

# CHARAKTERYSTYKA EUKARIOTYCZNYCH REDUKTAZ ARSENIANOWYCH Z NADRODZINY RODANAZ

CHARACTERIZATION OF EUKARYOTIC ARSENATE  
REDUCTASES OF RHODANESE SUPERFAMILY

Małgorzata NOWICKA, Katarzyna MIZIO,  
Ewa MACIASZCZYK-DZIUBIŃSKA

Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej,  
Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

*Streszczenie:* Arsen jest pierwiastkiem powszechnie występującym w środowisku. Zanieczyszczenia gleb i wód pochodzenia naturalnego, jak i antropogenicznego, występujące w wielu krajach stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia i życia milionów ludzi. Związki arsenu są silnie toksyczne dla organizmów żywych, a ich obecność może powodować szereg negatywnych efektów zdrowotnych. Arsen z uwagi na właściwości cytotoksyczne znalazł również szerokie zastosowanie w terapiach przeciwpasożytniczych czy przeciwnowotworowych.

Arseniany są jedną z najczęstszych form nieorganicznego arsenu znajdujących w wodzie pitnej. Wnikają do komórek z bardzo dużą wydajnością poprzez transportery specyficzne dla fosforanów, na zasadzie mimikry molekularnej. Gdy As(V) wniknie do komórki musi najpierw zostać zredukowany do As(III), aby mogło dojść do kolejnych, niezbędnych etapów jego detoksyfikacji i usuwania z komórki. Białka z podrodziny ACR2 są najlepiej poznanymi reduktazami arsenianowymi. Należą one do nadrodziny rodanaz i posiadają konserwatywny motyw C(X)<sub>5</sub>R. Do tej pory scharakteryzowano dziesięć eukariotycznych reduktaz ACR2, jednak wciąż odkrywane są kolejne białka wykazujące właściwości redukujące arseniany.

Dokładne poznanie i scharakteryzowanie wszystkich białek biorących udział w procesie redukcji arsenianów przyczyni się do powstania skuteczniejszych terapii przeciwpasożytniczych, antynowotworowych oraz do zminimalizowania negatywnych skutków ostrych i przewlekłych zatruc arsenem lub innymi metalami i metaloidami. Wiedza ta może być również wykorzystana do stworzenia roślin transgenicznych akumulujących mniejsze ilości tego pierwiastka, co ostatecznie mogłoby zmniejszyć podaż arsenu wraz z dostarczaniem pożywieniem.

*Słowa kluczowe:* arsen, toksyczność, reduktazy arsenianowe, rodanazy

*Summary:* Arsenic is an abundant environmental element. Soil and water arsenic contamination of both natural and anthropogenic origin is present in many countries. It poses a threat to health and

lives of millions of people. Arsenic compounds are highly toxic to organisms and may lead to serious health problems. Due to its cytotoxic properties, arsenic is widely used in antiprotozoan and anticancer therapies.

Arsenate is one of the most prevalent inorganic arsenic species found in drinking water. It enters the cell via phosphate transporters, using molecular mimicry. In order to be extruded out of the cell or to enter other detoxification pathways, arsenate must be reduced to arsenite.

ACR2 proteins are the most studied arsenate reductases. They belong to rhodanese superfamily and contain a conserved HC(X)<sub>3</sub>R motif. Thus far, ten eukaryotic arsenate reductases has been characterized. Nonetheless, more proteins with arsenate reductase activity are being discovered.

Characterization of all proteins participating in arsenate reduction pathways will contribute to the development of more effective drug therapies and reducing negative consequences of arsenic and other metalloid or metal poisonings. It might also be applied in engineering transgenic plants accumulating lower quantities of arsenic, thus reducing arsenic supply in crops.

*Keywords:* arsenic, toxicity, arsenate reductase, rhodanese

## WSTĘP

Arsen jest toksycznym pierwiastkiem, który występuje naturalnie w skorupie ziemskiej oraz ma szerokie zastosowanie w przemyśle. Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Nowotworami (IARC) arsen klasyfikowany jest w pierwszej grupie czynników o właściwościach kancerogennych [29]. Główną drogą ekspozycji na arsen jest woda pitna oraz skażony pokarm. Długotrwała ekspozycja na arsen w zależności od dawki, źródła, czasu i drogi ekspozycji może prowadzić do zmian chorobowych, w tym nowotworzenia, w obrębie skóry, układu pokarmowego, układu krążenia, układu oddechowego, układu endokrynnego, układu moczowo-płciowego i układu nerwowego [54]. Każdego dnia ponad 140 mln ludzi może pić wodę zawierającą arsen w ilości większej niż 10 ppb, co jest przyjęte za graniczną, bezpieczną ilość arsenu w wodzie pitnej [55].

Nieorganiczne związki arsenu są również wykorzystywane w medycynie. Arsen długo stosowany był w leczeniu trypanosomatozy (śpiączki afrykańskiej) przed wprowadzeniem eflornityny. Obecnie wykorzystuje się go w nowoczesnych terapiach przeciwnowotworowych, przy leczeniu m.in. ostrej białaczki promielocytowej [2, 19]. Niestety w wielu przypadkach, w wyniku powstania niewyjaśnionej do tej pory oporności komórek nowotworowych na arsen, terapia przeciwnowotworowa z wykorzystaniem arsenu bywa nieskuteczna [84]. Stanowi to poważny problem, ze względu na brak alternatywnych metod leczenia. Stąd tak ważne jest poznanie i zrozumienie molekularnych mechanizmów leżących u podstaw oporności komórek eukariotycznych na arsen. Co więcej, istotne jest wyjaśnienie podstaw toksyczności arsenu ze względu na dużą szkodliwość i liczbę ludzi narażonych na jego długotrwałe działanie.

Naturalnie arsen może występować na czterech stopniach utlenienia: -3, 0, +3 i +5. Najczęściej występującymi formami w środowisku i organizmach żywych są związki na +3 i +5 stopniu utlenienia. Formy trójwartościowe są bardziej toksyczne i dominują w środowiskach beztlenowych o właściwościach redukujących, jak np. skały czy muł rzeczny. Formy pięciowartościowe są mniej toksyczne dla komórek. Występują głównie w warunkach tlenowych, jak wody powierzchniowe czy gleba. W środowisku wodnym, o neutralnym pH As(V) występuje głównie w postaci oksyanionu  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  [60].

W komórkach organizmów żywych nieorganiczne związki arsenu mogą ulegać biotransformacji do form organicznych poprzez tworzenie kompleksów z glutationem lub metylację. Dodatkowo mogą wchodzić w skład biologicznie czynnych cząsteczek i tworzyć ich arsenowe pochodne (np. arsenocholina, arsenobetaina, arsenolipidy), które mogą być wbudowywane w struktury komórki lub być włączane w szlaki metaboliczne, zakłócając lub całkowicie blokując ich funkcjonowanie [76, 85].

Arsen był obecny w środowisku od początków życia na ziemi, stworzyło to silną presję selekcyjną na wytworzenie mechanizmów umożliwiających detoksyfikację komórek. Początkowo dominującą formą arsenu w środowisku był As(III), względem którego pierwotne komórki wykształciły różnorodne metody detoksyfikacji polegające na ograniczeniu wnikania czy zwiększeniu wydajności usuwania As(III) z komórek lub biotransformacji do mniej toksycznych form. Pojawienie się fotosyntetyzujących cyjanobakterii około 2.5 mld lat temu spowodowało zmianę charakteru środowiska na bardziej utleniające [51]. W wyniku czego przeważającą formą arsenu w środowisku stał się As(V). Większość organizmów, by przetrwać, wykształciła zdolność redukcji As(V) do bardziej toksycznego As(III), by w następnych etapach wykorzystać istniejące już szlaki detoksyfikacji As(III). Obecnie znany jest tylko jeden organizm (*Pseudomonas aeruginosa*), który wykształcił odrębny szlak detoksyfikacji As(V), w którym nie dochodzi do powstawania As(III) [13].

Enzymy zaangażowane w redukcję As(V) zazwyczaj współdziałają z elementami systemów redukujących grupy sulfonowe i wiązania dwusiarczkowe w komórce. W większości komórek, w tym w komórkach eukariotycznych, poziom redoks utrzymywany jest z wykorzystaniem glutationu, glutaredoksyny oraz reduktazy glutationu. Niektóre bakterie gram-dodatnie, jak *Staphylococcus aureus*, nie produkują glutationu. Homeostaza redoks w tych komórkach utrzymywana jest przez produkcję zredukowanej formy koenzymu A (CoA), którego pula odnawiana jest przez reduktazy CoA zależne od NADPH. Dodatkowo, obecny jest system redukcji mostków dwusiarczkowych, również zależny od NADPH, oparty na tioredoksynie (TRX) i reduktazie tioredoksyny. System ten występuje również u innych prokariotów i eukariotów [53].

Najlepiej poznanymi prokariotycznymi reduktazami arsenianowymi są białka ArsC obecne na plazmidzie R773 *Escherichia coli*, wykorzystujące glutation i glu-

taredoksynę [26] oraz ArsC wyizolowane z plazmidu pI258 *Staphylococcus aureus*, wykorzystujące tioredoksynę i reduktazę tioredoksyny w procesie redukcji As(V) [30, 40]. W komórkach eukariotycznych geny reduktaz zlokalizowane są w genomie jądrowym i wykorzystują glutaredoksynę oraz glutation jako pierwotnego donora elektronów, podobnie jak w przypadku R773 ArsC *E. coli* [43, 46].

## WIĘKSZOŚĆ REDUKTAZ ARSENIANOWYCH NALEŻY DO NADRODZINY RODANAZ

Pierwsze białko z rodziny rodanaz zostało opisane w 1933 r. Był to enzym TST klasyfikowany jako sulfotransferaza tiosiarczynu, zaangażowany między innymi w detoksyfikację cyjanku w tkankach ssaczych, katalizując powstanie mniej toksycznego związku tiocyjanianowego(SCN<sup>-</sup>). W wyniku tej reakcji powstaje tiocyjanian, nazywany również rodankiem, stąd grupę enzymów przeprowadzających przeniesienie grup tiolowych nazwano rodanazami [16].

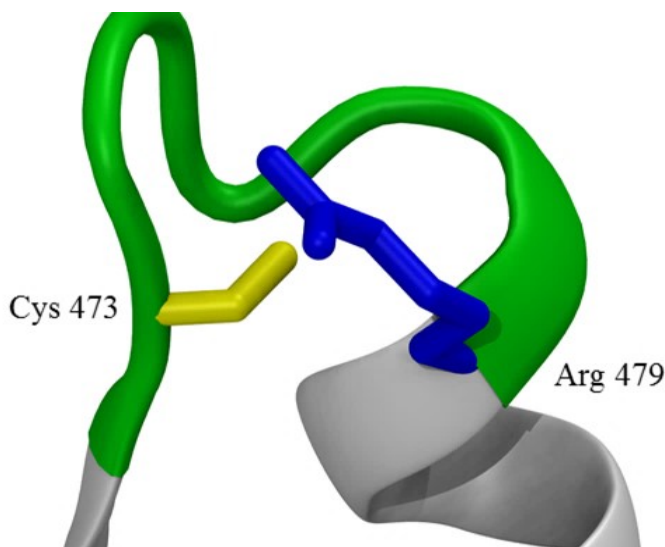
Białka należące do nadrodziny rodanaz powszechnie występują u eukariotów, prokariotów oraz archeonów. Wykazują odmienne funkcje biologiczne a ich budowa jest wysoce heterogenna, o niskim stopniu homologii. Wyjątek stanowi motyw rodanazowy, który jest wśród nich wysoce konserwatywny, a jego najbardziej zachowaną częścią jest motyw pętli aktywnej z katalityczną resztą cysteinową, która bierze udział w reakcji podwójnej wymiany, poprzez bezpośrednie wiązanie atomu siarki [8].

Ogólną reakcję katalizowaną przez rodanazy można podzielić na dwa etapy. W pierwszym – siarka jest przenoszona z tiosiarczynowego związku donorowego na cysteinę znajdującą się w pętli aktywnej, z powstaniem formy pośredniej – sulfanylo cysteiny (Cys-SSH). W drugim etapie przyłączona wcześniej siarka zostaje przeniesiona na tiofilowy akceptor – jon cyjankowy (CN<sup>-</sup>) w celu zregenerowania aktywności enzymu. W wyniku tej reakcji powstaje związek tiocyjanowy (SCN<sup>-</sup>) oraz związek z grupą siarczynową (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) [34, 35].

Istnieje kilka metod klasyfikacji białek zawierających motyw rodanazowy, np. w zależności od właściwości katalitycznych białek lub od struktury i rozproszenia domen rodanazowych w białkach.

Białka o właściwościach fosfatazowych, posiadające domenę rodanazową, tworzą nadrodzinę CC3 (ang. *Cysteine-based Class III*, inaczej rodanaz), w której wyróżnia się tylko jedną rodzinę CDC25 z 2 podrodzinaми: CDC25 – w skład której wchodzi jedynie białka CDC25 o właściwościach fosfatazowych oraz podrodzinę ACR2 – do której należą białka o aktywności reduktazy arsenianowej, wśród których część wykazuje dodatkową aktywność fosfatazową [14].

Odmienny sposób klasyfikacji pomija funkcję białek i bierze pod uwagę ilość domen rodanazowych w białku oraz budowę i strukturę pętli aktywnej. W klasyfikacji tej pojedyncze białko może posiadać kilka domen rodanazowych ułożonych tandemowo lub rozproszonych lub posiadać domeny niezwiązane ewolucyjnie [15]. Stąd w nadrodzinie rodanaz wyróżnia się 4 podrodziny: białka jednodomenowe, białka o tandemowym ułożeniu domen, białka wielodomenowe oraz białka z wydłużoną pętlą aktywną. Białka z pierwszych trzech wymienionych podrodziny zaangażowane są w reakcje wykorzystujące siarkę, gdzie między innymi biorą udział w transferze siarki między różnorodnymi cząsteczkami [16]. Białka z podrodziny o wydłużonej pętli aktywnej, posiadają motyw  $C(X)_5R$ , gdzie C oznacza katalityczną resztę cysteinową, reszty X tworzą pętlę wiążącą substrat, a R oznacza konserwatywną resztę argininową. Dzięki większej, 7 aminokwasowej, kieszeni wiążącej substrat mogą wiązać fosfor lub chemicznie podobny arsen, o większym niż siarka promieniu van der Waals'a. Białka o krótszej pętli, posiadające motyw  $C(X)_4R$ , mogą wchodzić w interakcje z atomami siarki i selenu, a według doniesień zespołu Sanchez-Bermejo, również arsenu [8, 27, 59].



**RYCINA 1.** Struktura domeny katalitycznej ludzkiego białka CDC25B (PBD: 1QB0). Kolorem zielonym oznaczono reszty aminokwasowe wchodzące w skład pętli aktywnej, kolorem żółtym oznaczono łańcuch boczny katalitycznej reszty cysteinowej, a kolorem niebieskim oznaczono łańcuch boczny konserwatywnej reszty argininowej

**FIGURE 1.** Crystal structure of human CDC25B catalytic domain (PBD: 1QB0). Active site loop residues are coloured green, catalytic cysteine side chain is coloured yellow and conserved arginine is coloured blue

ScACR2	59	GLSDTFSSSQFVK	II	HCTG	KNR	KV	AKFETY	QEEDI	---	TSKFESC	II	VGGFYA
CrACR2.1	64	IA-----	GKAEMV	VVHCFM	SQQRG	PRCAMA	LARRLEAME	--	QPLS	PI	POVFL	RGGF
CrACR2.2	74	QI-----	AGAEQV	VVHCFH	SKV	RGPTCA	FALNERL	KALGL	---	DNA	PE	VKVL
PpACR2	61	EV-----	KNKETV	VVFHCAF	SQVRG	PTCARK	LSSEHL	LNAKTE	GKIEK	VPSI	VLER	GENG
PvACR2	62	KI-----	EGQEA	VVLHCF	SKSOH	SGPAC	ANKLVE	HLATL	LSKKE	IEAA	POVY	LKEG
AtACR2	61	NV-----	KDKD	TVVFHCF	ALSKV	RGPTCA	RRLVNY	LDEKED	---	TG	KNIM	L
OsACR2.1	60	AT-----	GDKD	TVVFHCF	ALSKV	RGPS	CAQMF	S	YL	SETKEE	---	SGTK
OsACR2.2	59	AT-----	KGKET	TVVFHCF	ALSKV	RGPS	CAQMYL	YL	SEADED	---	SD	VKNIM
LmACR2	166	FE-----	EKKEL	AVFHC	AQSLV	RAPKGA	NRFALA	--	QKK	---	LGYV	L
HsCDC25B	476	SI-----	DKRVI	LIFHCF	ESSER	GPRMCF	FTIRER	DRAVN	-	DYPS	LYP	PEMY

**RYCINA 2.** Przyrównanie sekwencji motywów HC(X)<sub>5</sub>R w homologach ACR2; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Cr – *Chlamydomonas reinhardtii*; Pp – *Physcomitrella patens*; Pv – *Pteris vittata*; At – *Arabidopsis thaliana*; Os – *Oryza sativa*; Lm – *Leishmania major*; Hs – *Homo sapiens*

**FIGURE 2.** Alignment of HC(X)<sub>5</sub>R motif of ACR2 homologues; Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; Cr – *Chlamydomonas reinhardtii*; Pp – *Physcomitrella patens*; Pv – *Pteris vittata*; At – *Arabidopsis thaliana*; Os – *Oryza sativa*; Lm – *Leishmania major*; Hs – *Homo sapiens*

U eukariotów scharakteryzowano wiele reduktaz arsenianowych należących do podrodziny ACR2 o motywie C(X)<sub>5</sub>R. Są to między innymi: ScAcr2 u drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* [7, 44], LmACR2 z pasożytniczego wiciowca *Leishmania major* [83], AtACR2 z *Arabidopsis thaliana* [5], OsACR2 z ryżu siewnego *Oryza sativa* [21], HlACR2 z byliny *Holcus lanatus* [5] oraz PvACR2 z paproci *Pteris vittata* [22].

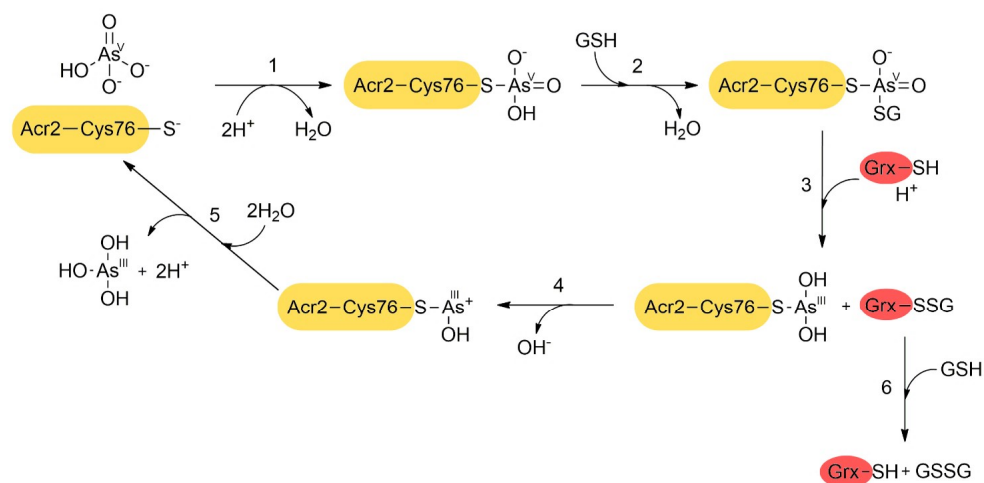
## PIERWSZA REDUKTAZA ACR2 ZOSTAŁA ZIDENTYFIKOWANA U DROŹDŹY *S. CEREVISIAE*

U drożdży *S. cerevisiae* za oporność na nieorganiczne związki arsenu odpowiedzialne są produkty genów *ACR1*, *ACR2* oraz *ACR3*. Po raz pierwszy zostały one wyizolowane, z wykorzystaniem plazmidów wysokokopijnych, których obecność w komórkach, znacznie podniosła oporność na As(III) i As(V) [7]. Gen *ScACR1* koduje czynnik transkrypcyjny Yap8, który w obecności As(III) lub Sb(III) aktywuje ekspresję genów *ScACR2* i *ScACR3* znajdujących się pod wspólnym promotorem [6, 7, 73]. Gen *ScACR2* koduje cytoplazmatyczną reduktazę As(V) [44, 46], a gen *ScACR3* koduje błonowy antyporter As(III)/H<sup>+</sup> oraz Sb(III)/H<sup>+</sup> umożliwiający wpływ As(III) i Sb(III) z komórki drożdżowej [37, 38, 72].

Białko Acr2 *S. cerevisiae* jest pierwszą i jedyną do tej pory opisaną reduktazą arsenianową w tych komórkach. Gen *ScACR2* zlokalizowany jest na krótszym ramieniu chromosomu XVI, w pobliżu sekwencji telomerowej. Gen ten koduje białko ScAcr2 o masie 16 kDa, składające się ze 130 aminokwasów, które izolowane jest jako homodimer o masie 34 kDa. Występują w nim trzy reszty cysteinowe, ale tylko

Cys76 wraz z Arg82 wchodzi w skład motywu C(X)<sub>5</sub>R. Właściwości katalityczne Cys76 potwierdzono poprzez jej substytucję na resztę alaninową lub serynową, w wyniku czego komórki ekspresjonujące tak zmodyfikowane białko wykazywały fenotyp o zwiększonej wrażliwości na As(V). Udowodniono również, że reszta Arg82 jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania białka. Wprowadzenie mutacji R82A powodowało inaktywację enzymu, a komórki wykazywały większą wrażliwość na pięciwartościowe związki arsenu [45].

Aktywność reduktazową białka *ScAcr2* potwierdzono również *in vitro* poprzez wyizolowanie natywnego białka *ScAcr2*, a następnie inkubację w obecności 100 mM Na<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub>, GSH oraz *ScGrx*. W tym badaniu redukcja As(V) była mierzona pośrednio, poprzez monitorowanie wzrostu ilości utlenionych form NADPH, gdzie poziom utlenionych form NADPH zwiększa się w czasie wskutek redukcji GSSG.



**RYCINA 3.** Mechanizm redukcji As(V) katalizowany przez *ScAcr2*. (1) Do zredukowanej Cys76 białka *Acr2* przyłącza się częściowo zdysocjowany kwas arsenowy(V) ( $\text{HAsO}_4^{2-}$ ) poprzez wiązanie kowalencyjne. (2) W miejsce grupy hydroksylowej kwasu arsenowego(V) przyłącza się glutation. (3) Glutaredoksyna ( $\text{Grx-SH}$ ) wiąże, wcześniej przyłączoną, resztę glutationu powodując redukcję As(V) do As(III) oraz dochodzi do uwolnienia kompleksu  $\text{Grx-S-SG}$ . (4) Powstaje monohydroksylova forma przejściowa kwasu arsenowego(III). (5) Dochodzi do uwolnienia kwasu arsenowego(III) i zregenerowania zredukowanej formy *Acr2*. (6) Kompleks  $\text{Grx-S-SG}$  redukowany jest z udziałem GSH w wyniku czego dochodzi do regeneracji  $\text{Grx-SH}$  oraz powstania GSSG [40, 46]

**FIGURE 3.** *Acr2*-dependent As(V) reduction mechanism. (1)  $\text{HAsO}_4^{2-}$  binds covalently to reduced Cys76 residue of *Acr2*. (2) Hydroxyl group is displaced by glutathione. (3) Glutaredoxin ( $\text{Grx-SH}$ ) binds previously attached glutathione residue, resulting in As(V) to As(III) reduction and  $\text{Grx-S-SG}$  complex release. (4) Intermediate monohydroxylated form of arsenite is formed. (5) Arsenite is released and reduced form of *Acr2* regenerated. (6)  $\text{Grx-S-SG}$  complex is reduced by GSH, resulting in  $\text{Grx-SH}$  regeneration and GSSG formation [40, 46]

Z kolei powstawanie GSSG jest bezpośrednio związane z procesem redukcji As(V) katalizowanym przez *ScAcr2*. Wyniki uzyskane przez zespół Mukhopadhyay potwierdzają funkcję *ScAcr2* jako reduktazy As(V) oraz wskazują, że do redukcji As(V) przez *ScAcr2* niezbędna jest obecność glutaredoksyny oraz GSH [46].

Do komórek *S. cerevisiae* As(V) może wnikać z wykorzystaniem transporterów fosforanowych o wysokim i niskim powinowactwie, takich jak Pho84 i Pho87 [52, 79]. W związku z czym, wewnątrzkomórkowe stężenie As(V) może osiągać znacznie wyższe wartości niż stężenie zewnątrzkomórkowe. Nie dziwi więc fakt, iż *ScAcr2* wykazuje małe powinowactwo do As(V), zaczynające się dopiero przy stężeniu 30mM, a pomimo tego jest w stanie wydajnie pełnić swoje funkcje w komórce [46].

*ScAcr2* pomimo tej samej funkcji i podobnych mechanizmów działania co reduktazy bakteryjne wykazuje jedynie znikomy stopień homologii sekwencji, względem obu klas bakteryjnych reduktaz ArsC. Co więcej, R773 ArsC z *E. coli* jest monomerem, który wykazuje klasyczną kinetykę reakcji enzymatycznej, w którym szybkość reakcji enzymatycznej zależy jedynie od stężenia substratu. Z kolei *ScAcr2* jest homodimerem, a kinetyka jego reakcji wykazuje pozytywną kooperatywność typową dla białek multimerycznych. Fakty te przemawiają za hipotezą, iż enzymy te powstały niezależnie od siebie na drodze konwergencji [40, 46].

Co ciekawe, heterologiczna ekspresja R773 ArsC z *E. coli* w komórkach *S. cerevisiae* pozbawionych genu *ScACR2* komplementowała fenotyp wrażliwości na As(V). Ponadto, ekspresja *ScACR2* w komórkach *E. coli* bez R773 ArsC jest również w stanie przywrócić oporność komórek na As(V). Mimo, że *ScAcr2* i R773 ArsC są enzymami niespokrewnionymi ewolucyjnie, to kofaktory obecne w komórkach bakteryjnych i drożdżowych umożliwiają ich prawidłowe funkcjonowanie podczas heterologicznej ekspresji [46].

Choć *ScAcr2* posiada miejsce katalityczne  $^{76}\text{C-TGSKN-R}^{82}$ , podobne do ludzkich fosfataz tyrozynowych Cdc25A/B [23], nie wykazuje aktywności fosfatazy. Wynika to z braku motywu bogatego w reszty glicynowe GXGXXG odpowiedzialnego za wiązanie fosforanów. Mutageneza ukierunkowana w białku *ScAcr2* trzech reszt aminokwasowych S79G, N81G, P84G doprowadziła do powstania białka *ScAcr2* posiadającego motyw bogaty w glicynę  $^{76}\text{C-TGGKG-R-GG}^{84}$ . Białko to uzyskało aktywność fosfatazy tyrozynowej oraz straciło zdolność do redukcji As(V). Co więcej, As(V) inhibował aktywność fosfatazową zmutowanego białka. Jest to dowód na możliwą ewolucję eukariotycznych reduktaz As(V) z fosfataz tyrozynowych, w wyniku presji ewolucyjnej związanej z pojawieniem się w środowisku arsenu na piątym stopniu utlenienia, w następstwie wzbogacenia się atmosfery ziemskiej w tlen [51, 47].

Istnieje hipoteza, że *Acr2* nie pełni funkcji reduktazy As(V), bądź też nie jest jedyną reduktazą arsenianową obecną w komórkach drożdży *S. cerevisiae*. Wskazuje na to fakt, że As(V) jest wydajnie redukowany do As(III) w szczepach z de-



lecją *ScACR2* [36], a mimo to komórki są znacznie bardziej wrażliwe na As(V) w porównaniu do typu dzikiego [44]. Możliwe, że *ScAcr2* pełni funkcję reduktazy tylko w określonych kompartmentach komórkowych chroniąc zachodzące w nich procesy metaboliczne przed działaniem As(V). Innym wyjaśnieniem może być udział *ScAcr2* przy formowaniu kompleksów As(III) z grupami tiolowymi, takich jak As(III)GS<sub>3</sub>, w wyniku czego dochodziłoby do zwiększenia tolerancji komórek na arsen [36].

W komórkach drożdży rozsziepkowych *Schizosaccharomyces pombe* nie znaleziono odpowiednika genu *ACR2* z *S. cerevisiae*. W tych komórkach może dochodzić do redukcji As(V) z udziałem fosfatazy *SpCdc25*, która wykazuje homologię do *ScAcr2* oraz fosfataz *Cdc25* obecnych u ludzi czy ryżu siewnego [57]. Do tej pory nie dowiedziono, by którakolwiek z fosfataz obecnych w komórkach *S. cerevisiae* posiadała aktywność redukującą As(V), np. białko *ScYch1* nie posiada właściwości redukujących As(V), a delecja genu fosfatazy *ScYCH1* nie wpływa na wrażliwość komórek na As(V) [46].

## REDUKTAZY ARSENIANOWE U ROŚLIN

Obecnie coraz poważniejszy staje się problem zanieczyszczenia gleb i wód odpadami postprodukcyjnymi zawierającymi metale ciężkie i metaloidy, tj. arsen, antymon, kadm czy ołów. Intensywnie poszukuje się sposobów na remediację skażonych gruntów. Jednym ze sposobów może być wykorzystanie gatunków roślin wykazujących zdolność do wzrostu w środowisku zanieczyszczonym metaloidami i metalami ciężkimi, określanymi jako metalofity, bądź hiperakumulatory. Poznanie szlaków asymilacji i detoksyfikacji metaloidów i metali ciężkich pozwoli na konstrukcję modyfikowanych roślin, w tym uprawnych, które będą gromadzić w tkankach jeszcze większe stężenia szkodliwych substancji lub takich, które będą akumulowały toksyny w mniejszych ilościach, co ograniczy ostateczną podaż tych związków dostarczanych wraz z pożywieniem [61].

Szlaki detoksyfikacji arsenu w komórkach roślinnych są dobrze poznane i wykazują duże podobieństwo między gatunkami oraz ze szlakami obecnymi u *S. cerevisiae*. Dla przykładu reduktazy *ACR2* z *A. thaliana* i *O. sativa* wykazują aktywność fosfatazową, natomiast *ACR2* z *P. vittata* takiej aktywności nie posiada [22, 77].

As(V) jest transportowany do komórek rośliny przez transportery fosforanowe z rodziny PHT o wysokim powinowactwie dzięki molekularnemu podobieństwu do fosforanów. Są to głównie AtPHT1;1 i AtPHT1;4 u *A. thaliana* [65, 66], PvPHT1;3 u *P. vittata* [20] i OsPHT1;8 u *O. sativa* [70, 71]. Kluczową rolę PHT we wnikanii As(V) do komórek roślinnych potwierdza delecja OsPHT1;8, która zmniejsza ilość pobieranego As(V) o 33-57% oraz znacząco zwiększa tolerancję *O. sativa* na As(V) [70].

W komórce As(V) jest redukowany do As(III) przez reduktazy arsenianowe. Większość roślin posiada wysoki poziom aktywności endogennych reduktaz arsenianowych, mogących zredukować ponad 95% pobranego As(V). Powstały As(III) jest wysoce reaktywny i łatwo tworzy kompleksy z grupami tiolowymi. W większości roślin formy As(III) są magazynowane w korzeniach. Jest to mechanizm chroniący przed dotarciem związków arsenu do wiązek przewodzących a wraz z nimi do liści i części generatywnych rośliny, gdzie mógłby wpływać na wydajność fotosyntezy [1] oraz wywoływać stres oksydacyjny [69]. Mechanizm enzymatycznej redukcji As(V) do As(III) jest więc kluczowym etapem uniemożliwiającym transport związków arsenu do tkanek nadziemnych [18].

Zahamowanie procesu redukcji As(V) w komórkach roślin prowadzi do kilkukrotnego wzrostu ilości akumulowanego arsenu w tkankach. Istotnie wzrasta też ilość arsenu zgromadzonego w częściach nadziemnych roślin, co umożliwia bardziej wydajne usuwanie arsenu ze środowiska podczas zbioru tych części roślin. Możliwe, że w przyszłości tak zmodyfikowane rośliny będą wykorzystywane w fitoremediacji gleb skażonych arsenem [18, 48, 59]. Z kolei zwiększenie aktywności endogennych reduktaz As(V) może wpłynąć na zmniejszenie ilości arsenu akumulowanego w roślinach i transportowanego do części nadziemnych. Proces ten można wykorzystać do zmniejszenia ilości arsenu akumulowanego w pedzie i ziarnach roślin jadalnych, takich jak ryż siewny [64, 74].

## DWIE ODMIENNE REDUKTAZY U *A. THALIANA*

*Arabidopsis thaliana* jest roślinnym organizmem modelowym ze względu na mały, dobrze poznany genom oraz względnie krótki cykl życiowy. Dlatego powszechnie wykorzystywana jest w badaniach podstawowych w biologii komórki i biologii molekularnej roślin.

W komórkach *A. thaliana* obecnie wyróżnia się dwie reduktazy arsenianowe ACR2 oraz HAC1. Gen *AtACR2* jest zlokalizowany na chromosomie V i składa się z 3 egzonów, koduje 146 aminokwasowe białko AtACR2 o masie 14.5 kDa. AtACR2 wykazuje 33% identyczności i 42% podobieństwa do *ScAcr2*, posiada również charakterystyczny dla rodanaz motyw aminokwasowy C(X)<sub>5</sub>R [18, 49].

AtACR2 wykazuje *in vitro* aktywność fosfatazy tyrozynowej i przypuszcza się, że może brać u *A. thaliana* udział w regulacji cyklu komórkowego [33]. Mutant *A. thaliana* pozbawiony genu *ACR2* (*acr2*) jest bardziej wrażliwy na hydroksymocznik (czynnik wywołujący stres replikacyjny) niż rośliny typu dzikiego [68]. Z kolei heterologiczna ekspresja *AtACR2* u *S. pombe* prowadzi do zmniejszenia rozmiaru komórek z powodu zwiększenia szybkości podziałów mitotycznych [67]. Jednakże nie obserwuje się różnic fenotypowych w warunkach kontrolnych między roślinami z delecją lub nadekspresją genu *AtACR2* a roślinami typu dzikiego [18, 36, 48]. Co ciekawe, białko fuzyjne AtACR2-Gfp lokalizuje

się w mitochondriach [50]. Lokalizacja ta zdaje się pozostawać w sprzeczności z możliwym zaangażowaniem AtACR2 w regulację cyklu komórkowego.

Główną postulowaną funkcją AtACR2 jest redukcja As(V) do As(III) z udziałem Cys136 i Cys145 [49]. Zdolność do redukcji As(V) przez AtACR2 w ostatnich latach poddawana jest jednak w wątpliwość, mimo to zdecydowana większość badań potwierdza aktywność reduktazową AtACR2 [18, 22, 36, 48]. Za właściwościami redukującymi As(V) AtACR2 przemawiają badania zespołu Dhankher, podczas których wyciszono ekspresję *AtACR2* z wykorzystaniem RNAi, w wyniku czego doszło do 5-6 krotnego zmniejszenia świeżej masy roślin rosnących na podłożu z As(V) w porównaniu do roślin typu dzikiego. Ekspresja heterologiczna *AtACR2* w komórkach *E. coli* pozbawionych *ArsC* prowadziła do komplementacji fenotypu wrażliwości komórek bakterii na As(V) [18]. Z kolei badania zespołu Liu wskazują na brak właściwości redukujących As(V) przez białko AtACR2. W badaniu stworzono linie mutantów insercyjnych T-DNA *A. thaliana* z wyłączonym genem *acr2* oraz linię nadekspresjonującą *AtACR2*. W liniach insercyjnych nie zaobserwowano zmniejszenia poziomu redukcji As(V), ani zmian ilościowych w pobieraniu As(V) do komórek czy wypływu As(III) z komórek. Nadekspresja *AtACR2* nie miała wpływu na ilość As(III) magazynowanego w roślinach. Wszystkie pomiary ilości arsenu w roślinach dokonywano po maksymalnie 1 tygodniu inkubacji roślin z As(V) w podłożu. Co więcej, mutacja ani nadekspresja *AtACR2* nie miały wpływu na długość korzeni roślin hodowanych na podłożu z As(V) [36]. Wykorzystanie odmiennych metod tworzenia linii *A. thaliana* pozbawionych aktywności AtACR2 przez obi egrupy może tłumaczyć rozbieżność w wynikach. Z uwagi na to, że *AtACR2* i *AtHAC1* wykazują podobieństwo sekwencji w regionie, który został użyty do wyciszenia ekspresji *AtACR2* przez zespół Dhankher możliwe, że wykorzystane RNAi nie tylko wyciszały ekspresję *AtACR2*, ale również *AtHAC1*. Tłumaczyłoby to fenotyp wrażliwości na As(V) roślin obserwowany przez zespół Dhankher [58]. Zespół Liu nie odniósł się, ani nie powtórzył wyników heterologicznej ekspresji *AtACR2* w komórkach *E. coli* pozbawionych *ArsC*, gdzie roślina reduktaza ACR2 komplementowała fenotyp wrażliwości na As(V).

Wyniki grupy Liu pokazują, że po 1 tygodniowej inkubacji mutantów insercyjnych *acr2 A. thaliana* ze 100mM As(V) ilość całkowitego akumulowanego arsenu w liniach mutantów jest taka sama jak w roślinach typu dzikiego. Może to dowodzić braku właściwości redukujących As(V) przez produkt genu *AtACR2*, a w konsekwencji braku akumulacji arsenu w komórkach *A. thaliana*. Grupa Nahar powtórzyła i potwierdziła wyniki grupy Liu z 2012 roku, ale również wskazała, że przy dłuższym, 3 tygodniowym, okresie inkubacji mutantów *acr2* ze 100mM As(V) całkowita ilość zakumulowanego arsenu w zmutowanej linii jest 3-krotnie większa niż w roślinach typu dzikiego. Co wskazuje na aktywność reduktazową AtACR2 oraz

wpływ na akumulację arsenu w komórkach *A. thaliana* i jest podstawą do twierdzenia, że białko AtACR2 posiada właściwości reduktazy arsenianowej [36, 48].

W 2014 r. badanie asocjacyjne całego genomu (GWAS) *A. thaliana* wskazało na istnienie nieznanego wcześniej białka HAC1 o aktywności reduktazy arsenianowej. Białko AtHAC1 należy do nadrodziny rodanaz, ale nie do podrodziny ACR2, ponieważ posiada krótszy motyw pętli aktywnej C(X)<sub>4</sub>R oraz wykazuje większe podobieństwo w budowie do sulfotransferaz niż do białek z podrodziny ACR2. AtHAC1 zbudowane jest ze 169 aminokwasów oraz wykazuje 46% identyczności i 62% podobieństwa do białka AtSTR16 o aktywności sulfotransferazy tiosiarczanu, a względem AtACR2 wykazuje jedynie 16% identyczności i 33.7% podobieństwa [12, 59].

Najwyższy poziom ekspresji *AtHAC1* obserwowany jest w korzeniach, a białko w fuzji z Gfp lokalizuje się cytoplazmatycznie i jądrowo. *In vitro* AtHAC1 wykazuje aktywność reduktazy arsenianowej o parametrach podobnych do wcześniej zidentyfikowanych eukariotycznych reduktaz arsenianowych. Mutant insercyjny T-DNA *hac1* wykazuje zwiększoną wrażliwość na As(V) oraz akumuluje znacznie większą ilość arsenu w korzeniach i pędzie. Wnioskować z tego można, że redukcja As(V) z udziałem AtHAC1 w korzeniach ogranicza ilość arsenu ładowanego do ksylemu i transportowanego do pędu. Heterologiczna ekspresja *AtHAC1* w komórkach *E. coli* pozbawionych endogennej reduktazy ArsC, przywraca komórkom fenotyp oporności na As(V). Co więcej dowiedziono, że między AtHAC1 i AtACR2 nie występują interakcje epistatyczne, co może sugerować ich odmienny mechanizm działania lub zaangażowanie w różne szlaki metaboliczne [12, 59].

### REDUKTAZY ARSENIANIOWE U *ORYZA SATIVA*

Genom ryżu *O. sativa* zawiera dwa homologii ACR2: *OsACR2.1* i *OsACR2.2*. Obie sekwencje kodują białka zdolne do redukcji As(V). Badania wykazały, że heterologiczna ekspresja *OsACR2.1* komplementuje wrażliwy na arsen fenotyp szczepów  $\Delta arsC$  *E. coli* oraz *acr2* $\Delta$  *S. cerevisiae*, choć *OsACR2.2* w znacznie mniejszym stopniu. Co ciekawe, oczyszczone *OsACR.1* i *OsACR2.2* charakteryzują się nie tylko aktywnością reduktazową, ale również fosfatazową. Ponadto, mutageneza reszty cysteinowej w motywie HC(X)<sub>5</sub>R doprowadziła do niemal całkowitej utraty aktywności reduktazy arsenianowej i fosfatazy [21].

Ekspresja obydwu genów w *O. sativa* zachodzi na niskim poziomie, w tym *OsACR2.2* jedynie w korzeniach. Po ekspozycji na As(V) ekspresja *OsACR2.1* w pędach i korzeniach silnie wzrasta, *OsACR2.2* wzrasta w korzeniach, ale w mniejszym stopniu [21]. Regulacja ekspresji arsenem występuje również w przypadku *ScACR2* [38]. Warto też wspomnieć, że niewielki wzrost ekspresji w stresie As(V) zaobserwowano u *AtACR2* [66].

*O. sativa* posiada przynajmniej 12 homologów omawianej już reduktazy arsenianowej AtHAC, z których funkcje trzech zostały opisane: OsHAC1;1, OsHAC1;2 oraz OsHAC4. Ekspresja *OsHAC1;1* i *OsHAC1;2* komplementuje wrażliwy na arsen fenotyp  $\Delta arsC$  *E. coli*, a oba enzymy wykazują aktywność reduktazy arseniano-

wej. Ekspozycja roślin na As(V) znacząco zwiększa ekspresję obu genów. Ponadto delecja *OsHAC1;1* lub *OsHAC1;2* zmniejsza redukcję As(V) do As(III) w korzeniach, zmniejszając tym samym wyrzut As(III) do medium, przy jednoczesnym wzroście akumulacji arsenu w korzeniach. Z kolei nadekspresja każdego z genów zwiększała wyrzut As(III) do medium i tolerancję na As(V) [64].

OsHAC4 zwrócił uwagę badaczy podczas poszukiwania mutantów hiperwrażliwych na As(V). Wykazuje duże podobieństwo w sekwencji aminokwasowej z OsHAC1;1 (89%) i OsHAC1;2 (81%), a białko fuzyjne OsHAC4-eGFP ekspresjonowane w komórkach liści tytoniu *Nicotiana benthamiana* lokalizowało się w cytoplazmie oraz na terenie jądra [74], podobnie jak AtHAC1 [59]. *OsHAC4* ekspresjonowany heterologicznie w  $\Delta arsC$  *E. coli*, komplementuje wrażliwy na arsen fenotyp i wykazuje aktywność reduktazową na poziomie podobnym do OsHAC1;1. W *O. sativa* ulega wysokiej ekspresji w korzeniach i jest indukowany As(V). Co więcej, nadekspresja *OsHAC4* zwiększa tolerancję na As(V) i jednocześnie zmniejsza akumulację arsenu w tkankach [74]. Wyniki te wskazują na kluczową rolę badanych homologów AtHAC1 w mechanizmach redukcji As(V) i detoksyfikacji komórek *O. sativa*.

### EKSPRESJA ACR2 W HIPERAKUMULATORACH

*Pteris vittata* jest gatunkiem paproci będącym hiperakumulatorem arsenowym. Może tolerować stężenia arsenu do 1500 mg\*kg<sup>-1</sup> w glebie [63] i jest w stanie akumulować nawet do 19,300 ppm [80]. U gatunku tego zidentyfikowano dwie reduktazy arsenianowe ACR2: PvACR2 oraz Pv2.5-8. Ulegają one konstytutywnej ekspresji w liściach, korzeniach i gametofitach i do redukcji wykorzystują glutation [11]. Co ciekawe, poziom mRNA *ACR2* i *Pv2.5-8* zwiększa się w korzeniach traktowanych arsenem, ale nie w liściach. Różnice te nie przekładają się jednak na poziom produktów białkowych.

PvACR2 (134 aa) dzieli 25% identyczności i 47% podobieństwa z ScAcr2. PvACR2 jest jedynym homologiem ACR2, w którym w miejscu konserwatywnej reszty argininowej w motywie HC(X)<sub>5</sub>R występuje reszta serynowa. Heterologiczna ekspresja *PvACR2* w komórkach drożdżowego szczepu delecyjnego *acr2Δ* komplementuje fenotyp wrażliwości na As(V). Oczyszczone PvACR2 wykazuje aktywność reduktazy arsenianowej, ale nie fosfatazy [22].

Masa wyizolowanego Pv2.5-8 wynosi około 34.55 kDa i jest dużo mniejsza niż masa przewidywana na podstawie sekwencji nukleotydowej (45 kDa). Być może Pv2.5-8 ulega modyfikacjom potranslacyjnym. Co ciekawe, w elektroforze dwukierunkowej (2-DE) Pv2.5-8 migruje w postaci sześciu prążków z pI w zakresie od 8.3 do 8.9 [11].

Warto dodać, że PvACR2 i Pv2.5-8 nie są jedynymi opisanymi reduktazami arsenianowymi u *Pteris vittata*. PvGSTF1 to S-transferaza glutationu, która *in vitro* wykazuje aktywność reduktazową [10], a jej ekspresja w *E. coli* komplementuje wrażliwy na As(V) fenotyp szczepu  $\Delta arsC$  [32].

## REDUKTAZY ARSENIANOWE U MCHÓW I ZIELENIC

Reduktaza As(V) została również zidentyfikowana u modelowego gatunku mchów – *Physcomitrella patens*. *P. patens* może zakumulować aż do 565,4 mg As/kg suchej masy [78], co może być związane z adaptacją do życia w warunkach ekspozycji na metaloidy, ponieważ mszaki występują powszechnie w środowiskach, gdzie obecny jest nieorganiczny arsen.

Białko PpACR2 zbudowane jest ze 134 reszt aminokwasowych i wykazuje 39% podobieństwa do CrACR2 i 41% do AtACR2. Heterologiczna ekspresja PpACR2 w szczepie *E. coli*  $\Delta$ arsC nadaje komórkom zdolność do redukcji As(V). Ponadto, aktywność reduktazy zaobserwowano przez wzrost utleniania NADPH w obecności oczyszczonego białka PpACR2 i GSH, glutaredoksyny-2 i As(V), co odzwierciedla redukcję As(V) do As(III) [78].

*Chlamydomonas reinhardtii* to gatunek jednokomórkowych zielenic, u których redukcja As(V) pełni ważną rolę w detoksyfikacji. Zidentyfikowano u niego dwa homologii ACR2: CrACR2.1 (135 aa) i CrACR2.2 (147 aa). Białka te dzielą odpowiednio 27,46% i 25% podobieństwa z OsACR2. Ekspresja obu genów, w pozbawionym reduktazy szczepie *E. coli*  $\Delta$ arsC, zwiększa jego oporność na As(V), przy czym CrACR2.2 tylko przy niskim stężeniu arseninu. Ponadto,  $\Delta$ arsC ekspresjonujący CrACR2.1 i CrACR2.2 wykazuje aktywność reduktazową [77].

## LmACR2 BIERZE UDZIAŁ W AKTYWACJI PENTOSTAMU

Leiszmanioza to pasożytnicza choroba wywoływana przez wiciowce z rodzaju *Leishmania*. Pentostam i glucantime stosowane w terapii przeciw leiszmaniozie zawierają pięciowartościowy antymon, który w celu przejścia do aktywnej formy leku musi ulec redukcji do formy trójwartościowej. Za aktywację leku przynajmniej częściowo odpowiada należąca do rodziny ACR2 reduktaza LmACR2 [83].

Ekspresja LmAcr2 komplementuje fenotyp wrażliwości na As(V) szczepu *S. cerevisiae* z delecją genu *ScACR2*, a także w szczepie *E. coli*  $\Delta$ arsC. LmACR2 do aktywności reduktazowej wymaga obecności GSH i glutaredoksyny. Redukuje zarówno Sb(V) ( $K_m=7\mu M$ ), jak i As(V) ( $K_m=6mM$ ), przy czym proces jest ten zdecydowanie wydajniejszy dla Sb(V) [83].

Białko LmACR2 jest zbudowane ze 127 reszt aminokwasowych. Wykazuje 28% identyczności i 44% podobieństwa do białka ScAcr2. Oba homologii posiadają motyw FHC(X)<sub>5</sub>R [45, 83]. Analiza mutacyjna wykazała, że również w LmACR2 motyw HC(X)<sub>5</sub>R jest odpowiedzialny za aktywność katalityczną [82]. W odróżnieniu od homodimerskiego ScAcr2, LmACR2 jest białkiem monomerycznym [83].

LmAcr2 oprócz właściwości redukujących, posiada aktywność fosfatazy tyrozynowej. Oczyszczony enzym *in vitro* wykazuje zdolność do defosforylacji reszt ty-

rozynowych syntetycznego peptydu LCK<sub>50</sub> [82]. Co ciekawe, *Leishmania* w swoim cyklu życiowym nie jest narażona na bezpośrednie działanie As(V) czy Sb(V), które mogłyby wyrzucić presję ewolucyjną na *LmACR2*. Główną funkcją enzymu wydaje się być raczej defosforylacja substratów. Pozostawałoby to w zgodzie z koncepcją ewolucji eukariotycznych reduktaz z fosfataz tyrozynowych [42, 47].

## LUDZKIE FOSFATAZY CDC25 WYKAZUJĄ AKTYWNOŚĆ REDUKTAZOWĄ

Kompleksy CDK są kluczowymi regulatorami cyklu komórkowego i są inhibowane przez fosforylację dwóch reszt aminokwasowych znajdujących się w pętli wiążącej ATP (Thr14 i Tyr15 CDK1), przez kinazy WEE1 i MYT113. Fosfatazy Cdc25 aktywują kompleksy CDK właśnie przez defosforylację tych dwóch reszt, umożliwiając tym samym progres cyklu komórkowego. Stąd nadekspresja Cdc25A i Cdc25B jest często spotykana w wielu nowotworach [9]

Katalityczna domena ludzkiej fosfatazy Cdc25 dzieli homologię z reduktazami ACR2 (**Ryc.2**). Razem należą do nadrodziny rodanaz/Cdc25 i posiadają motyw C(X)<sub>5</sub>R. Zidentyfikowano trzy izoformy Cdc25: Cdc25A, Cdc25B i Cdc25C. Domeny katalityczne Cdc25 wykazują aktywność fosfatazową, ale co ciekawe – u Cdc25B i Cdc25C obserwuje się również aktywność reduktazy arsenianowej. Substytucja reszty cysteinowej lub argininowej w motywie C(X)<sub>5</sub>R skutkuje utratą aktywności fosfatazowej [75], ale także reduktazowej [4].

Struktury krystaliczne Cdc25A [23] i Cdc25B [56] oraz *LmACR2* [42] zostały rozwiązane. Ich porównanie wykazało, że konformacja pętli zawierającej miejsce aktywne *LmACR2* jest podobna do konformacji domeny katalitycznej enzymów Cdc25 i każda z nich zawiera motyw C(X)<sub>5</sub>R [4].

## PODSUMOWANIE

Związki arsenu występują powszechnie w wodzie i glebie stwarzając poważne zagrożenie dla ludzi, zwierząt i roślin. Szacuje się że miliony osób na całym świecie mogą być wystawione na długotrwałą ekspozycję na związki arsenu, co może prowadzić do nowotworzenia lub nawet ostrych zatruc arsenem. Dokładne poznanie białek umożliwiających wnikanie, procesowanie i usuwanie arsenu z komórek jest niezbędne do powstania skutecznych terapii antynowotworowych z wykorzystaniem związków arsenu oraz do rozwoju bardziej skutecznych terapii przy zatruciach arsenem. Możliwe jest również wykorzystanie obecnej wiedzy przy projektowaniu roślin transgenicznych, które w zależności od potrzeby byłyby w stanie akumulować mniejsze lub znacznie większe ilości arsenu w swoich tkankach.

Jednym z głównych mechanizmów toksyczności arsenu jest wywołanie stresu oksydacyjnego. W komórkach powstaje przede wszystkim znaczna ilość reaktywnych form tlenu i azotu, prawdopodobnie w wyniku zastępowania fosforu przez arsen w białkach i substratach zaangażowanych w oddychanie komórkowe. Dodatkowo, dochodzi do zmniejszenia ilości GSH względem GSSG w komórkach wskutek wykorzystywania GSH w procesie redukcji As(V) oraz w czasie formowania koniugatów As(GS)<sub>3</sub> [24].

W trakcie leczenia pacjentów zatrutych arsenem, często stosuje się związki chelatujące jony metali, które dzięki obecności grup tiolowych w ich strukturze są w stanie wiązać jony arsenu, unieczynniając je, dzięki czemu mogą zostać usunięte przez nerki wraz moczem. Obecność grup tiolowych może również przyczyniać się do zmniejszania ilości reaktywnych form tlenu i azotu w komórkach. Przy zatruciach arsenem podaje się głównie DMPS (kwas 2,3-dimerkapto-1-propanosulfonowy), ale również stosuje się dimerkaprol i DMSA (kwas 2,3-dimerkaptobursztynowy) chociaż są one bardziej toksyczne i mniej skuteczne niż DMPS. Obecnie intensywne badania prowadzone są również nad izoamylową pochodną DMSA, MiADMSA, która ze względu na większą lipofilowość miałaby lepiej przenikać przez barierę krew-mózg [25]

Badania wskazują że podawanie naturalnych lub sztucznych antyoksydantów również może zmniejszać stres oksydacyjny wywołany arsenem. Przebadane zostały między innymi kwas askorbinowy (wit. C),  $\alpha$ - tokoferol (wit. B), ryboflawina (wit. B2) [31, 81],  $\beta$ -karoten [28], tauryna [24], kwercetyna, kwas liponowy [3] czy N-acetylocysteina (NAC) [17]. Dodatkowo zastosowanie terapii kombinowanej z wykorzystaniem witaminy C oraz DMSA na modelu szczurzym, dało lepsze efekty terapeutyczne niż monoterapie [41]. W przyszłości terapie kombinowane wykorzystujące zarówno chelatory, jak i antyoksydanty mogą być najskuteczniejszą formą leczenia przewlekłych i ostrych zatruc arsenem.

Antymon pięciowartościowy jest składnikiem najczęściej stosowanych leków w terapii przeciw leiszmaniozie (Pentostam, Glucantime). W celu aktywacji musi zostać zredukowany do wysoce toksycznej formy trójwartościowej. Do redukcji zachodzi zarówno w zarażonych postacią amastigota makrofagach, jak i komórkach *Leishmania*. Sb(V) jest pobierany przez makrofagi zarażone amastigota. Następnie część pobranego Sb(V) ulega redukcji do Sb(III) i jest transportowana do amastigota przez AQP1. Pozostały niezredukowany Sb(V) jest również pobierany przez amastigota i następnie zredukowany do Sb(III) przez *LmACR2* [83]. Ponadto, podatność na Sb(V) związana jest z poziomem aktywności reduktazowej *Leishmania* [62]. Niestety gatunki *Leishmania* wykazują różną wrażliwość na Sb(III), co może być związane z odmienną regulacją ekspresji genów uczestniczących w ścieżce aktywacji leków, np. AQP1 [39]. Szersze zbadanie tych mechanizmów pozwoli w przyszłości na opracowanie skuteczniejszych terapii.



## PODZIĘKOWANIA

Artykuł finansowany z „Subwencja 2020 – Działalność Badawcza (501) – Nauki Biologiczne (73) (Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki)”

## LITERATURA

- [1] AZIZUR RAHMAN M, HASEGAWA H, MAHFUZUR RAHMAN M, NAZRUL ISLAM M, MAJID MIAH MA, TASMEN A. Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oryza sativa* L.) varieties in Bangladesh. *Chemosphere* 2007; **67**: 1072-1079.
- [2] AZNAB M, REZAEI M. Induction, consolidation, and maintenance therapies with arsenic as a single agent for acute promyelocytic leukaemia in a 11-year follow-up. *Hematological Oncology* 2017; **35**: 113-117.
- [3] BHATT K, FLORA SJS. Oral co-administration of  $\alpha$ -lipoic acid, quercetin and captopril prevents gallium arsenide toxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009; **28**: 140-146.
- [4] BHATTACHARJEE H, SHENG J, AJEES AA, MUKHOPADHYAY R, ROSEN BP. Adventitious arsenate reductase activity of the catalytic domain of the human Cdc25B and Cdc25C phosphatases. *Biochemistry* 2010; **49**: 802-809.
- [5] BLEEKER PM, HAKVOORT HWJ, BLIEK M, SOUER E, SCHAT H. Enhanced arsenate reduction by a CD-C25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *Plant J* 2006; **45**: 917-929.
- [6] BOBROWICZ P, ULASZEWSKI S. Arsenical – induced transcriptional activation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 and ACR3 genes requires the presence of the ACR1 gene product. *Cellular and Molecular Biology Letters* 1998; 1.03.
- [7] BOBROWICZ P, WYSOCKI R, OWSIANIK G, GOFFEAU A, ULASZEWSKI S. Isolation of three contiguous genes, ACR1, ACR2 and ACR3, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1997; **13**: 819-828.
- [8] BORDO D, BORK P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep* 2002; **3**: 741-746.
- [9] BOUTROS R, LOBJOIS V, DUCOMMUN B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 495-507.
- [10] CAI C, LANMAN NA, WITHERS KA et al. Three Genes Define a Bacterial-Like Arsenic Tolerance Mechanism in the Arsenic Hyperaccumulating Fern *Pteris vittata*. *Curr Biol* 2019; **29**: 1625-1633.e3.
- [11] CESARO P, CATTANEO C, BONA E, BERTA G, CAVALETTO M. The arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* expresses two arsenate reductases. *Sci Rep* 2015; **5**: 14525.
- [12] CHAO D-Y, CHEN Y, CHEN J et al. Genome-wide association mapping identifies a new arsenate reductase enzyme critical for limiting arsenic accumulation in plants. *PLoS Biol* 2014; **12**: e1002009.
- [13] CHEN J, YOSHINAGA M, GARBINSKI LD, ROSEN BP. Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. *Mol Microbiol* 2016; **100**: 945-953.
- [14] CHEN MJ, DIXON JE, MANNING G. Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal* 2017; **10**: 474.
- [15] CIPOLLONE R, ASCENZI P, TOMAO P, IMPERI F, VISCA P. Enzymatic detoxification of cyanide: clues from *Pseudomonas aeruginosa* Rhodanese. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008; **15**: 199-211.
- [16] CIPOLLONE R, ASCENZI P, VISCA P. Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life* 2007; **59**: 51-59.

- [17] CRINELLI R, ZARA C, SMETANA M, RETINI M, MAGNANI M, FRATERNALE A. Boosting GSH Using the Co-Drug Approach: I-152, a Conjugate of N-acetyl-cysteine and  $\beta$ -mercaptoethylamine. *Nutrients* 2019; **11**: 1291.
- [18] DHANKHER OP, ROSEN BP, MCKINNEY EC, MEAGHER RB. Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of Arabidopsis silenced for arsenate reductase (ACR2). *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 5413-5418.
- [19] DILDA PJ, HOGG PJ. Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev* 2007; **33**: 542-564.
- [20] DiTUSA SF, FONTENOT EB, WALLACE RW et al. A member of the Phosphate transporter 1 (Pht1) family from the arsenic-hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is a high-affinity arsenate transporter. *New Phytol* 2016; **209**: 762-772.
- [21] DUAN G-L, ZHOU Y, TONG Y-P, MUKHOPADHYAY R, ROSEN BP, ZHU Y-G. A CDC25 homologue from rice functions as an arsenate reductase. *New Phytol* 2007; **174**: 311-321.
- [22] ELLIS DR, GUMAEIUS L, INDRIOLO E, PICKERING IJ, BANKS JA, SALT DE. A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant Physiol* 2006; **141**: 1544-1554.
- [23] FAUMAN EB, COGSWELL JP, LOVEJOY B et al. Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* 1998; **93**: 617-625.
- [24] FLORA SJS. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic Biol Med* 2011; **51**: 257-281.
- [25] FLORA SJS. Preventive and Therapeutic Strategies for Acute and Chronic Human Arsenic Exposure. *Arsenic in Drinking Water and Food*. Singapore: Springer, 2020; 341-370.
- [26] GLADYSHEVA TB, ODEN KL, ROSEN BP. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry* 1994; **33**: 7288-7293.
- [27] HOFMANN K, BUCHER P, KAJAVA AV. A model of Cdc25 phosphatase catalytic domain and Cdk-interaction surface based on the presence of a rhodanese homology domain. *J Mol Biol* 1998; **282**: 195-208.
- [28] HSUEH YM, CHIOU HY, HUANG YL et al. Serum beta-carotene level, arsenic methylation capability, and incidence of skin cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; **6**: 589-596.
- [29] IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISK TO HUMANS. Arsenic and arsenic compounds. *Arsenic, Metals, Fibres and Dusts*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012; 1-526.
- [30] Ji G, SILVER S. Reduction of arsenate to arsenite by the ArsC protein of the arsenic resistance operon of *Staphylococcus aureus* plasmid p1258. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 9474-9478.
- [31] KADIRVEL R, SUNDARAM K, MANI S, SAMUEL S, ELANGO N, PANNEERSELVAM C. Supplementation of ascorbic acid and alpha-tocopherol prevents arsenic-induced protein oxidation and DNA damage induced by arsenic in rats. *Hum Exp Toxicol* 2007; **26**: 939-946.
- [32] KHAN AA, ELLIS DR, HUANG X et al. Glutathione-S-transferase from the arsenic hyperaccumulator fern *Pteris vittata* can confer increased arsenate resistance in *Escherichia coli*. *BioRxiv* 2018; **1**: 379511.
- [33] LANDRIEU I, HASSAN S, SAUTY M et al. Characterization of the Arabidopsis thaliana Arath; CDC25 dual-specificity tyrosine phosphatase. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; **322**: 734-739.
- [34] LEININGER KR, WESTLEY J. The Mechanism of the Rhodanese-catalyzed Thiosulfate-Cyanide Reaction THERMODYNAMIC AND ACTIVATION PARAMETERS. *Journal of Biological Chemistry* 1968; **243**: 1892-1899.
- [35] LIBIAD M, MOTL N, AKEY DL et al. Thiosulfate sulfurtransferase-like domain-containing 1 protein interacts with thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 2018; **293**: 2675-2686.
- [36] LIU W, SCHAT H, BLIEK M et al. Knocking out ACR2 does not affect arsenic redox status in Arabidopsis thaliana: implications for as detoxification and accumulation in plants. *PLoS One* 2012; **7**: e42408.
- [37] MACIASZCZYK-DZIUBIŃSKA E, MIGOCKA M, WYSOCKI R. Acr3p is a plasma membrane antiporter that catalyzes As (III)/H<sup>+</sup> and Sb (III)/H<sup>+</sup> exchange in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2011; **1808**: 1855-1859.

- [38] MACIASZCZYK-DZIUBINSKA E, WAWRZYCKA D, SŁOMA E, MIGOCKA M, WYSOCKI R. The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 2010; **1798**: 2170-2175.
- [39] MANDAL G, MANDAL S, SHARMA M et al. Species-specific antimonial sensitivity in Leishmania is driven by post-transcriptional regulation of AQP1. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; **9**: e0003500.
- [40] MESSENS J, SILVER S. Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *Journal of molecular biology* 2006; **362**: 1-17.
- [41] MITTAL M, CHATTERJEE S, FLORA SJS. Combination therapy with vitamin C and DMSA for arsenic-fluoride co-exposure in rats. *Metallomics* 2018; **10**: 1291-1306.
- [42] MUKHOPADHYAY R, BISACCHI D, ZHOU Y, ARMIROTTI A, BORDO D. Structural characterization of the As/Sb reductase LmACR2 from Leishmania major. *Journal of molecular biology* 2009; **386**: 1229-1239.
- [43] MUKHOPADHYAY R, ROSEN BP, PHUNG LT, SILVER S. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 2002; **26**: 311-325.
- [44] MUKHOPADHYAY R, ROSEN BP. Saccharomyces cerevisiae ACR2 gene encodes an arsenate reductase. *FEMS microbiology letters* 1998; **168**: 127-136.
- [45] MUKHOPADHYAY R, ROSEN BP. The phosphatase C(X)5R motif is required for catalytic activity of the Saccharomyces cerevisiae Acr2p arsenate reductase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 34738-34742.
- [46] MUKHOPADHYAY R, SHI J, ROSEN BP. Purification and characterization of ACR2p, the Saccharomyces cerevisiae arsenate reductase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 21149-21157.
- [47] MUKHOPADHYAY R, ZHOU Y, ROSEN BP. Directed evolution of a yeast arsenate reductase into a protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 2003; **278**: 24476-24480.
- [48] NAHAR N, RAHMAN A, GHOSH S, NAWANI N, MANUAL A. Functional studies of AtACR2 gene putatively involved in accumulation, reduction and/or sequestration of arsenic species in plants. *Biologia* 2017; **72**: 520-526.
- [49] NAHAR N, RAHMAN A, MOŚ M et al. In silico and in vivo studies of an Arabidopsis thaliana gene, ACR2, putatively involved in arsenic accumulation in plants. *J Mol Model* 2012; **18**: 4249-4262.
- [50] NARSAI R, LAW SR, CARRIE C, XU L, WHELAN J. In-depth temporal transcriptome profiling reveals a crucial developmental switch with roles for RNA processing and organelle metabolism that are essential for germination in Arabidopsis. *Plant physiology* 2011; **157**: 1342-1362.
- [51] OCH LM, SHIELDS-ZHOU GA. The Neoproterozoic oxygenation event: environmental perturbations and biogeochemical cycling. *Earth-Science Reviews* 2012; **110**: 26-57.
- [52] PERSSON BL, PETERSSON J, FRISTEDT U, WEINANDER R, BERHE A, PATTISON J. Phosphate permeases of Saccharomyces cerevisiae: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1422**: 255-272.
- [53] POMPELLA A, VISVIKIS A, PAOLICCHI A, DE TATA V, CASINI AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003; **66**: 1499-1503.
- [54] RASHEED H, SLACK R, KAY P. Human health risk assessment for arsenic: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2016; **46**: 1529-1583.
- [55] RAVENSCROFT P, BRAMMER H, RICHARDS K. Arsenic Pollution. *A Global Synthesis*. Singapore: John Wiley & Sons, 2011.
- [56] REYNOLDS RA, YEM AW, WOLFE CL, DEIBEL MR, CHIDESTER CG, WATENPAUGH KD. Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle. *J Mol Biol* 1999; **293**: 559-568.
- [57] SALGADO A, LÓPEZ-SERRANO OLIVER A, MATIA-GONZÁLEZ AM et al. Response to arsenate treatment in Schizosaccharomyces pombe and the role of its arsenate reductase activity. *PLoS ONE* 2012; **7**: e43208.
- [58] SALT DE. Would the real arsenate reductase please stand up? *New Phytol* 2017; **215**: 926-928.
- [59] SÁNCHEZ-BERMEJO E, CASTRILLO G, DEL LLANO B et al. Natural variation in arsenate tolerance identifies an arsenate reductase in Arabidopsis thaliana. *Nature Communications* 2014; **5**: 1-9.

- [60] SARKAR A, PAUL B. The global menace of arsenic and its conventional remediation – A critical review. *Chemosphere* 2016; **158**: 37-49.
- [61] SARWAR N, IMRAN M, SHAHEEN MR et al. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere* 2017; **171**: 710-721.
- [62] SHAKED-MISHAN P, ULRICH N, EPHROS M, ZILBERSTEIN D. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2001; **276**: 3971-3976.
- [63] SHEN H, HE Z, YAN H et al. The fronds tonoplast quantitative proteomic analysis in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *J Proteomics* 2014; **105**: 46-57.
- [64] SHI S, WANG T, CHEN Z et al. OsHAC1;1 and OsHAC1;2 Function as Arsenate Reductases and Regulate Arsenic Accumulation. *Plant Physiol* 2016; **172**: 1708-1719.
- [65] SHIN H, SHIN H-S, DEWBRE GR, HARRISON MJ. Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J* 2004; **39**: 629-642.
- [66] SHUKLA T, KUMAR S, KHARE R, TRIPATHI RD, TRIVEDI PK. Natural variations in expression of regulatory and detoxification related genes under limiting phosphate and arsenate stress in Arabidopsis thaliana. *Frontiers in plant science* 2015; **6**: 898.
- [67] SORRELL DA, CHRIMES D, DICKINSON JR, ROGERS HJ, FRANCIS D. The Arabidopsis CDC25 induces a short cell length when overexpressed in fission yeast: evidence for cell cycle function. *New Phytol* 2005; **165**: 425-428.
- [68] SPADAFORA ND, DOONAN JH, HERBERT RJ et al. Arabidopsis T-DNA insertional lines for CDC25 are hypersensitive to hydroxyurea but not to zeocin or salt stress. *Ann Bot* 2011; **107**: 1183-1192.
- [69] STOEVA N, BINEVA T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulg J Plant Physiol* 2003; **29**: 87-95.
- [70] WANG P, ZHANG W, MAO C, XU G, ZHAO F-J. The role of OsPT8 in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice. *J Exp Bot* 2016; **67**: 6051-6059.
- [71] WU Z, REN H, MCGRATH SP, WU P, ZHAO F-J. Investigating the contribution of the phosphate transport pathway to arsenic accumulation in rice. *Plant Physiol* 2011; **157**: 498-508.
- [72] WYSOCKI R, BOBROWICZ P, ULASZEWSKI S. The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30061-30066.
- [73] WYSOCKI R, FORTIER P-K, MACIASZCZYK E et al. Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 2049-2060.
- [74] XU J, SHI S, WANG L et al. OsHAC4 is critical for arsenate tolerance and regulates arsenic accumulation in rice. *New Phytol* 2017; **215**: 1090-1101.
- [75] XU X, BURKE SP. Roles of active site residues and the NH2-terminal domain in the catalysis and substrate binding of human Cdc25. *J Biol Chem* 1996; **271**: 5118-5124.
- [76] YE J, RENSING C, ROSEN BP, ZHU Y-G. Arsenic biomethylation by photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci* 2012; **17**: 155-162.
- [77] YIN X, WANG L, DUAN G, SUN G. Characterization of arsenate transformation and identification of arsenate reductase in a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Environ Sci* 2011; **23**: 1186-1193.
- [78] YIN X, WANG L, LIU Y, JIANG T, GAO J. Characterization of Arsenic Biotransformation by a Typical Bryophyte *Physcomitrella patens*. *Bull Environ Contam Toxicol* 2017; **98**: 251-256.
- [79] YOMPAKDEE C, BUN-YA M, SHIKATA K, OGAWA N, HARASHIMA S, OSHIMA Y. A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 1996; **171**: 41-47.
- [80] YONG JWH, TAN SN, NG YF et al. Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* and *Pityrogramma calomelanos*: a comparative study of uptake efficiency in arsenic-treated soils and waters. *Water Sci Technol* 2010; **61**: 3041-3049.
- [81] ZABLOTSKA LB, CHEN Y, GRAZIANO JH et al. Protective effects of B vitamins and antioxidants on the risk of arsenic-related skin lesions in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2008; **116**: 1056-1062.

- [82] ZHOU Y, BHATTACHARJEE H, MUKHOPADHYAY R. Bifunctional role of the leishmanial antimonate reductase LmACR2 as a protein tyrosine phosphatase. *Mol Biochem Parasitol* 2006; **148**: 161-168.
- [83] ZHOU Y, MESSIER N, OUELLETTE M, ROSEN BP, MUKHOPADHYAY R. Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem* 2004; **279**: 37445-37451.
- [84] ZHU H-H, QIN Y-Z, HUANG X-J. Resistance to arsenic therapy in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 2014; **370**: 1864-1866.
- [85] ZHU Y-G, YOSHINAGA M, ZHAO F-J, ROSEN BP. Earth Abides Arsenic Biotransformations. *Annu Rev Earth Planet Sci* 2014; **42**: 443-467.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 06.07.2020*

*Przyjęto: 03.08.2020*

*Ewa Maciaszczyk-Dziubińska,*

*Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej*

*ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław*

*email: ewa.maciaszczyk-dziubinska@uwr.edu.pl*

*tel.: 713754128, fax: 713754118*

