

CHARAKTERYSTYKA ROŚLINNYCH ANTYPORTERÓW KATIONOWO/PROTONOWYCH TYPU CAX

THE PROPERTIES OF CAX-TYPE ANTIPORTERS IN PLANTS

Anna PAPIERNIAK, Magdalena MIGOCKA

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie: Rośliny dla prawidłowego wzrostu i rozwoju wymagają określonego stężenia makroelementów i mikroelementów. Jednak w wysokich stężeniach zarówno metale niezbędne, jak i balastowe są bardzo toksyczne dla żywych organizmów. Rośliny, jako organizmy nieprzemieszczające się w trakcie cyklu życiowego, wytworzyły mechanizmy regulujące procesy pobierania, dystrybucji i sekwestracji jonów lub innych substancji. W ostatnich latach w komórkach roślinnych zidentyfikowano i wstępnie scharakteryzowano rozmaite systemy transportowe zaangażowane w aktywne przenoszenie jonów metali przez błony komórkowe. Wyróżniamy wśród nich m.in. integralne białka błonowe z rodziny CaCA (ang. Ca^{2+} /Cation Antiporter), transportujące Ca^{2+} lub inne kationy z wykorzystaniem przezbłonowego gradientu H^+ albo Na^+ . Na podstawie podobieństwa i funkcji, wszystkie białka z rodziny CaCA podzielono na 5 podrodzin: antyportery Na^+/Ca^{2+} (NCX), zależne od potasu antyportery Na^+/Ca^{2+} (NCKX i CCX), zidentyfikowane u *Prokaryota* transportery YRBG i transportery CAX, przy czym najbliższej dotąd scharakteryzowane białka CaCA należą do podrodziny CAX. Białka CAX zidentyfikowano u roślin, grzybów i bakterii i co ciekawe nie znaleziono sekwencji genowych homologicznych do genów CAX u modelowych organizmów zwierzęcych, w tym u człowieka. Początkowo wszystkie roślinne białka CAX zgrupowano w jedną podrodzinę liczącą 11 transporterów (CAX1–11). Później, na podstawie bardziej szczegółowych analiz składu aminokwasowego, podrodzinę podzielono na dwie grupy białek: typowe białka CAX (CAX1–6) i nietypowe białka CAX (CAX7–11), wykazujące duże podobieństwo do antyporterów Na^+/Ca^{2+} zależnych od potasu. Typowe białka CAX *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa* podzielono dodatkowo na dwie różne podgrupy: IA i IB. Pojedynczy łańcuch polipeptydowy białek CAX złożony jest z ok. 400 aminokwasów i tworzy domeny transbłonowe (7–12) o strukturze α -helisy. Transportery CAX jako podrodzina białek CaCA mają domeny charakterystyczne dla tej rodziny, jak również motywy specyficzne tylko dla swojego typu. Domeny te odgrywają często kluczową rolę w regulacji aktywności transportowej białek warunkując ich funkcję transportową oraz determinując ich specyficzność substratową. W obrębie sekwencji wyróżniono: pętle c-1 i c-2, które działają jak filtr odpowiadający za selekcję i wiązanie kationów, domenę autoinhibitorową, która uczestniczy w regulacji aktywności białek, domenę CaD, domenę manganową, domenę D oraz motyw kwaśnych aminokwasów, które prawdopodobnie determinują specyficzność substratową transporterów. Badania prowadzone w układach heterologicznych, podobnie jak analizy roślinnych mutantów *cax* dowiodły, że transportery typu CAX stanowią istotny komponent układu utrzymującego homeostazę wapniową w komórkach roślinnych i drożdżowych. Jednakże dalsze analizy funkcjonalne białek CAX pokazały, że są to transportery o szerokim powinowactwie do różnych metali. Wprowadzenie genów

CAX, pochodzących od różnych roślin do mutantów drożdżowych pozbawionych swoistych transporterów metali, przywracało mutantom zdolność do transportu Cd^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} i Mn^{2+} , a tym samym oporność na nadmiar tych metali w środowisku. Z czasem okazało się, że funkcje białek tej rodziny są wielorakie i na poziomie całego organizmu determinują pośrednio prawidłowy wzrost i rozwój roślin. Prawdopodobnie biorą one udział nie tylko w utrzymaniu homeostazy metali (Ca, Mn, Ni i Cd), ale również w utrzymaniu szeroko pojętej równowagi jonowej w organizmie roślinnym. Mutanty *cax1* akumulowały mniej Zn^{2+} i Mn^{2+} , natomiast u podwójnych mutantów *cax1/cax3* zaobserwowano istotnie większy poziom PO_4^{3-} , Mn^{2+} i Zn^{2+} w stosunku do roślin dzikich. Wskazuje się również na udział transporterów *CAX* w odpowiedzi roślin na stres chłodu i stres solny. Poziom transkryptu *AtCAX1* wyraźnie wzrastał po traktowaniu roślin temperaturą 4°C, natomiast ekspresja genów *AtCAX1-4* była stymulowana w obecności soli w środowisku. Dość liczne badania wskazują także na wzajemne interakcje pomiędzy transporterami *CAX* oraz oddziaływania tych białek z innymi białkami błonowymi. Profil organowej ekspresji genów *CAX* analizowany u *Arabidopsis thaliana* pokazał, że poszczególne geny tej rodziny ulegają zróżnicowanej lub podobnej ekspresji na różnych etapach ontogenezy rośliny. Biotechnologiczne manipulacje z udziałem genów *CAX* mogą doprowadzić do uzyskania modyfikowanych roślin uprawnych, stanowiących bogate źródło niezbędnych pierwiastków w diecie człowieka. Ekspresja genu *sCAX1* u ziemniaka, pomidora i marchwi powodowała wzrost zawartości wapnia w jadalnych częściach roślin oraz podwyższoną sekwestrację tego pierwiastka w centralnej wakuoli. Białka *CAX* mogą być także wykorzystane w procesie tzw. fitoremediacji, czyli oczyszczania gleb z metali ciężkich. Rośliny z podwyższoną ekspresją genów *CAX* w wyższym stopniu akumulują kadm, mangan i wapń w wakuolach.

Słowa kluczowe: transportery wtórne, białka *CAX*, detoksykacja, fitoremediacja, metale ciężkie, heterologiczna ekspresja.

Summary: It is well known that both, macro- and microelements are required for normal growth and development of all organisms. However, elevated concentrations of both, essential and non-essential metals are very toxic for cell metabolism. Plants as sessile organisms are frequently subjected to different biotic and abiotic stresses, including heavy metals stress, so they have evolved various mechanisms that protect their cells from the toxicity resulting from metal excess. They involve the regulation of the uptake, distribution and sequestration of metal ions within the cells and tissues. In the last few years various proteins specific for metals have been identified and initially characterized in plants, including active transport systems comprising pumps and secondary transporters that transfer ions across cellular membranes. Among them, Ca^{2+} /cation antiporter (CaCA) family constitute integral membrane proteins that transport Ca^{2+} or other cations using the H^+ or Na^+ gradient. They have been divided into following five major families according to their similarity and function: the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporters (NCX), the K^+ -dependent $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporters (NCKX and CCX), the YRBG transporters found in *Procarvayotes*, and the cation exchangers, but the *CAXs* (*CAation eXchangers*) family is the best characterized. Genes of *CAX* family have been found in plants, fungi and bacteria but their homologs are absent in animal organisms, including human. Previous studies indicated that there are at least 11 *CAX* genes (*AtCAX1-11*) in *Arabidopsis* genome. Further phylogenetic analysis revealed that the subfamily forms rather two distinct groups: typical (*CAX1-6*) and untypical *CAX* (*CAX7-11*) proteins with the latter showing strong similarity to the potassium dependent $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter family. Typical *CAX* proteins have been further classified into 2 distinct types: IA and IB in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. The open reading frames of *CAX* genes encode for the proteins consisting of approximately 400 amino acids and spanning the membrane 7–12 times. Within the sequences various specific motifs has been identified which are characteristic for the CaCA family, as well as for the *CAX* type. It is assumed that these domains play critical role in the regulation of proteins activity and substrate specificity. Two crucial domains: c-1 and c-2 have been proposed to act as a filter for cation selection. Other specific *CAXs* motifs involve: autoinhibitory domain, which participates in the control of *CAX* activity, the CaD domain, the Mn^{2+} domain, the D domain and the acidic motif, which probably determine substrate specificities of these transporters. Heterological expression of plant *CAXs* in yeast and phenotypic analyses of available plant *cax* mutants have been the most common tools for functional characterization of *CAX* transporters. They revealed that *CAXs* made up the essential component of calcium arrangement in plant and yeast cells. Moreover, it was well proved that these transporters show affinity to more than one different metals. The transformation of *cax* yeast mutants with different *CAX* genes from plants restored Cd^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} resistance of yeasts to elevated concentration of these metals. It seems that *CAX*

family comprises proteins with multiple functions determining the normal growth and development of plants. They probably contribute in the maintenance of metal and other ions homeostasis (Mn, Ni and Cd). The single *cax1* mutants accumulated less Zn^{2+} and Mn^{2+} than wild type, however it was observed that the level of PO_4^{3-} , Mn^{2+} i Zn^{2+} in *cax1/cax3* double mutants was even higher. It has been shown that CAX transporters are involved in the acclimation to cold as well as in the response to salt stress: the *AtCAX1* transcript level increased significantly after cold treatment (4°C), and the *AtCAX1-4* gene expression was considerably enhanced in the presence of salt in the environment. It was also suggested, that CAX transporters may be functionally associated with each other as well as with distinct membrane proteins. Tissue expression analyses of the individual genes of *Arabidopsis thaliana* shown different or similar expression pattern of all the CAX members during different stages of plant ontogenesis. In the view of their functional multiplicity, CAX genes seem to be suitable targets for engineering of cultivated plants, which can enrich humans diet in the indispensable elements. Engineered tomato and carrot plants expressing a high number of CAX proteins accumulated more calcium than a wild type. The over-expression of CAX could thus improve calcium content of potato, tomato and carrot and result in the sequestration of this element in central vacuole. On the other hand, CAX proteins can be also used to improve the phytoremediation process: cleaning up polluted soils from toxic heavy metals.

Key words: secondary transporters, CAX proteins, detoxication, phytoremediation, heavy metals, heterological expression.

WPROWADZENIE

Rośliny dla prawidłowego wzrostu i rozwoju wymagają określonego stężenia makroelementów (Ca^{2+} , Mg^{2+} i K^+) i mikroelementów (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+}), ale wszystkie metale, w szczególności niezbędne i balastowe metale ciężkie (Pb, Cd) w wysokich stężeniach są bardzo toksyczne dla żywych organizmów [6,17]. Różne zanieczyszczenia środowiska pochodzenia antropogenicznego: ścieki przemysłowe i miejskie, nawozy i środki ochrony roślin, domowe śmietniska i górnictwo, stanowią nieustające źródło metali dla środowiska. Zarówno naturalne ekosystemy, jak i zdrowie człowieka są coraz bardziej zagrożone destrukcyjnym wpływem tych pierwiastków. Rośliny uprawne są głównym źródłem makroelementów w diecie człowieka, ale jako organizmy trwale unieruchomione w glebie akumulują większość dostępnych jonów obecnych w roztworze glebowym. Tym samym stanowią zarówno źródło niezbędnych pierwiastków, jak i pierwiastków balastowych będących potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia człowieka. Stąd, od ponad 30 lat procesy pobierania, dystrybucji i sekwestracji jonów w komórkach roślinnych stanowią aktualny temat licznych badań ekologicznych, biochemicznych i genetycznych [6]. Badania te w dużej mierze są oparte na wiedzy pochodzącej z doniesień wyjaśniających regulację homeostazy jonowej w komórkach bakteryjnych, drożdżowych czy zwierzęcych. W efekcie, w ostatnich latach zidentyfikowano i wstępnie scharakteryzowano w komórkach roślinnych rozmaite systemy transportowe zaangażowane w aktywne przenoszenie jonów metali przez błony komórkowe [17,19,20]. Na podstawie podobieństwa w budowie, białka transporterowe przypisano do różnych rodzin i wykazano, że przedstawiciele jednej grupy białek mogą uczestniczyć zarówno w dystrybucji metali pomiędzy różnymi kompartmentami komórkowymi, jak i w sekrecji toksycznych jonów poza cytoplazmę komórkową [16,17].

Wykazano także, że energia niezbędna do transportu jonów przez błony pochodzi albo z rozkładu ATP (transportery pierwotne metali) albo z elektrochemicznego gradientu protonów (transportery wtórne metali), generowanego przez pompy protonowe plazmolemy (H^+ -ATPazę) i tonoplastu (V-ATPazę i V-PPazę) [5,17,27]. Najlepiej dotąd scharakteryzowane wtórne transportery metali u roślin należą do rodziny białek CAX. Pierwsze badania tych transporterów sugerowały, że są to przede wszystkim antyportery protonowo-wapniowe [1,26,29]. Z czasem okazało się, że funkcje białek tej rodziny są wielorakie i na poziomie całego organizmu determinują pośrednio prawidłowy wzrost i rozwój roślin. Prezentowana praca opisuje w sposób kompleksowy dotychczasowe badania i sugestie na temat budowy, specyficzności substratowej, a także przewidywanych, udowodnionych i sugerowanych funkcji roślinnych transporterów CAX. Ponadto, rozważane są aspekty ewentualnego praktycznego wykorzystania tych białek w kontekście fitoremediacji, rolnictwa czy odżywiania człowieka [17,27].

1. KLASYFIKACJA BIAŁKOWYCH TRANSPORTERÓW CAX

Skrót „CAX” (ang. *C*Ation *e*Xchanger) został wprowadzony do literatury naukowej przez zespół prof. Hirschi w 1996 roku, prowadzącego wówczas badania nad dwoma antyporterami kationowymi: CAX1 i CAX2 u modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* [17,28]. Obecnie, na podstawie najnowszej klasyfikacji ustalono, że wyodrębniona grupa białek CAX to jedna z pięciu podrodzin dużej i zróżnicowanej rodziny antyporterów kationowych CaCA (ang. Ca^{2+} /Cation Antipporter). Białka CaCA są integralnymi białkami błonowymi transportującymi wapń lub inne kationy z wykorzystaniem gradientu jonów H^+ albo Na^+ , generowanego przez transportery pierwotne [27]. Rodzina CaCA składa się z pięciu podrodzin białek, obejmujących: antyportery Na^+/Ca^{2+} (NCX), zależne od potasu antyportery Na^+/Ca^{2+} (NCKX i CCX), zidentyfikowane u *Prokaryota* transportery YRBG i wspomniane transportery CAX [18,23,28].

Białka CAX zidentyfikowano do tej pory u różnych, odległych ewolucyjnie organizmów i na podstawie występowania oraz składu aminokwasowego wydzielono wśród nich 3 główne typy [27,28]:

Typ I obejmuje transportery podobne do CAX1 *Arabidopsis thaliana*, znalezione u roślin, grzybów i bakterii.

Typ II obejmuje transportery z długim hydrofilowym regionem w obrębie końca N, występujące u grzybów, *Dictyostelium* i niższych kręgowców.

Typ III obejmuje transportery podobne do białka ChaA *Escherichia coli* występujące u bakterii.

Do tej pory nie wykazano obecności genów kodujących transportery CAX w zsekwencjonowanych genomach modelowych organizmów: człowieka, myszy, muszki owocowej i nicienia *Caenorhabditis elegans*. Analiza dostępnych baz genów *Arabidopsis thaliana* i *Oryza sativa* pokazała, że roślinne geny CAX należą do

TABELA 1. Zestawienie funkcji i lokalizacji transporterów CAX zidentyfikowanych u roślin wykonane na podstawie danych z bazy online [10] i publikacji autorstwa T. Shigaki [28]

TABLE 1. The function and localization of characterized CAX transporters in plants [10,28]

Białko (nr dostępu)	Organizm	Typ	Substrat	Lokalizacja
CAX1 (At2g38170)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	I-A	Ca ²⁺	wakuola
CAX2 (At3g13320)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	I-B	Cd ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺	wakuola
CAX3 (At5g01860)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	I-A	Ca ²⁺	wakuola
CAX4 (Atg01490)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	I-A	Cd ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺	wakuola
CAX5 (At1g55730)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	I-B	Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Mn ²⁺	wakuola
CAX6 (At1g55720)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	I-B	Ca ²⁺	wakuola
OsCAX1a (Os01g37690)	<i>Oryza sativa</i>	I-A	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	wakuola
OsCAX1b (Os05g51610)	<i>Oryza sativa</i>	I-A	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	wakuola
OsCAX1c (Os02g21009)	<i>Oryza sativa</i>	I-A	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	wakuola
OsCAX2 (Os03g27960)	<i>Oryza sativa</i>	I-B	Ca ²⁺	wakuola
OsCAX3 (Os04g55940)	<i>Oryza sativa</i>	I-B	Ca ²⁺	plazmolema
OsCAX4(Os02g0138900)	<i>Oryza sativa</i>	I-B	Ca ²⁺	wakuola
HvCAX2 (Q4R1A9)	<i>Hordeum vulgare</i>	I-B	Ca ²⁺ , Mn ²⁺	wakuola
VCAX1	<i>Vigna radiata</i>	I-A	Ca ²⁺	wakuola
ZmCAX1 (Q9LKW7)	<i>Zea mays</i>	I-A	Ca ²⁺	wakuola
ZmCAX2 (Q94IH5)	<i>Zea mays</i>	I-B	Ca ²⁺	wakuola
GmCAX1	<i>Glycine max</i>	I-A	Na ⁺ , K ⁺ , Li ⁺	plazmolema
CAX51 (AY660870)	<i>Capsella bursa pastoris</i>	I-A	?	?
H+/Ca ²⁺ exchanger 2 (AB018526)	<i>Ipomoea nil</i>	I-B	Ca ²⁺	?

złożonej wielogenowej rodziny. Do tej pory w genomach ryżu i rzodkiewnika zidentyfikowano odpowiednio, 5 i 11 różnych genów *CAX* (tab.1). Analizy filogenetyczne sugerują jednak, że w przypadku rzodkiewnika tylko sekwencje *CAX1-6* kodują właściwe białka CAX, natomiast geny *CAX7-11* wykazują większe podobieństwo do genów kodujących zależne od potasu antyportery Na⁺/Ca²⁺, występujące u ssaków [23,27,28].

Ponieważ niewiele genomów roślinnych zostało w pełni zsekwencjonowanych, wiedza na temat budowy i liczby genów *CAX* u innych roślin jest bardzo ograniczona. Na podstawie dostępnych sekwencji nukleotydowych genów *CAX* ryżu i rzodkiewnika określono sekwencje aminokwasowe, co umożliwiło konstrukcję pierwszego drzewa filogenetycznego roślinnych białek CAX. Na podstawie podobieństwa sekwencyjnego transportery podzielono na 2 typy:

Typ IA obejmujący białka AtCAX1, AtCAX3, AtCAX4 oraz OsCAX1a, OsCAX1b, OsCAX1c,

Typ IB obejmujący białka AtCAX2, AtCAX5, AtCAX6 i OsCAX2, OsCAX3, OsCAX4 [11,27,28].

Porównanie sekwencji aminokwasowych typowych białek CAX *A. thaliana* przedstawiono na rycinie 1. Sekwencje te są homologiczne względem siebie w różnym stopniu, co uzasadnia ich przynależność do odmiennych filogenetycznie typów. W obrębie typu IA najbardziej podobne (w 77%) do siebie białka to AtCAX1 i AtCAX3 [3]. Transporter AtCAX4 jest identyczny w 53% z AtCAX1 i w 54% z AtCAX3. Wszystkie trzy transportery CAX *Arabidopsis* zaliczone do typu IB wykazują wysoki stopień homologii: AtCAX5 jest w 87% podobny do AtCAX2 i w 88% do AtCAX6. Sugeruje się, że transportery CAX wykazujące największe podobieństwo pod względem budowy pełnią podobne funkcje fizjologiczne [4].

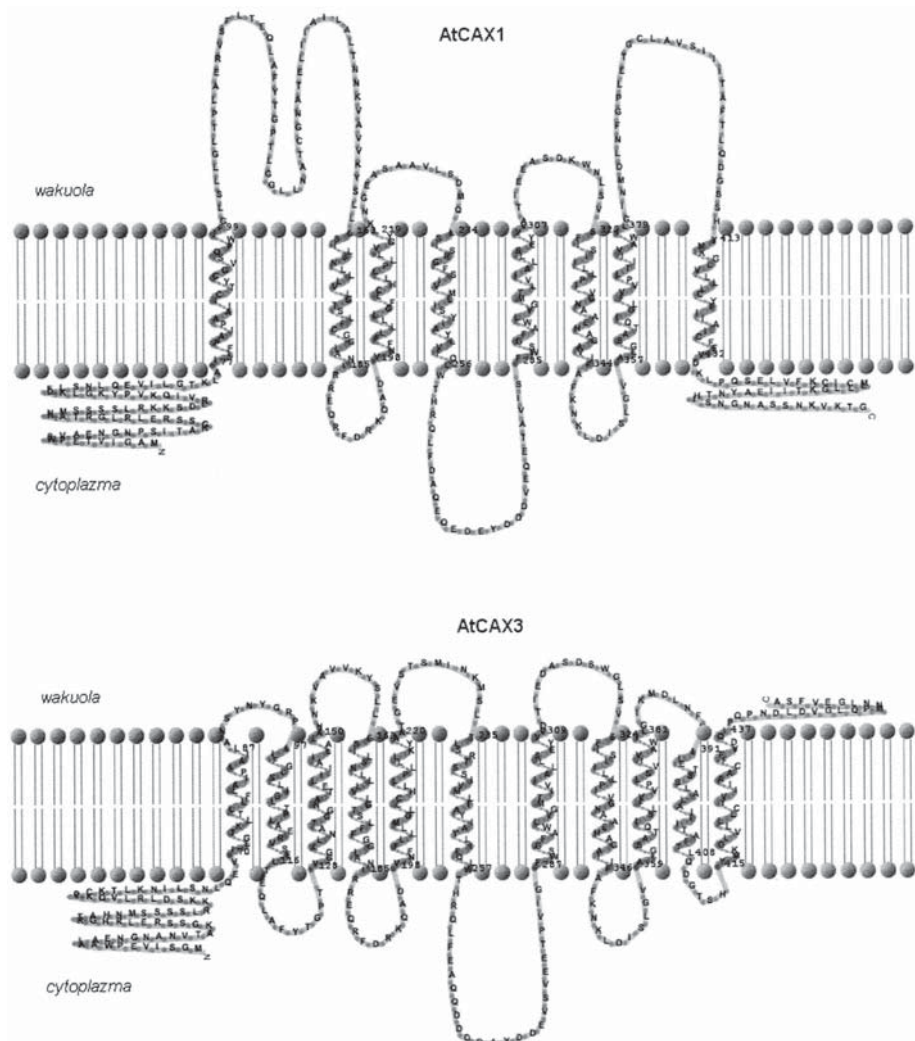
2. BUDOWA I TOPOLOGIA TRANSBLONOWA BIAŁEK CAX

Pojedynczy łańcuch polipeptydowy CAX złożony jest z ok. 400 aminokwasów i tworzy liczne domeny transbłonowe o strukturze α -helisy. Liczba i ułożenie domen transbłonowych przewidywana na podstawie sekwencji aminokwasów hydrofobowych w białku zależy od rodzaju programu komputerowego zastosowanego do analizy sekwencji białkowej i zwykle mieści się w zakresie 7–12 [ryc. 2]. Transportery CAX jako podrodzina białek CaCA, mają domeny charakterystyczne dla tej rodziny, jak również motywy specyficzne tylko dla swojego typu. Domeny te odgrywają często kluczową rolę w regulacji aktywności transportowej białek [28]. Funkcjonalna charakterystyka, niektórych białek CAX u drożdży wykazała, że dwie domeny aminokwasowe w obrębie sekwencji transporterów z dużym prawdopodobieństwem determinują ich specyficzność substratową. Są to: domena CaD i domena autoinhibitorowa [27].

Domena CaD (domena wapniowa), zlokalizowana między 87 a 95 aminokwasem (TM1 a TM2) w białku CAX1 prawdopodobnie jest niezbędna dla transportu wapnia. Heterologiczna ekspresja genu *AtCAX1* w komórkach drożdży nadwrażliwych na wapń powodowała, że grzyby akumulowały Ca w wakuoli, dzięki czemu zyskiwały odporność na ten pierwiastek. Podobny eksperyment z genem *AtCAX3* nie zniósł nadwrażliwości drożdży na wapń, pomimo że obydwa geny są do siebie bardzo podobne [3,27]. Co więcej, transgeniczne rośliny tytoniu syntetyzujące białka AtCAX3 z domeną CaD AtCAX1 wykazywały taką samą odpowiedź na wapń jak drożdże z ekspresją genu *AtCAX1*. Przyłączenie domeny CaD AtCAX1 do transportera CAX2 powodowało także podwyższony transport wapnia do wakuoli drożdży, ale nie wpływało na transport innych metali przez tonoplast grzybów. Sekwencja aminokwasowa tej domeny nie jest konserwatywna wśród białek CAX i prawdopodobnie dlatego poszczególne transportery CAX różnią się zdolnością transportu Ca [20]. Co ciekawe, pojedyncze lub wielokrotne mutacje w domenie CaD AtCAX1 nie zniósły całkowicie zdolności transportu wapnia przez to białko, co sugeruje, że także inne domeny transportera są zaangażowane w ten proces [27].

Drugą domenę, która reguluje funkcje transporterów CAX, określa się jako domenę regulatorową albo **autoinhibitorową**. Występuje ona w obrębie końca

aminowego białek (N-koniec), eksponowanego do cytoplazmy i składa się z ok. 60 aminokwasów. Domena autoinhibitorowa AtCAX1 zawiera dodatkowe 36 aminokwasów. Ekspresja *AtCAX1* pozbawionego N-końca w komórkach drożdży powodowała znacznie większy transport wapnia do wakuoli grzybów niż ekspresja pełnej sekwencji genu *AtCAX1*. Domena regulatorowa może być obecna we wszystkich roślinnych transporterach CAX. Najbardziej podobny do AtCAX1 transporter AtCAX3 również zawiera analogiczny region regulatorowy w obrębie



RYCINA 2. Topologia transbłonowa transporterów AtCAX1 i AtCAX3 przewidywana na podstawie składu aminokwasowego białek z użyciem programu TMHMM Server v.2.0 [8]. W zależności od użytego algorytmu ilość domen transbłonowych przewidywana na bazie sekwencji białek CAX jest zmienna, ale zwykle mieści się w zakresie od 7 do 12

FIGURE 2. Membrane topology of AtCAX1 and AtCAX3 transporters generated by TMHMM Server the v.2.0 program [8]. The predicted number of CAX transmembrane domains varies depending on the algorithm used (from 7 to 12)

N-końca [3]. Podobną domenę zidentyfikowano w antyporterowym białku VCAX1 fasoli, ale badania wykazały, że nie hamuje ona transportu wapnia przez białko. Zatem wydaje się, że transport wapnia jest regulowany w odmienny sposób w różnych gatunków roślin. W obrębie końca aminowego Ca^{2+} -ATPazy *A. thaliana* (ACA2) już wcześniej stwierdzono obecność domeny autoinhibitorowej, regulowanej przez kalmodulinę [18,27]. Wykazano także, że kalmodulina wiąże się do domeny w obrębie pierwszych 36 aminokwasów. Podobną domenę autoinhibitorową zidentyfikowano w obrębie antyportera sodowego NHE ssaków: związanie kalmoduliny do domeny zmniejszało powinowactwo transportera do jonów H^+ . Nie stwierdzono natomiast podobnego typu regulacji transportu wapnia u drożdży. Drożdżowy antyporter wapniowy VCX1 nie zawiera dodatkowych aminokwasów w obrębie N-końca, a jego funkcja jest regulowana na poziomie posttranslacyjnym przez kalcyneurynę, która podobnie jak kalmodulina jest białkiem wiążącym wapń [18,27,28].

Kolejnym motywem charakterystycznym dla rodziny białek CAX jest złożony z ok. 20 aminokwasów tzw. **motyw kwaśnych aminokwasów**, który występuje między 6 i 7 domeną transbłonową, dzieląc polipeptyd na dwie części. Po raz pierwszy zidentyfikowano ten fragment w obrębie sekwencji antyportera wapniowego *E. coli*. Wydaje się, że spełnia on istotną funkcję w wiązaniu jonów wapnia [27]. W obrębie sekwencji aminokwasowej transportera CAX2, pomiędzy 4 i 5 domeną transbłonową (177–186aa) zidentyfikowano region odpowiedzialny za transport jonów manganu, nazwany **domeną manganową**. Stosunkowo niewielka domena manganowa zbudowana jest z 3 aminokwasów w konfiguracji: cysteina-alanina-fenylalanina (CAF) [4]. Sugeruje się, że także transportery AtCAX5 i AtCAX6 u rzodkiewnika i ZCAX2 u kukurydzy mogą transportować mangan [25,27].

Po stronie wakuolarniej, między domenami transbłonowymi 3 i 4 białek CAX zlokalizowana jest **pętla c-1**, złożona z 35 aminokwasów [27]. Natomiast po stronie cytoplazmatycznej, między domenami transbłonowymi 8 i 9 transporterów występuje **pętla c-2**. Obydwie pętłe prawdopodobnie działają jako filtr odpowiadający za selekcję i wiązanie kationów, gdyż mutacje w ich obrębie całkowicie hamują lub redukują transport Ca^{2+} i Mn^{2+} . Analizy sekwencji białek CAX pochodzących od ryżu, *Arabidopsis*, fasoli, kukurydzy i drożdży wykazały, że obydwie pętłe są dosyć konserwatywne w swojej budowie [7,8,23]. Badania wykazały także, że ważną rolę w transporcie wapnia i manganu odgrywają reszty histydynowe występujące w pętli c-2 [27]. Spośród 20 biologicznie czynnych aminokwasów histydyna może tworzyć wiązania wodorowe, które mają wpływ na strukturę białka i jego funkcję. Udowodniono, że His338 w pętli c-2 AtCAX1 odgrywa ważną rolę w transporcie wapnia. Wykazano także, że zamiana tego aminokwasu na asparaginę zwiększa aktywność białek CAX w zakresie transportu cynku i kadmu, ale redukuje o 25% transport wapnia z udziałem antyporterów. Zamiana His338 na glutaminę lub lizynę nie powoduje utraty aktywności transportowych [27].

Ostatnią istotną funkcjonalnie domeną, charakterystyczną dla transporterów CAX jest **domena D**, zlokalizowana pomiędzy domenami transbłonowymi 5 i 6. Prawdopodobnie reguluje ona transport kationów. Wykazano, że obecna w obrębie domeny

D His222 odpowiada za regulację transportu wapnia przez białka CAX w odpowiedzi na zmiany pH w cytoplazmie [26,27].

3. FIZJOLOGICZNA ROLA TRANSPORTERÓW CAX U ROŚLIN

Stały poziom wapnia w cytoplazmie komórki roślinnej utrzymywany jest dzięki usuwaniu nadmiaru tego kationu poza cytoplazmę do apoplastu lub do wnętrza organelli wewnątrzkomórkowych, za pomocą aktywnego transportu z udziałem pomp wapniowych i wymiennicy $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ [14]. Badania z zastosowaniem mutantów drożdżowych i odpowiednich mutantów roślinnych wskazują, że transportery typu CAX stanowią istotny komponent układu utrzymującego homeostazę wapniową w komórkach roślinnych i drożdżowych [24,27]. Mutanty *Saccharomyces cerevisiae* pozbawione pompy wapniowej (PMC1) i antyportera wapniowego (VCX1) nabywały zdolności usuwania wapnia z cytoplazmy, kiedy drogą transformacji wprowadzono do ich komórek gen *AtCAX1* [21,27]. Mutanty tytoniu z nadekspresją aktywnej formy białka CAX1 wykazywały fenotypowe objawy niedoboru wapnia w komórkach, pomimo optymalnego stężenia Ca w podłożu. Ponieważ liczne badania wskazują na lokalizację białek CAX głównie w błonie tonoplastowej, sugeruje się, że transportery tej rodziny uczestniczą w procesach magazynowania wapnia w wakuoli [3,13,18].

Jednakże dalsze analizy funkcjonalne białek CAX, prowadzone w heterologicznych układach drożdżowych pokazały, że są to transportery o szerokim powinowactwie do różnych metali [13]. Wprowadzenie genów *CAX*, pochodzących od różnych roślin (*AtCAX2*, *AtCAX4*, *AtCAX5*, *LeCAX2*, *HvCAX2*, *OsCAX1-3*) do mutantów drożdżowych pozbawionych swoistych transporterów metali, przywracało mutantom zdolność do transportu Ca, Cd i/lub Mn, a tym samym oporność na nadmiar tych metali w środowisku [4,11,12]. Badania przeprowadzone na roślinach także wskazują na szeroką specyficzność substratową roślinnych białek CAX. Wykazano, że ekspresja genów kodujących transportery CAX2 i CAX4 u *A. thaliana* była stymulowana przy wysokim stężeniu Cd, Mn i/lub Ni, co sugerowało udział badanych białek w odpowiedzi rośliny na nadmiar metali w środowisku [25]. Otrzymane wyniki potwierdzono w trakcie analiz funkcjonalnych mutantów roślinnych z nadekspresją skróconych form genów *CAX* – *sCAX* (ang. *short CAX*), kodujących transportery pozbawione domeny autoinhibitorowej. Pokazano bowiem, że nadekspresja genów *Arabidopsis thaliana sCAX1-4* u tytoniu prowadziła do zwiększonej akumulacji Cd^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} i Mn^{2+} w pęcherzykach tonoplastowych izolowanych z korzeni tej rośliny [13,14,27]. Przytoczone badania wyraźnie wskazują na istotny udział transporterów CAX w transporcie różnych metali z cytoplazmy do wakuoli, co może mieć kluczowe znaczenie w determinowaniu oporności roślin na stres metali ciężkich. Jakkolwiek ostatnie doniesienia wskazują na udział transporterów CAX także w odpowiedzi roślin na stres chłodu i stres solny. Wykazano, że poziom transkryptu *AtCAX1* wyraźnie wzrastał po 24-godzinnym traktowaniu roślin temperaturą 4°C,

co istotnie korelowało ze znacznym podwyższeniem wrażliwości mutantów na niskie temperatury. Ekspresja genów *AtCAX1-4* była także istotnie stymulowana w obecności soli w środowisku [27].

Co ciekawe wykazano, że na poziomie molekularnym białka CAX oddziałują z innymi białkami błonowymi. U mutantu *cax1 Arabidopsis* zaobserwowano 50% redukcję aktywności antyportu wapniowego (H^+/Ca^{2+}) do wakuoli, co sugeruje, że transporter CAX1 jest głównym antyporterem Ca^{2+}/H^+ w tonoplaście [1,3]. Jednakże dodatkowym efektem mutacji genu *CAX1* był 40% spadek aktywności tonoplastowej V-ATPazy i 36% wzrost aktywności wakuolarnej Ca^{2+} -ATPazy. Także nadekspresja genów *CAX3* i *CAX4* u *Arabidopsis* powodowała redukcję aktywności wakuolarnych białek antyportera Mn^{2+}/H^+ i V-ATPazy. Choć funkcja transportera AtCAX3 nie jest do końca poznana, mutanty *cax3*, podobnie jak mutanty *cax1* i drożdżowe mutanty *zrc1p* (białko ZRC transportuje Cd, Co i Zn do wakuoli drożdży), wykazują znacznie zredukowaną aktywność wakuolarnej pompy protonowej [3,21,27,29]. Dlatego przypuszcza się, że delecja któregośkolwiek genu *CAX* zaburza biosyntezę poszczególnych podjednostek V-ATPazy, składanie funkcjonalnego multipodjednostkowego kompleksu pompy i wbudowywanie jej w tonoplast [1,27].

Dość liczne badania wskazują także na wzajemne interakcje pomiędzy transporterami CAX. Jak już wspomniano, analiza genomu *Arabidopsis thaliana* wykazała obecność sześciu genów kodujących typowe transportery CAX. Sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez te geny są podobne do siebie w różnym stopniu, przy czym białko CAX1 jest najbardziej zbliżone pod względem budowy do białka CAX3 (ryc. 2). Stosunkowo wysokie (75%) podobieństwo obydwu transporterów sugeruje, że AtCAX1 i AtCAX3 mogą spełniać analogiczne funkcje u *A. thaliana*. Badania wykazały że obydwa białka są zlokalizowane w tonoplaście rzodkiewnika, ale poziom ich syntezy w poszczególnych organach rośliny jest albo podobny, albo zróżnicowany [3,29]. W optymalnych warunkach środowiskowych najwyższy poziom ekspresji *AtCAX1* zaobserwowano w liściach, podczas gdy synteza AtCAX3 była najbardziej intensywna w korzeniach. Jednakże profil ekspresji obydwu genów pokrywał się, na skutek zadziałania określonych czynników zewnętrznych [3]. Analizy mutantów *Arabidopsis* niezdolnych do ekspresji jednego (*cax1*, *cax3*) lub obydwu (*cax1/cax3*) genów pokazały, że białka CAX1 i CAX3 mogą być ze sobą funkcjonalnie powiązane. Początkowe badania wykazały, że aktywny transport wapnia H^+/Ca^{2+} do wakuoli był 2-krotnie niższy u mutantu *cax1* niż u mutantów *cax3* i roślin dzikich [3]. Ponadto tylko mutant *cax1* charakteryzował się podwyższoną wrażliwością na wapń, co sugeruje, że w warunkach dużego stężenia tego metalu w środowisku jedynie CAX1 uczestniczy w jego aktywnej sekwestracji w wakuoli. Jednakże mutanty *cax1* i *cax3* prezentowały nieco inny fenotyp w porównaniu z roślinami *cax1/cax3*, niezdolnymi do syntezy obydwu białek CAX: podwójne mutanty swoim wyglądem przypominały rośliny uprawiane w warunkach niedoboru wapnia [3]. Badania ekspresji roślinnych *AtCAX1* i *AtCAX3* u mutantów drożdży nadwrażliwych na wapń potwierdziły wyniki otrzymane dla mutantów *Arabidopsis*. Tylko szczepy syntetyzujące AtCAX1 lub obydwa białka, AtCAX1 i AtCAX3, traciły

nadwrażliwość, przy czym efekt jednoczesnej ekspresji dwóch genów *CAX* w jednym szczepie był znacznie bardziej wyraźny [3]. Zaproponowano więc, że obydwa białka wpływają wzajemnie na swoje funkcje transportowe, co jest dosyć prawdopodobne, biorąc pod uwagę uwarunkowane środowiskowo podobieństwa profilu ekspresji tych transporterów u *Arabidopsis*. Wydaje się, że w określonych warunkach kompleks CAX1-CAX3 funkcjonuje jako heteromer, ale tylko w niektórych tkankach i organach, np. kwiatach, tkankach zarodków i naczyniach korzeni [3]. Ostateczne dowody na bezpośrednią interakcję typu białko-białko między transporterami CAX1 i CAX3 przedstawili niedawno Zhao i wsp. [29], wykazując obecność kompleksu CAX1-CAX3 w mikrosomach izolowanych z *Arabidopsis* i mutantów drożdżowych, w których zachodzi ekspresja obydwóch białek roślinnych. Co więcej, określono także warunki, w których obydwa geny kodujące białka ulegały ekspresji w tym samym czasie, w takich samych tkankach. Zaobserwowano na przykład, że poziom transkrypcji obydwu genów *CAX* był porównywalny w trakcie kiełkowania nasion. Co więcej, proces kiełkowania mutantów *Arabidopsis cax1*, *cax3* i *cax1/3* podlegał zmianom w wyniku egzogennie podawanych cukrów, litu, etylenu i ABA [29]. Nasiona mutantów *cax3* wykazywały większą wrażliwość na komórkowe zmiany stężenia cukru w porównaniu z nasionami mutantów *cax1*. Stwierdzono ponadto u tych roślin zahamowanie kiełkowania w obecności ABA i stymulację tego procesu w obecności kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (prekursor etylenu). Natomiast linie podwójnych mutantów *Arabidopsis cax1/cax3* wykazywały bardzo wyraźne zmiany fenotypowe m.in. w długości hypokotyła, w porównaniu z roślinami z pojedynczymi mutacjami. Prawdopodobnie transportery CAX1 i CAX3 spełniają ważną funkcję regulacji kiełkowania nasion przez ABA. Wydaje się więc, że obydwa transportery są niezbędne do prawidłowej odpowiedzi rośliny na wymienione czynniki i że funkcjonują jako heteromery [29].

Niewątpliwie pojedyncze białka CAX1 i CAX3 spełniają także specyficzne funkcje w trakcie wzrostu i rozwoju roślin, a co więcej, same mogą tworzyć homo-oligomery, co pokazano podczas heterologicznej ekspresji genów *CAX* fasoli w drożdżach. Sugeruje się, że wysoki poziom homo-oligomeru CAX3 w korzeniach roślin jest związany z odpowiedzią na stres solny i niskie pH, natomiast podobnym kompleksom CAX1 przypisuje się udział w tolerancji roślin na różne jony [26,29].

Do tej pory, zarówno u roślin, jak i zwierząt wykazano obecność kompleksów homo- i heteromerów spokrewnionych białek transportowych, które charakteryzowały się odmienną kinetyką transportu i pełniły nieco inne funkcje biologiczne niż budujące je pojedyncze transportery. Oligomeryzacja może być zatem traktowana jako kolejny mechanizm regulujący aktywność transporterów błonowych [29]. Zdolność do tworzenia kompleksów regulatorowych wykazano do tej pory m.in. dla roślinnych i zwierzęcych transporterów cukrowych, roślinnego białka ABC transportującego lipidy, drożdżowego antyportera Na^+/H^+ i transportera amonowego [15,21,27]. Oligomeryzacja transporterów *CAX*, jak i możliwość równoczesnego występowania w błonie zarówno pojedynczych białek tej rodziny, jak i ich złożonych kompleksów zwiększają zakres funkcji transportowej błon komórkowych, co ma szczególne znaczenie w

procesach adaptacji rośliny do stresów środowiskowych. Funkcjonalna asocjacja poszczególnych transporterów tej rodziny prawdopodobnie jest niezbędna w utrzymaniu stabilnej homeostazy jonowej w komórkach i prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin [3,29].

Obszerne analizy mutantów *Arabidopsis* pozbawionych genów *CAX* wykazały, że transportery tej rodziny najprawdopodobniej uczestniczą w utrzymaniu szeroko pojętej homeostazy kationowo-anionowej w komórkach roślinnych. Oznaczono akumulację Li^+ , B^+ , Na^+ , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , As^{3+} , Se^{2+} , Mo^{2+} , Cd^{2+} i Pb^{2+} u mutantów *cax1*, *cax3* i *cax1/cax3* rosnących w optymalnych warunkach [3]. W porównaniu z roślinami dzikimi nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian ilościowych w stężeniach jonów oznaczonych u mutantów *cax3*, podczas gdy mutanty *cax1* akumulowały mniej Zn^{2+} i Mn^{2+} . Natomiast, u podwójnych mutantów *cax1/cax3* cechujących się znacznie zahamowanym wzrostem, zanotowano istotnie większy poziom PO_4^{3-} , Mn^{2+} i Zn^{2+} (odpowiednio o 66%, 50% i 38%) oraz mniejsze stężenie Ca^{2+} i Mg^{2+} (odpowiednio o 17% i 16%) w stosunku do roślin dzikich [2,27].

Takie radykalne zmiany fenotypowe w połączeniu ze zmienionym endogennym poziomem jonów obserwowane u podwójnych mutantów *cax1/cax3 Arabidopsis* wskazują na złożone zależności pomiędzy funkcją poszczególnych transporterów CAX i zawartością składników mineralnych oraz pierwiastków balastowych w roślinach. Różnice w profilach jonowych mutantów mogą wynikać bezpośrednio ze zmian w aktywności wakuolarnych transporterów CAX albo pośrednio, ze zmiany aktywności V-ATPazy lub innych transporterów błonowych [3].

Dotychczasowe badania wyraźnie pokazują, że złożone funkcje białek typu CAX warunkują prawidłowy rozwój i wzrost roślin. Profil organowej ekspresji genów *CAX* analizowano dotąd głównie u *Arabidopsis thaliana*, gdzie wykazano, że wszystkie geny tej rodziny ulegają ekspresji na różnych etapach ontogenezy rośliny: w nasionach, podczas kiełkowania, na etapie siewek i dorosłych roślin i w końcu, w organach generatywnych. Wysoką ekspresję genu *AtCAX1* stwierdzono głównie w liściach oraz w pędach siewek i dorosłych roślin, podczas gdy transkrypt genu *AtCAX3* był obecny tylko w korzeniach. Z kolei gen *VCAX1* u *Vigna radiata*, który jest homologiem genu *AtCAX1*, ulegał ekspresji tylko w korzeniach roślin. Znaczną ekspresję wszystkich genów *CAX* zaobserwowano natomiast w kwiatostanach *Arabidopsis*. Pomimo iż profil ekspresji genów *AtCAX1* i *AtCAX3* nie pokrywa się u dorosłych roślin, obydwa geny ulegają równoczesnej ekspresji podczas kiełkowania nasion i w trakcie wczesnego rozwoju siewek [3].

Jak już wspomniano, białka CAX należą do licznej rodziny transporterów wakuolarnych. Stosunkowo wysokie podobieństwo w sekwencji aminokwasowej (40–75%) poszczególnych przedstawicieli tej rodziny może sugerować, że antyportery CAX pełnią podobne funkcje. Ponadto, przy braku aktywności jednego z białek tej rodziny, pozostałe antyportery CAX mogą go funkcjonalnie zastępować [27].

4. PRAKTYCZNY ASPEKT WYKORZYSTANIA WŁAŚCIWOŚCI FIZJOLOGICZNYCH TRANSPORTERÓW CAX

Dotychczas zidentyfikowane roślinne białka CAX występują przede wszystkim w tonoplacie. Wakuola jako kompartment spełniający rolę magazynu rozmaitych substancji dzięki temu, że ma w swojej błonie zarówno antyportery CAX, jak i pompy wapniowe, aktywnie uczestniczy w akumulacji wapnia. Genetyczne manipulacje zmierzające do zwiększenia intensywności procesów magazynowania wapnia w wakuolach roślinnych mogą doprowadzić do uzyskania modyfikowanych roślin uprawnych, stanowiących bogate źródło tego pierwiastka w diecie człowieka [27].

O zawartości wapnia w organizmie człowieka decyduje przede wszystkim jego podaż z pożywieniem. Podstawowym źródłem wapnia w przeciętnej diecie europejskiej i amerykańskiej (USA) jest mleko i jego przetwory. Ocenia się, że produkty te dostarczają blisko 80% tego składnika [22]. Produkty pochodzenia roślinnego są gorszym źródłem tego pierwiastka ze względu na obecność substancji utrudniających jego wchłanianie. W celu podwyższenia zawartości wapnia przyswajalnego dla człowieka, a zarazem zminimalizowania jego niedoboru w diecie, niektóre rośliny uprawne transformowano poprzez wprowadzenie skróconej formy genów *CAX*, pozbawionej domeny autoinhibitorowej (*sCAX*) [22,27]. Ekspresja genu *sCAX1* u ziemniaka, pomidora i marchwi spowodowała wzrost zawartości wapnia w jadalnych częściach roślin oraz podwyższoną sekwestrację tego pierwiastka w centralnej wakuoli [24]. Transformacja marchwi i ziemniaków nie powodowała redukcji plonów, natomiast w przypadku pomidora zaobserwowano zaburzenia we wzroście i w rozwoju. Podobnych zaburzeń nie obserwowano natomiast u transformowanych innym genem typu *CAX* – *CAX4* roślin pomidora, które także akumulowały znacznie więcej wapnia niż rośliny dzikie. Zarówno u myszy, jak i u ludzi, którym podawano transformowane rośliny, stwierdzono ponad 40% wzrost absorpcji wapnia [24,27].

Jak już wcześniej wspomniano, transportery CAX mogą wykazywać stosunkowo szeroką specyficzność substratową. Potencjalnie więc nadekspresja tych białek może wzbogacać rośliny uprawne w inne składniki odżywcze, bowiem pośredniczą one w transporcie Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} [3,24]. Poza tym rośliny z podwyższoną ekspresją genów *CAX* można wykorzystać do usuwania metali ciężkich z zanieczyszczonej gleby. Stwierdzono bowiem, że modyfikowane rośliny w równym stopniu mogą akumulować kadm i wapń. Nadekspresja różnych *CAX Arabidopsis* u tytoniu powodowała zwiększoną akumulację wielu metali w wakuolach tej rośliny. Stwierdzono, że białka rzodkiewnika aktywnie transportowały do wakuoli transformowanego tytoniu metale ciężkie, takie jak Cd czy Mn [13,14]. Zatem białka CAX mogą być wykorzystane nie tylko do wzbogacania roślin uprawnych w niezbędne mikroelementy i Ca, ale również w procesie tzw. fitoremediacji, czyli oczyszczania gleb z metali ciężkich [27].

Wszystkie potencjalne manipulacje genetyczne, wykorzystujące geny tej rodziny, powinny być poprzedzone gruntownym poznaniem struktur i mechanizmów decydujących o specyficzności substratowej i regulacji poszczególnych transporterów CAX u roślin.

LITERATURA

- [1] BARKLA BJ, HIRSCHI KD, PITTMAN JK. Exchangers man the pumps: functional interplay between proton pumps and proton-coupled Ca^{2+} exchangers. *Plant Sign Behav* 2008; **3**: 354–356.
- [2] BRADSHAW HD jr. Mutations in CAX1 produce phenotypes characteristic of plants tolerant to serpentine soil. *New Phytol* 2005; **167**: 81–88.
- [3] CHENG NH, PITTMAN JK, SHIGAKI T, LACHMANSINGH J, LECLERE S, LAHNER B, SALT DE, HIRSCHI KD. Functional association of *Arabidopsis* CAX1 and CAX3 is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol* 2005; **138**: 2048–2060.
- [4] EDMOND C, SHIGAKI T, EWERT S, NELSON M, CONNORTON J, CHALOVA V, NOORDALLY Z, PITTMAN JK. Comparative analysis of CAX2-like cation transporters indicates functional and regulatory diversity. *J Biochem* 2009; **418**: 145–154.
- [5] GAXIOLA RA, PALMGREN MG, SCHUMACHER K. Plant proton pump. *FEBS Letter* 2007; **581**: 2204–2214.
- [6] HALL JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Review article of J Exp Bot* 2002; **53**: 1–11.
- [7] <http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de>
- [8] <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>
- [9] <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>
- [10] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [11] KAMIYA T, AKAHORI T, MAESHIMA M. Expression profile of the genes for rice cation/ H^+ exchanger and functional analysis in yeast. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1735–1740.
- [12] KAMIYA T, AKAHORI T, MAESHIMA M. Expression of the vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchange, OsCAX1a, in rice: Cell and age specificity of expression, and enhancement by Ca^{2+} . *Plant Cell Physiol* 2005; **47**: 96–106.
- [13] KOREN'KOV V, HIRSCHI K, CRUTCHFIELD JD, WAGNER GJ. Enhancing tonoplast Cd/H antiporter activity increase Cd, Zn and Mn tolerance, and impact root/shoot Cd partitioning in *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 2007; **226**: 1379–1387.
- [14] KOREN'KOV V, PARK S, CHENG NH, SREEVIDYA C, LACHMANSINGH J, MORRIS J, HIRSCHI K, WAGNER GJ. Enhanced Cd^{2+} -selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing *Arabidopsis* cation exchangers. *Planta* 2007; **225**: 403–411.
- [15] LOQUE D, LALONDE S, LOOGER LL, VON WIREN N, FROMMER WB. A cytosolic transactivation domain essential for ammonium uptake. *Nature* 2007; **446**: 195–198.
- [16] MAESHIMA M. Tonoplast transporters: organization and function. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 469–497.
- [17] MARTINOIA E, MAESHIMA M, NEUHAUS HE. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J Exp Bot* 2007; **58**: 83–102.
- [18] MCAINSH MR, PITTMAN JK. Shaping the calcium signature. *New Phytol* 2009; **181**: 275–294.
- [19] MIGOCKA M. Rola pierwotnych pomp metalowych (PIB-ATPaz) w utrzymaniu homeostazy metali ciężkich w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 657–666.
- [20] MIGOCKA M, NOWOJSKA E, KŁOBUS G. Wtórne transportery metali ciężkich u roślin. *Post Biochem* 2007; **53**(3): 272–279.
- [21] MITSUI K, YASUI H., NAKAMURA N, KANAZAWA H. Oligomerization of the *Saccharomyces cerevisiae* Na^+/H^+ antiporter Nha1p: implications for its antiporter activity. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1720**: 125–136.
- [22] MORRIS J, HAWTHORNE KM., HOTZE T, ABRAMS SS, HIRSCHI KD. Nutrition impact of elevated calcium transport activity in carrots. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 1431–1435.
- [23] MORRIS J, TIAN H, PARK S, SREEVIDYA CS, WARD JM, HIRSCHI KD. AtCCX3 is an *Arabidopsis* endomembrane H^+ -dependent K^+ -transporter. *Plant Physiol* 2008; **148**: 1474–1486.
- [24] PARK S, CHENG N, PITTMAN JK, YOO KS, PARK J, SMITH RH, HIRSCHI KD. Increased calcium levels and prolonged shelf life in tomatoes expressing *Arabidopsis* $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ transporters. *Plant Physiol* 2005; **139**: 1194–1206.
- [25] PITTMAN JK, SHIGAKI T, MARSHALL JL, MORRIS JL, CHENG NH, HIRSCHI KD. Functional and regulatory analysis of the *Arabidopsis thaliana* CAX2 cation transporter. *Plant Mol Biol* 2004; **56**: 959–971.

- [26] PITTMAN JK, SHIGAKI T, HIRSCHI KD. Evidence of different pH regulation of *Arabidopsis* vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporters CAX1 and CAX2. *FEBS Letters* 2005; 2648–2656.
- [27] SHIGAKI T, HIRSCHI KD. Diverse function and molecular properties emerging for CAX cation/ H^{+} exchangers in plants. *Plant Biology* 2006; 8: 419–429.
- [28] SHIGAKI T, REES I, NAKHLEH L, HIRSCHI KD. Identification of tree distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporter. *J Mol Evol* 2006; 63: 815–825.
- [29] ZHAO J, BARKLA BJ, MARSHALL J, PITTMAN JK, HIRSCHI KD. The *Arabidopsis cax3* mutants display altered salt tolerance, pH sensitivity and reduced plasma membrane H^{+} -ATPase activity. *Planta* 2008; 227: 659–669.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 26.06. 2009 r.

Przyjęto: 18.08. 2009 r.

Mgr Anna Papierniak

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

E-mail: anna.papierniak@biol.uni.wroc.pl