiększoną sekwestrację metalu w wakuoli w warunkach stresu Mn w środowisku, i że warunkują fenotyp zwiększonej akumulacji i tolerancji na Mn u *S. hamata*. Białka MTP8 aparatu Golgiego komórek jęczmienia (*HvMTP8.1* i *HvMTP8.2*) są pozytywnie regulowane w odpowiedzi na nadmiar Mn tylko w korzeniach (PEDAS i współaut. 2014). W liściach, ekspresja genów kodujących te białka zmniejsza się znacznie w warunkach zwiększonego stężenia manganu w środowisku (PEDAS i współaut. 2014). Przypuszcza się, że w liściach białka MTP8 aparatu Golgiego odpowiadają raczej za zaopatrzenie cystern aparatu w mangan, niż za detoksykację komórek z jego nadmiaru (PEDAS i współaut. 2014). W korzeniach, białka te mogą uczestniczyć w usuwaniu nadmiaru manganu z komórek na drodze egzocytozy, z udziałem pęcherzyków drogi sekrecyjnej (PEDAS i współaut. 2014). Ekspresję genu kodującego białko *AtMTP8* badano w warunkach nadmiaru manganu i niedoboru żelaza, ponieważ pobieranie i akumulacja manganu jest ściśle zależna od poziomu żelaza w środowisku: żelazo wpływa negatywnie na pobieranie Mn ze środowiska i jego transport w obrębie rośliny (GEORGE i współaut. 2011). Poziom transkryptu genu *AtMTP8* wzrasta zarówno w obecności nadmiaru Mn, jak i w warunkach deficytu Fe w podłożu, co potwierdziło negatywny wpływ Fe na pobieranie i akumulację Mn w tkankach roślin (EROGLU i współaut. 2015). W warunkach deficytu Fe w środowisku ekspresja genu *AtMTP8* jest ograniczona do zewnętrznych warstw korzeni: epidermy, włóśników i skórki (EROGLU i współaut. 2015). W tych samych warunkach indukowane są geny odpowiadające za pobieranie żelaza do komórki: gen reduktazy FRO2 i gen czynnika transkrypcyjnego FIT (EROGLU i współaut. 2015). Przypuszcza się, że czynnik transkrypcyjny FIT stymuluje ekspresję genu *AtMTP8* w warunkach deficytu żelaza, aby

zwiększyć sekwestrację nadmiaru manganu w wakuolach komórek korzeni i tym samym umożliwić komórkom zwiększone pobieranie jonów żelaza z podłoża (EROGLU i współaut. 2015).

#### Grupa 9

W zależności od gatunku roślin, grupa 9 składa się z różnej liczby białek. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano geny kodujące trzy białka tej grupy: AtMTP9, AtMTP10 i AtMTP11, natomiast w genomie ogórka występują tylko geny białek MTP9 i MTP11 (MIGOCKA i współaut. 2015). Białka MTP9 scharakteryzowano u ogórka (CsMTP9) i ryżu (OsMTP9). Badania z wykorzystaniem drożdży i transformowanych roślin potwierdziły, że obydwa białka transportują jony Mn (MIGOCKA i współaut. 2015, UENO i współaut. 2015). Co ciekawe, CsMTP9 wykazuje także zdolność do transportu jonów kadmu (MIGOCKA i współaut. 2015). Analizy immunocytochemiczne lokalizacji białek MTP9 w korzeniach wykazały, że występują one w zewnętrznej błonie komórek endodermi i epidermy (MIGOCKA i współaut. 2015, UENO i współaut. 2015) i lokalizują się w błonie komórkowej w sposób spolaryzowany: znajdują się tylko w tej części błony, która bezpośrednio przylega do miękiszu (w epidermie) lub perycyklu (w endodermie) (MIGOCKA i współaut. 2015, UENO i współaut. 2015). Spolaryzowana lokalizacja białek MTP9 w korzeniach determinuje polarny transport metali z podłoża do walca osiowego korzeni. Gen *CsMTP9* ulega ekspresji jedynie w korzeniach ogórka, a poziom transkryptu tego genu i kodowanego przez niego białka jest znacznie stymulowany w odpowiedzi na Cd i nadmiar Mn w środowisku (MIGOCKA i współaut. 2015). Stałe  $K_m$  dla transportu jonów manganu i kadmu przez CsMTP9 wynoszą odpowiednio, 10  $\mu$ M i 2,5  $\mu$ M, co sugeruje niskie powinowactwo białka do transportowanych metali i wskazuje na jego udział w procesach detoksykacji komórek z nadmiaru Mn (MIGOCKA i współaut. 2015). Ponieważ paralogiczny transporter Mn u ogórka, CsMTP8, wykazuje 4-krotnie większe powinowactwo do jonów tego metalu, wydaje się, że detoksykacja komórek korzeni z nadmiaru Mn polega w pierwszej kolejności na sekwestracji metalu w wakuoli, a dopiero w drugiej na usuwaniu metalu poza komórkę (MIGOCKA i współaut. 2014b, 2015).

Białko MTP10 scharakteryzowano u buraka *Beta vulgaris* (BvMTP10) (ERBASOL i współaut. 2013). Jest to transporter wysoce specyficzny wobec manganu, który lokalizuje się w błonach aparatu Golgiego (ERBASOL i współaut. 2013). Ekspresja genu kodującego to białko zwiększa się znacznie w korzeniach

i liściach w odpowiedzi na nadmiar manganu w środowisku (ERBASOL i współaut. 2013). Sugeruje się zatem, że podobnie jak HvMTP8.1 i HvMTP8.2, BvMTP10 uczestniczy w akumulacji manganu w cysternach aparatu Golgiego i późniejszej sekrecji tego metalu na zewnątrz komórek na drodze egzocytozy z udziałem pęcherzyków szlaku sekrecyjnego (ERBASOL i współaut. 2013).

Białka MTP11 scharakteryzowano u *A. thaliana*, topoli (*P. trichocarpa*) i buraka (*Beta vulgaris*). Są to białka wysoce specyficzne dla manganu, które podobnie jak białka MTP10 lokalizują się w błonach aparatu Golgiego (dokładnie w sieci trans), gdzie odpowiadają za akumulację metalu w lumen pęcherzyków sekrecyjnych i wydalanie metalu poza komórkę na drodze egzocytozy (PETER i współaut. 2007, ERBASOL i współaut. 2013). Potwierdzeniem roli tych białek w usuwaniu jonów Mn z komórek, jest zmniejszona akumulacja manganu w drożdżach z ekspresją *AtMTP11* i *BvMTP11* oraz lokalizacja białka AtMTP11 w organach związanych z sekrecją, takich jak hydrotody, a nie w komórkach endodermalnych czy trichomach, które uczestniczą w akumulacji metali (PETER i współaut. 2007, ERBASOL i współaut. 2013).

#### PODSUMOWANIE

Dotychczasowe badania nad białkami CDF u drożdży, ssaków (ZnT) i roślin (MTP) wykazały, że warunkują one utrzymanie wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów metali ciężkich, niezbędnej dla prawidłowego funkcjonowania i rozwoju organizmów eukariotycznych. Są to białka błonowe o zróżnicowanej strukturze i specyficzności substratowej: mają od pięciu do piętnastu domen transbłonowych i transportują dwuwartościowe kationy metali o podobnych właściwościach fizyko-chemicznych i zbliżonym promieniu jonowym, takie jak:  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  czy  $Cd^{2+}$ . Ze względu na swoją lokalizację subkomórkową, białka CDF pełnią kluczową rolę zarówno w procesach detoksykacji komórek z metali ciężkich, transportując ich nadmiar do wakuoli, do pęcherzyków drogi sekrecyjnej i do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jak i w zaopatrywaniu takich organelli jak siateczka śródplazmatyczna (ER) czy aparat Golgiego w mikroelementy niezbędne do prawidłowej obróbki i funkcjonowania obecnych w nich białek. Determinują one zatem zarówno tolerancję organizmów na metale ciężkie, jak i odpowiednie zaopatrzenie komórek w metale korzystne. Złożone analizy filogenetyczne transporterów tej rodziny wykazały, że tworzą one trzy grupy główne, cechujące

się najwyższym powinowactwem do cynku (grupa Zn-CDF), cynku i żelaza (grupa Zn/Fe-CDF) lub manganu (Mn-CDF), jednak do tej pory specyficzność i funkcja fizjologiczna białek CDF u większości organizmów nie zostały potwierdzone w badaniach eksperymentalnych. Co więcej, ponieważ do tej pory nie scharakteryzowano funkcjonalnie ani roślinnych ani ssaczych białek z grupy Zn/Fe-CDF, nie ma żadnych dowodów na to, że transportują one cynk i żelazo. Brakuje także danych wyjaśniających mechanizmy regulacji aktywności białek CDF w komórkach eukariotycznych. Defekty funkcji tych transporterów prowadzą do zaburzeń chorobowych u ludzi, zwierząt i roślin, wynikających z nieprawidłowej dystrybucji metali w komórkach i tkankach. Zatem pełna charakterystyka molekularna rodziny białek CDF, połączona z określeniem mechanizmów regulujących ich aktywność i interakcje z innymi białkami, jest niezbędna dla zrozumienia procesów molekularnych leżących u podstaw stanów patologicznych wywołanych nadmiarem i deficytem metali ciężkich oraz wrażliwości i tolerancji organizmów na te stresy. Stosunkowo duża liczba białek CDF o zróżnicowanej lokalizacji i specyficzności substratowej u roślin wskazuje na szczególnie zdolności adaptacyjne roślin do zmiennej dostępności jonów metali w środowisku i pozwala sądzić, że niektóre z tych białek, po dokładnej analizie funkcjonalnej i molekularnej, można w przyszłości wykorzystać w biotechnologii roślin dla celów fitoremediacji i biofortyfikacji.

#### Streszczenie

Metale ciężkie, to naturalnie występujące metale, półmetale i metaloidy, wśród których znajdują się mikroelementy niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmów oraz pierwiastki balastowe, które nie pełnią żadnych funkcji biologicznych. W toku ewolucji organizmy żywe wykształciły szereg mechanizmów komórkowych odpowiedzialnych za pobieranie i usuwanie nadmiaru tych pierwiastków ze swoich komórek. Istotną rolę w tych procesach pełnią białka z rodziny CDF (z ang. Cation Diffusion Facilitator). Odpowiadają one zarówno za dostarczanie kluczowych mikroelementów Zn i Fe do wnętrza komórek i organelli takich jak aparat Golgiego i endosomy, jak i za aktywne wydzielanie nadmiaru różnych metali ciężkich z cytoplazmy do wakuoli lub do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. W ostatnich latach biologiczna rola białek CDF w komórkach eukariotycznych została znacznie przybliżona dzięki intensywnym badaniom prowadzonym na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, ssakach i roślinach. Niniejsza praca prezentuje najbardziej aktualną wiedzę o lokalizacji komórkowej i funkcji eukariotycznych transporterów CDF.

#### LITERATURA

APPENROTH K. J., 2010. What are "heavy metals" in plant sciences? *Acta Physiol. Plant.* 32, 615-619.

- ARRIVAU S., SENER T., KRAMER U., 2006. *The Arabidopsis metal tolerance protein AtMTP3 maintains metal homeostasis by mediating Zn exclusion from the shoot under Fe deficiency and Zn oversupply.* *Plant J.* 46, 861-879.
- ASSCHE F., CLIJSTERS H., 1990. *Effects of metals on enzyme activity in plants.* *Plant Cell Environ.* 13, 195-206.
- BASHIR K., TAKAHASHI R., NAKANISHI H., NISHIZAWA N. K., JANG J. C., 2013. *The road to micronutrient biofortification of rice: progress and prospects.* *Front. Plant Sci.* 4, 1-15.
- BLAUDEZ D., KOHLER A., MARTIN F., SANDERS D., CHALOT M., 2003. *Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif.* *Plant Cell* 15, 2911-2928.
- BLOSS T., CLEMENS S., NIES D. H., 2002. *Characterization of the ZAT1p zinc transporter from Arabidopsis thaliana in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes.* *Planta* 214, 783-791.
- CHEN Z., FUJII Y., YAMAJI N., MASUDA S., TAKEMOTO Y., KAMIYA T., YUSUYIN Y., IWASAKI K., KATO S. I., MAESHIMA M., MA J. F., UENO D., 2013. *Mn tolerance in rice is mediated by MTP8.1, a member of the cation diffusion facilitator family.* *J. Exp. Bot.* 64, 4375-4387.
- CLEMENS S., 2001. *Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis.* *Planta* 212, 475-486.
- CONKLIN D. S., MCMASTER J. A., CULBERTSON M. R., KUNG C., 1992. *COTJ, a gene involved in cobalt accumulation in Saccharomyces cerevisiae.* *Mol. Cell. Biol.* 12, 3678-3688.
- COUDRAY N., VALVO S., HU M., LASALA R., KIM C., VINK M., ZHOU M., PROVASI D., FILIZOLA M., TAO J., FANG J., PENCZEK P. A., UBARETXENA-BELANDIA I., STOKES D. L., 2013. *Inward-facing conformation of the zinc transporter YüP revealed by cryoelectron microscopy.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 2140-2145.
- COUSINS R. J., MCMAHON R. J., 2000. *Zinc and health: current status and future directions in integrative aspects of zinc transporters.* *J. Nutr.* 130, 1384-1387.
- COUSINS R. J., LIUZZI J. P., LICHTEN L. A., 2006. *Mammalian zinc transport, trafficking, and signals.* *J. Biol. Chem.* 281, 24085-24089.
- DELHAIZE E., KATAOKA T., HEBB D. M., WHITE R. G., RYAN P. R., 2003. *Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance.* *Plant Cell* 15, 1131-1142.
- DESBROSSES-FONROUGE A. G., VOIGT K., SCHRÖDER A., ARRIVAU S., THOMINE S., KRAMER U., 2005. *Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation.* *FEBS Lett.* 579, 4165-4174.
- DRÄGER D. B., DESBROSSES-FONROUGE A. G., KRACH C., CHARDONNENS A. N., MEYER R. C., SAUMITOU-LAPRADE P., KRAMER 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.
- DUFFUS J. H., 2002. "Heavy metals" - A meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 793-807.
- ELLIS C. D., WANG F., MACDIARMID C. W., CLARK S., LYONS T., EIDE D. J., 2004. *Zinc and the Msc2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function.* *J. Cell Biol.* 166, 325-335.



- ELLIS C. D., MACDIARMID C. W., EIDE, D. J., 2005. *Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells*. J. Biol. Chem. 280, 28811-28818.
- ERBASOL I., BOZDAG G. O., KOC A., PEDAS P., KARAKAYA H. C., 2013. *Characterization of two genes encoding metal tolerance proteins from Beta vulgaris subspecies maritima that confers manganese tolerance in yeast*. BioMetals 26, 795-804.
- EROGLU S., MEIER B., VON WIREN N., PEITER E., 2015. *The vacuolar manganese transporter MTP8 determines tolerance to Fe deficiency-induced chlorosis in Arabidopsis*. Plant Physiol. 170, 1030-1045.
- ETIM E. E., 2012. *Phytoremediation and its mechanisms: a review*. Int. J. Environ. Bioenergy 2, 120-136.
- FUJIWARA T., KAWACHI M., SATO Y., MORI H., KUTSUNA N., HASEZAWA S., MAESHIMA M., 2015. *A high molecular mass zinc transporter MTP12 forms a functional heteromeric complex with MTP5 in the Golgi in Arabidopsis thaliana*. FEBS J. 282, 1965-1979.
- FUKUNAKA A., SUZUKI T., KUROKAWA Y., YAMAZAKI T., FUJIWARA N., ISHIHARA K., MIGAKI H., OKUMURA K., MASUDA S., YAMAGUCHI-IWAI Y., NAGAO M., KAMBE T., 2009. *Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway*. J. Biol. Chem. 284, 30798-30806.
- GEORGE E., HORST W., NEUMANN E., 2011. *Adaptation of plants to adverse chemical soil conditions*. [W:] Mineral nutrition of higher plants. MARSCHNER P. (red.). Academic Press, 409-472.
- GRASS G., OTTO M., FRICKE B., HANEY C. J., RENSING C., NIES D. H., MUNKELT D., 2005. *FieF (YüP) from Escherichia coli mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress*. Arch. Microbiol. 183, 9-18.
- GUFFANTI A. A., WEI Y., ROOD S. V., KRULWICH T. A., 2002. *An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: Divalent cations efflux in exchange for K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup>*. Mol. Microbiol. 45, 145-153.
- GUSTIN J. L., LOUREIRO M. E., KIM D., NA G., TIKHONOVA M., SALT D. E., 2009. *MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuoles suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn-hyperaccumulating plants*. Plant J. 57, 1116-1127.
- GUSTIN J. L., ZANIS M. J., SALT D. E., 2011. *Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters*. BMC Evol. Biol. 11, 76.
- HANEY C. J., GRASS G., FRANKE S., RENSING C., 2005. *New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32, 215-226.
- HUANG L., TEPAAMORNDACH S., EDITOR G., HEDIGER M. A., 2013. *Molecular aspects of medicine the SLC30 family of zinc transporters – A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles*. Mol. Aspects Med. 34, 548-560.
- ISHIHARA K., YAMAZAKI T., ISHIDA Y., SUZUKI T., ODA K., NAGAO M., YAMAGUCHI-IWAI Y., KAMBE T., 2006. *Zinc transport complexes contribute to the homeostatic maintenance of secretory pathway function in vertebrate cells*. J. Biol. Chem. 281, 17743-17750.
- KAMBE T., 2012. *Molecular architecture and function of ZnT transporters*. Curr. Top. Membr. 69, 199-220.
- KAMBE T., NARITA H., YAMAGUCHI-IWAI Y., HIROSE J., AMANO T., SUGIURA N., SASAKI R., MORI K., IWANAGA T., NAGAO M., 2002. *Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic  $\beta$  cells*. J. Biol. Chem. 277, 19049-19055.
- KAMIZONO A., NISHIZAWA M., TERANISHI Y., MURATA K., KIMURA A., 1989. *Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 219, 161-167.
- KAWACHI M., KOBAYASHI Y., MIMURA T., MAESHIMA M., 2008. *Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn<sup>2+</sup> / H<sup>+</sup> antiporter of Arabidopsis thaliana, stimulates the transport activity*. J. Biol. Chem. 283, 8374-8383.
- KAWACHI M., KOBAYASHI Y., KOGAWA S., MIMURA T., KRAMER U., MAESHIMA M., 2012. *Amino acid screening based on structural modeling identifies critical residues for the function, ion selectivity and structure of Arabidopsis MTP1*. FEBS J. 279, 2339-2356.
- KIM D., GUSTIN J. L., LAHNER B., PERSANS M. W., BAEK D., YUN D. J., SALT D. E., 2004. *The plant CDF family member TgMTP1 from the Ni/Zn hyperaccumulator Thlaspi goesingense acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in Saccharomyces cerevisiae*. Plant J. 39, 237-251.
- KIRSCHKE C. P., HUANG L., 2003. *ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus*. J. Biol. Chem. 278, 4096-4102.
- KOBAYASHI Y., UEMURA T., SATO M. H., OHNISHI M., MIMURA T., MAESHIMA M., 2004. *Zinc transporter of Arabidopsis thaliana AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis plant cell*. Plant Cell Physiol. 45, 1749-1758.
- KOLAJ-ROBIN O., RUSSELL D., HAYES K. A., PEMBROKE J. T., SOULIMANE T., 2015. *Cation diffusion facilitator family: structure and function*. FEBS Lett. 589, 1283-1295.
- LANGE H., KISPAL G., LILL R., 1999. *Mechanism of iron transport to the site of heme synthesis inside yeast mitochondria*. J. Biol. Chem. 274, 18989-18996.
- LAZARCZYK M., PONS C., MENDOZA J.-A., CASSONNET P., JACOB Y., FAVRE M., 2008. *Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses*. J. Exp. Med. 205, 35-42.
- LEE S., HENNIGAR S. R., ALAM S., NISHIDA K., KELLEHER S. L., 2015. *Essential role for zinc transporter 2 (ZnT2)-mediated zinc transport in mammary gland development and function during lactation*. J. Biol. Chem. 290, 13064-13078.
- LI L., KAPLAN J., 1998. *Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity*. J. Biol. Chem. 273, 22181-22187.
- LI L., KAPLAN J., 2001. *The yeast gene MSC2, a member of the cation diffusion facilitator family, affects the cellular distribution of zinc*. J. Biol. Chem. 276, 5036-5043.
- LI L., MIAO R., JIA X., WARD D. M., KAPLAN J., 2014. *Expression of the yeast cation diffusion facilitators Mmt1 and Mmt2 affects mitochondrial and cellular iron homeostasis: Evidence for mitochondrial iron export*. J. Biol. Chem. 289, 17132-17141.

- LU M., FU D., 2007. *Structure of the zinc transporter YüP*. Science 317, 1746-1748.
- MACDIARMID C. W., MILANICK M. A., EIDE D. J., 2002. *Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 277, 39187-39194.
- MACDIARMID C. W., MILANICK M. A., EIDE D. J., 2003. *Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock*. J. Biol. Chem. 278, 15065-15072.
- MCCORMICK N. H., KELLEHER S. L., 2012. *ZnT4 provides zinc to zinc-dependent proteins in the trans-Golgi network critical for cell function and Zn export in mammary epithelial cells*. AJP Cell Physiol. 303, C291-C297.
- MENGUEP P. K., FARTHING E., PEASTON K. A., RICACHENEVSKY F. K., FETT J. P., WILLIAMS L. E., 2013. *Functional analysis of the rice vacuolar zinc transporter OsMTP1*. J. Exp. Bot. 64, 2871-2883.
- MIGOCA M., KOSIERADZKA A., PAPIERNIAK A., MACIASZCZYK-DZIUBINSKA E., 2014a. *Two metal-tolerance proteins , MTP1 and MTP4 , are involved in Zn homeostasis and Cd sequestration in cucumber cells*. J. Exp. Bot. 66, 1-15. OZNACZYĆ A i B
- MIGOCA M., PAPIERNIAK A., MACIASZCZYK-DZIUBINSKA E., POZDZIK P., POSYNIK E., GARBIEC A., FILLEUR S., 2014b. *Cucumber metal transport protein MTP8 confers increased tolerance to manganese when expressed in yeast and Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot. 65, 5367-5384.
- MIGOCA M., PAPIERNIAK A., KOSIERADZKA A., POSYNIK E., MACIASZCZYK-DZIUBINSKA E., BISKUP R., GARBIEC A., MARCHEWKA T., 2015. *Cucumber metal tolerance protein CsMTP9 is a plasma membrane H<sup>+</sup>-coupled antiporter involved in the Mn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> efflux from root cells*. Plant J. 84, 1045-1058.
- MIYABE S., IZAWA S., INOUE Y., 2001. *The Zrc1 is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 282, 79-83.
- MONTANINI B., BLAUDEZ D., JEANDROZ S., SANDERS D., CHALOT M., 2007. *Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity*. BMC Genomics 8, 107.
- NIEBOER E., RICHARDSON D. H. S., 1980. *The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions*. Environ. Pollution. Ser. B, Chem. Phys. 1, 3-26.
- NIES D. H., 2003. *Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes*. FEMS Microbiol. Rev. 27, 313-339.
- NIES D. H., SILVER S., 1995. *Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances*. J. Ind. Microbiol. 14, 186-199.
- NOLTE C., GORE A., SEKLER I., KRESSE W., HERSHFINKEL M., HOFFMANN A., KETTENMANN H., MORAN A., 2004. *ZnT-1 expression in astroglial cells protects against zinc toxicity and slows the accumulation of intracellular zinc*. Glia 48, 145-55.
- PALMITER R. D., FINDLEY S. D., 1995. *Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc*. EMBO J. 14, 639-649.
- PALMITER R. D., HUANG L., 2004. *Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers*. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 447, 744-751.
- PATRUSHEV N., SEIDEL-ROGOL B., SALAZAR G., 2012. *Angiotensin II requires zinc and down-regulation of the zinc transporters ZnT3 and ZnT10 to induce senescence of vascular smooth muscle cells*. PLoS One 7, e33211.
- PAULSEN I. T., SAIER M. H. JR., 1997. *A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins*. J. Membr. Biol. 156, 99-103.
- PEDAS P., STOKHOLM M. S., HEGELUND J. N., HALD A., 2014. *Golgi localized barley MTP8 proteins facilitate Mn transport*. PLoS One 9, 1-21.
- PEITER E., MONTANINI B., GOBERT A., PEDAS P., HUSTED S., MAATHUIS F. J. M., BLAUDEZ D., CHALOT M., SANDERS D., 2007. *A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 8532-8537.
- PERSANS M. W., NIEMAN K., SALT D. E., 2001. *Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in Thlaspi goesingense*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 9995-10000.
- PODAR D., SCHERER J., NOORDALLY Z., HERZYK P., NIES D., SANDERS D., 2012. *Metal selectivity determinants in a family of transition metal transporters*. J. Biol. Chem. 287, 3185-3196.
- QUADRI M., FEDERICO A., ZHAO T., BREEDVELD G. J., BATTISTI C., DELNOOZ C., SEVERIJNEN L. A., DI TORO MAMMARELLA L., MIGNARRI A., MONTI L., SANNA A., LU P., PUNZO F., COSSU G., WILLEMSSEN R., RASI F., OOSTRA B. A., VAN DE WARRENBURG B. P., BONIFATI V., 2012. *Mutations in SLC30A10 cause parkinsonism and dystonia with hypermanganesemia, polycythemia, and chronic liver disease*. Am. J. Hum. Genet. 90, 467-477.
- RICACHENEVSKY F. K., MENGUEP P. K., SPEROTTO R. A., WILLIAMS L. E., FETT J. P., 2013. *Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies*. Plant Physiol. 4, 144.
- SCHÜTZENDÜBEL A., POLLE A., 2002. *Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization*. J. Exp. Bot. 53, 1351-1365.
- SENSI S. L., PAOLETTI P., BUSH A. I., SEKLER I., 2009. *Zinc in the physiology and pathology of the CNS*. Nat. Rev. Neurosci. 10, 780-791.
- SHAHZAD Z., GOSTI F., FRÉROT H., LACOMBE E., ROOSENS N., SAUMITOU-LAPRADE P., BERTHO-MIEU P., 2010. *The five AHMT1 zinc transporters undergo different evolutionary fates towards adaptive evolution to zinc tolerance in Arabidopsis halleri*. PLoS Genet. 6, e1000911.
- SHINGU Y., KUDO T., OHSATO S., KIMURA M., ONO Y., YAMAGUCHI I., HAMAMOTO H., 2005. *Characterization of genes encoding metal tolerance proteins isolated from Nicotiana glauca and Nicotiana tabacum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 331, 675-680.
- UENO D., SASAKI A., YAMAJI N., MIYAJI T., FUJII Y., TAKEMOTO Y., MORIYAMA S., CHE J., MORIYAMA Y., IWASAKI K., MA J. F., 2015. *A polarly localized transporter for efficient manganese uptake in rice*. Nat. Plants 1, 15170.
- VAN DER ZAAL B., NEUTEBOOM L., PINAS J., CHARDONNENS A., SCHAT H., VERKLEIJ J., HOOYKAAS P., 1999. *Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation*. Plant Physiol. 119, 1047-1055.
- WEI Y., FU, D., 2005. *Selective metal binding to a membrane-embedded aspartate in the Escherichia coli metal transporter YüP (FieF)*. J. Biol. Chem. 280, 33716-33724.

- WEI Y., FU D., 2006. *Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the Escherichia coli metal transporter YiiP*. J. Biol. Chem. 281, 23492-23502.
- WEI Y., LI H., FU D., 2004. *Oligomeric state of the Escherichia coli metal transporter YiiP*. J. Biol. Chem. 279, 39251-39259.
- WIJESEKARA N., DAI F. F., HARDY A. B., GIGLOU P. R., BHATTACHARJEE A., KOSHKIN V., CHIMIENTI F., GAISANO H. Y., RUTTER G. A., WHEELER M. B., 2010. *Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion*. Diabetologia 53, 1656-1668.
- WU Y. H., FREY A. G., EIDE D. J., 2011. *Transcriptional regulation of the Zrg17 zinc transporter of the yeast secretory pathway*. Biochem. J. 435, 259-266.
- YUAN L., YANG S., LIU B., 2012. *Molecular characterization of a rice metal tolerance protein OsMTP1*. Plant Cell Rep. 31, 67-79.

**KOSMOS Vol. 66, 3, 351-364, 2017**

KAROLINA MAŁAS, MAGDALENA MIGOCKA

Department of Plant Molecular Physiology, Institute of Experimental Biology, University of Wrocław, Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław,  
E-mail: karolina.malas@uwr.edu.pl

#### PHYSIOLOGICAL FUNCTION OF THE CDF PROTEINS IN EUKARYOTIC ORGANISMS

##### Summary

Heavy metals are naturally occurring metals, semi-metals and metalloids, including the microelements essential for the proper function of living cells, as well as the non-essential elements having no established biological functions. Organisms have evolved multiple mechanisms to maintain heavy metal homeostasis within their cells. The family of CDF (Cation Diffusion Facilitator) proteins has been shown to play a crucial role in these processes. Members of CDF contribute to the delivery of micronutrients, such as Fe or Zn, into the cells and cellular organelles, such as Golgi compartment and endosomes, as well as to the efflux of a variety of heavy metals into the vacuole or extracellular space. Recently, the biological role of CDF proteins in eukaryotic cells has been greatly clarified by extensive research on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mammals and plants. This work presents the current knowledge about the cellular localization and function of eukaryotic CDF transporters.

**Key words:** CDF proteins, homeostasis of heavy metals