

Charakterystyka transportera MpACR3 z *Marchantia polymorpha* oraz identyfikacja reszt aminokwasowych związanych ze specyficznością substratową eukariotycznych transporterów z rodziny ACR3

Katarzyna Mizio

STRESZCZENIE

ACR3 to rodzina transporterów błonowych nadających komórkom wysoką oporność na arsen, rozpowszechnionych u bakterii, archeonów oraz wielu gatunków eukariontów. Najlepiej scharakteryzowanym członkiem rodziny pozostaje Acr3 z drożdży *S. cerevisiae* (ScAcr3). ScAcr3 wykorzystuje energię gradientu elektrochemicznego H^+ i eksportuje As(III) oraz Sb(III) z cytoplazmy do środowiska zewnętrznego. Sekwencje kodujące homologi Acr3 zidentyfikowano u wielu gatunków roślin, jednak niewiele wiadomo o ich funkcjach. W niniejszej pracy dokonano charakterystyki białka Acr3 pochodzącego z wątrobowca *Marchantia polymorpha* (MpACR3).

Przewidywana topologia MpACR3 składa się z dziesięciu regionów transmembranowych z końcami aminowym i karboksylowym zlokalizowanymi w cytoplazmie. N-koniec MpACR3 jest kilkukrotnie dłuższy od analogicznego regionu w ScAcr3. Analizy funkcjonalności transportera dokonano klonując gen *MpACR3* do wektora umożliwiającego heterologiczną ekspresję w komórkach *S. cerevisiae*. Wykazano, iż ekspresja *MpACR3* powoduje komplementację fenotypu zwiększonej wrażliwości mutantu delecyjnego drożdży *acr3Δ* na As(III) oraz zmniejsza wewnątrzkomórkową akumulację As(III) poprzez wydajny wyrzut metaloidu z komórek. Podobnie do ScAcr3, aktywność transportowa białka MpACR3 zależy od obecności reszt Cys236, Glu407 i Glu434, które są wysoce konserwatywne w rodzinie białek ACR3. N-końcowy region białka MpACR3 pełni funkcję sensora metaloidów w komórce i reguluje lokalizację subkomórkową transportera. W warunkach kontrolnych MpACR3 podlega retencji w retikulum endoplazmatycznym, a w odpowiedzi na arsen lub antymon relokacji do błony komórkowej. Podobny sposób regulacji wykryto w przypadku roślinnego homologa z *Physcomitrella patens* (PpACR3), a cecha ta wydaje się być unikatową dla roślinnych transporterów ACR3. Co więcej, zamiana N-końców u MpACR3 i ScAcr3 nadaje transporterom nowe właściwości lokalizacyjne, przy zachowanej funkcjonalności. Zdolność transporterów do eksportu metaloidów nie zależy więc od ich

końców aminowych. Reszty aminokwasowe zaangażowane w nadawanie specyficzności transportowej zidentyfikowano na podstawie analizy mutacyjnej genu *ScACR3*. Substytucja V173A w *ScAcr3* skutkuje zmniejszoną opornością na Sb(III) oraz wysoką wewnątrzkomórkową akumulacją Sb(III), przy zachowaniu oporności na As(III). Substytucja E353D skutkuje za to zmniejszoną opornością na As(III) oraz zwiększoną akumulacją As(III) w komórkach, przy zachowaniu oporności na Sb(III). Podobny efekt fenotypowy występuje po wprowadzeniu analogicznych substytucji w sekwencji *MpACR3* (V258A i E407D).

W obrębie N-końca *MpACR3* zidentyfikowano sekwencję $_{45}\text{LR}\text{CRF}_{49}$ zawierającą di-argininowy motyw retencji retikularnej (RXR) i zachowaną w postaci konsensusu u innych roślinnych *Acr3* o długich końcach aminowych. Substytucja alaninowa już pojedynczej reszty Arg46, Arg48 lub Leu45 znosi retencję transportera niezależnie od obecności arsenu. Istotny element regulacji lokalizacji *MpACR3* stanowią reszty Cys29, Cys47 i Cys71. Substytucja alaninowa którejkolwiek z nich uniemożliwia prawidłową relokację transportera w odpowiedzi na arsen. Prawdopodobnie wymienione reszty bezpośrednio wiążą cząsteczkę As(III), stanowiąc molekularny sensor obecności tego metaloidu.

12.01.2023 mizio

Characterization of the MpACR3 transporter from *Marchantia polymorpha* and identification of amino acid residues associated with substrate specificity of eukaryotic ACR3 family transporters

Katarzyna Mizio

ABSTRACT

ACR3 is the ubiquitous family of membrane transporters that confer high-level resistance to arsenicals, widespread in bacteria, archeons and many eukaryotic species. The *S. cerevisiae* Acr3 (ScAcr3) is a plasma membrane proton gradient driven arsenite and antimonite transporter and the best studied member of the family. Putative Acr3 homologues have been identified in plants; however, their function remains largely uncharacterized. In this study, the Acr3 protein from the liverwort *Marchantia polymorpha* (MpACR3) was characterized.

MpACR3 is predicted to have ten membrane spans with both terminal regions facing cytoplasm. MpACR3 N-terminus is several times longer than the analogous region in ScAcr3. *MpACR3* gene was cloned and analyzed by heterologous expression in budding yeast cells. MpACR3 is able to fully complement increased arsenite sensitivity of the *acr3Δ* yeast strain and reduces intracellular accumulation of arsenite by increasing its efflux. Similar to ScAcr3, MpACR3 requires highly conserved cysteine and glutamate residues (Cys236, Glu407, Glu434) for transport activity. The MpACR3 N-terminal region acts as a metalloid sensor and regulates subcellular localization of this transporter. Under non-stress conditions, MpACR3 is retained in the endoplasmic reticulum (ER) but relocates to the plasma membrane in response to arsenic or antimony. Similar response is observed for *Physcomitrella patens* Acr3 homologue (PpACR3) and it seems to be a unique feature of plant members of the ACR3 family. An amino-termini swap between MpACR3 and ScAcr3 confers new localization properties but does not affect transporter function. Thus, the ability to transport metalloids is not dependent on the N-terminal region. Amino acid residues involved in transporter specificity were identified by mutational analysis of *ScACR3* gene. V173A substitution in ScAcr3 results in loss of Sb(III) resistance with high intracellular antimonite accumulation but As(III) resistance is retained. E353D substitution strongly impairs As(III) tolerance and increases arsenite accumulation in the cells but does not affect Sb(III) resistance. A similar

phenotype effects occur when analogous substitutions are introduced into the MpACR3 sequence (V258A and E407D).

A sequence containing di-arginine (RXR) retention motif was identified in the MpACR3 N-terminus (₄₅LRCRF₄₉). Alanine substitution of any of Arg46, Arg48, Leu45 residues abolishes ER retention, regardless of metalloid exposure. The first three N-terminal cysteine residues Cys29, Cys47 and Cys71 also play an important role in this process. Substituting any of them with alanine prevents MpACR3 sorting to the plasma membrane in response to arsenic. Hypothetically, the cysteine residues sense metalloid presence by directly binding As(III).

12.01.2023 Mizio