

Seweryn Mucha<sup>1,2</sup>, Mateusz Berezowski<sup>1,2</sup>, Katarzyna Markowska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej,  
Uniwersytet Wrocławski

<sup>2</sup>Wkład tych autorów jest równorzędny

Wpłynęło w lipcu 2016 r.

Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Właściwości chemiczne i występowanie arsenu w środowisku. 3. Sposoby wnikania arsenu do komórek. 4. Mechanizmy toksycznego działania arsenu trójwartościowego. 4.1. Stres oksydacyjny. 4.2. Wiązanie z białkami. 4.3. Agregacja białek. 5. Toksyczność pięciowartościowego arsenu. 6. Mechanizmy detoksykacji komórek ze związków arsenu. 6.1. Operony *ars*. 6.2. Geny *ACR*. 6.3. Usuwanie koniugatów arsenu przez pierwotne transportery ABC. 6.4. Dwukierunkowy transport arsenu. 7. Podsumowanie

### Mechanisms of arsenic toxicity and transport in microorganisms

**Abstract:** Arsenic is an ubiquitous element present in the environment either through geological or anthropogenic activities. Millions of people all over the world are exposed to arsenic mainly via air, drinking water and food sources, which results in higher incidence of cancer. Several mechanisms by which arsenic compounds induce tumorigenesis have been proposed. Arsenic mediates its toxicity by generating oxidative stress, inducing protein misfolding, promoting genotoxicity, hampering DNA repair and disrupting signal transduction. Thus, all organisms have developed multiple pathways for arsenic detoxification. In this article, we review recent advances in the understanding of arsenic toxicity and its transport routes in prokaryotes and eukaryotes, including a dual role of aquaglyceroporins in the uptake and efflux, active transport out of the cell via secondary ion pumps and sequestration of metalloid-thiol conjugates into vacuoles by primary ABC transporters. We believe that such studies are of high importance due to the increasing usage of arsenic-based drugs in the treatment of certain types of cancer and diseases caused by protozoan parasites as well as for the development of bio- and phytoremediation strategies for metalloid-polluted areas.

1. Introduction. 2. The chemical properties and the presence of arsenic in the environment. 3. Pathways for arsenic uptake. 4. Mechanism of trivalent arsenic toxicity. 4.1. Oxidative stress. 4.2. Arsenic binding to proteins. 4.3. Protein aggregation. 5. Pentavalent arsenic toxicity. 6. Cellular detoxification mechanisms of arsenic compounds. 6.1. *ars* operons. 6.2. *ACR* genes. 6.3. Removal of arsenic conjugates by the ABC transporters. 6.4. Bi-directional transport of arsenic. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** arsen, toksyczność, transport, wnikanie

**Key words:** arsenic, toxicity, transport, uptake

## 1. Wstęp

Arsen, którego związki są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym, działa silnie toksycznie na organizmy żywe, a Międzynarodowa Agencja Badań nad Nowotworami (IARC – International Agency for Research on Cancer) klasyfikuje ten metalloid w pierwszej grupie czynników rakotwórczych [40]. Zanieczyszczenie wody, gleby i powietrza związkami arsenu pochodzenia naturalnego i antropogenicznego stanowi poważny problem w wielu rejonach świata, zwłaszcza Azji Południowej i Południowo-Wschodniej, Ameryce Południowej, Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, a także kilku krajach europejskich [13, 36, 63]. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO – World Health Organization) ponad 100 mln ludzi każdego dnia może przyjmować pożywienie i wodę zawierającą arsen w ilości większej niż uznawana za bezpieczną normę 10 µg/l [86]. Skutki przewlekłej

ekspozycji na arsen, przy dużym, genetycznym zróżnicowaniu tolerancji osobniczej, zależą od wielu czynników, choć głównie od dawki, czasu, źródła, postaci i drogi w jakiej pierwiastek ten został przyswojony [8, 24]. Mogą one mieć charakter przemijających schorzeń lub trwałych uszkodzeń (arsenikozy) i występują zwykle po kilku latach. Sam długotrwały kontakt z pyłem arsenowym może wywołać kilkanaście odmian raka skóry i płuc, natomiast spożywanie skontaminowanej żywności może przyczyniać się do rozwoju nowotworów różnych narządów, głównie jednak wątroby, nerek i pęcherza moczowego [14, 86].

Pomimo wysoce toksycznych i karcinogennych właściwości związki arsenu wykorzystywane były w lecznictwie od wieków. Także współcześnie preparaty zawierające ten pierwiastek są ważnym elementem nowoczesnej chemioterapii przeciwnowotworowej. Dobrym przykładem jest trójtlenek arsenu, będący aktywnym składnikiem środka o handlowej nazwie Trisenox

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki i Fizjologii Komórki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Wrocławski, ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław, tel.: 71 3754102, e-mail: katarzyna.markowska@uwr.edu.pl

(Cephalon) stosowanego w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej (APL – Acute Promyelocytic Leukemia) [3, 27]. Aktualnie prowadzonych jest lub zakończono szereg badań klinicznych nad użytecznością arseniku w leczeniu innych nowotworów krwi, jak również guzów litych [1, 74]. Z kolei chemioterapeutyki oparte na pokrewnym metaloidzie – antymonie (Pentostam, GlaxoSmithKline i Glucantim, Sanofi-Aventis) są nadal podstawą w terapii leiszmaniozy (czarna febra) [31], a lek zawierający w swym składzie melarsoprol (Arsobal, Mel B, Melarsen Oxide-BAL), przed zastosowaniem eflornityny, był jedynym lekiem podawanym w drugim, neurologicznym stadium trypanosomatozy (śpiączka afrykańska) [5].

Niestety pomimo niewątpliwych sukcesów w przypadku leczenia APL, terapia arsenem bywa nieskuteczna w innych rodzajach nowotworów. Wywołanie efektu indukowanej apoptozy wymaga zastosowania wyższych dawek leku, które są już toksyczne dla pacjentów. Prawdopodobnie związane jest to z uaktywnieniem się w komórkach nowotworowych specyficznej, choć dotąd niewyjaśnionej oporności na arsen. Zjawisko oporności na związki antymonu powszechnie występuje także u pierwotniaków, co stanowi poważny problem medyczny, gdyż nie ma alternatywnych metod leczenia tych często śmiertelnych chorób. Zrozumienie molekularnych mechanizmów oporności komórek eukariotycznych na arsen i antymon jest zatem niezbędne do opracowania skuteczniejszych metod terapeutycznych. Z drugiej strony, z powodu znacznej szkodliwości związków arsenu dla zdrowia ludzkiego, bardzo istotne staje się także dokładne poznanie podstaw toksycznego działania tego metaloidu, co obecnie stanowi cel badań wielu ośrodków naukowych na całym świecie.

## 2. Właściwości chemiczne i występowanie arsenu w środowisku

Arsen jest pierwiastkiem chemicznym o właściwościach metaloidu / półmetal, który w związkach może występować na czterech stopniach utlenienia:  $-3$ ,  $0$ ,  $+3$  i  $+5$ , przy czym dwie ostatnie jego formy są najczęściej spotykane w środowisku i obecne w organizmach żywych. Arsen nieorganiczny w postaci arsenków i arsenianów zarówno metali jak i niemetalów wchodzi w skład licznych minerałów (np. lelingit ( $\text{FeAs}_2$ )). Często towarzyszy także siarczkom i złożom siarczkowym innych metali (np. realgar ( $\text{AsS}$ ), kobaltyn ( $\text{CoAsS}$ )). Trójtlenek diarsenu ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ), znany jako arsenik, w formie stałej występuje pod postacią minerałów: arsenolitu i kładetytu. W wodzie i glebie, w zależności od pH i potencjału redukcyjnego, dominują obojętne lub zdysocjowane jony kwasu arsenawego ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ,  $\text{As}(\text{OH})_3$ ) i arsenowego ( $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ,  $\text{AsO}(\text{OH})_3$ ). Trójwartościowe

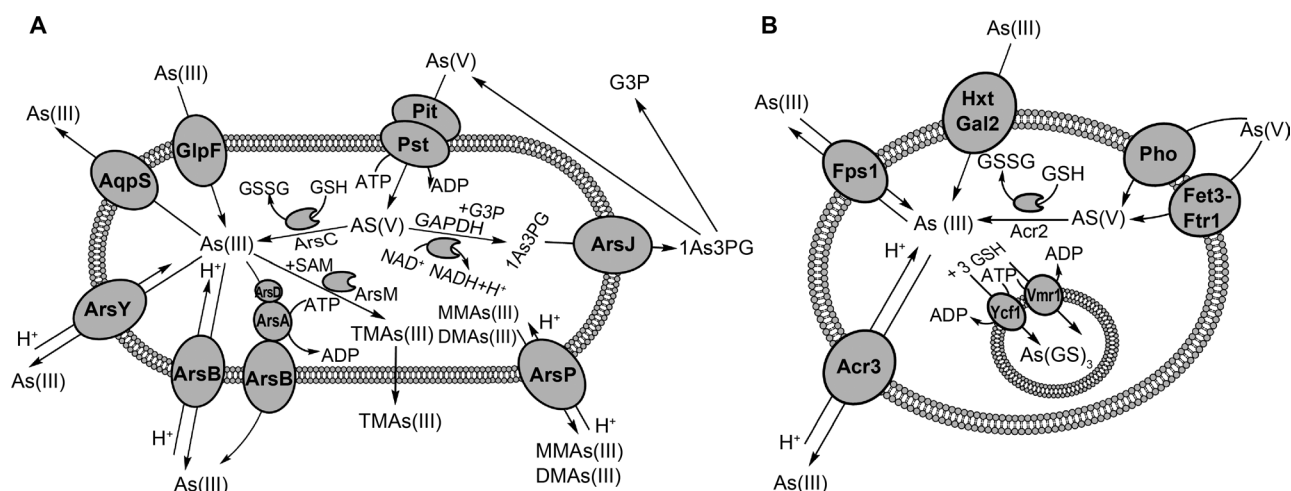
związki arsenu przeważają w warunkach beztlenowych, redukujących (np. skały, muły rzeczne), natomiast pięciwartościowe w warunkach tlenowych (np. gleba, wody powierzchniowe) [71].

Głównym rezerwuarem arsenu jest litosfera, skąd uwalniany jest do biosfery przede wszystkim podczas erupcji wulkanów, aktywności geotermalnej i ługowania przez wodę ze skał osadowych i magmowych. Również działalność antropogeniczna znacząco przyczynia się do zanieczyszczenia środowiska naturalnego związkami arsenu. Do ich emisji dochodzi głównie w wyniku procesów wydobywania i hutnictwa rud metali nieżelaznych, spalania paliw kopalnianych oraz stosowania w rolnictwie i hodowli zwierząt gospodarskich nawozów, pestycydów i środków wspomagających wzrost zawierających ten pierwiastek [43, 70, 71].

W komórkach organizmów żywych nieorganiczne związki arsenu mogą ulegać biotransformacji (np. metylacji, kompleksowaniu z glutationem) do form organicznych, będących ubocznymi produktami przemiany materii (np. metylowane formy kwasów nieorganicznych, trimetyloarsyna) lub tworzyć arsenowe analogi biocząsteczek (np. arsenobetaina, arsenocholina, arsenolipidy, arsenocukry), które następnie wbudowywane są w różne struktury komórkowe lub włączane w różnorodne szlaki metaboliczne [98, 104].

## 3. Sposoby wnikania arsenu do komórek

Związki arsenu wykazują podobieństwo strukturalne do kilku niezbędnych komórce substancji, dlatego na zasadzie mimikry molekularnej mają zdolność pokonywania bariery błony komórkowej i akumulacji we wnętrzu komórki. W roztworze wodnym o pH zbliżonym do obojętne arsen nieorganiczny na  $+3$  stopniu utlenienia ( $\text{As}(\text{III})$ ) występuje głównie w postaci pozbawionej ładunku cząsteczki kwasu arsenawego ( $\text{As}(\text{OH})_3$ ) o silnie amfipatycznym charakterze, w którym część zawierająca atom As jest silnie hydrofobowa, natomiast ta z grupami hydroksylowymi ( $-\text{OH}$ ) hydrofilowa. Związek ten posiada konformację podobną do glicerolu, dlatego też u wszystkich organizmów wnika do wnętrza komórki zgodnie z gradientem stężeń przez akwagliceroporyny. U bakterii *Escherichia coli* kanałem glicerolowym umożliwiającym przenikanie  $\text{As}(\text{OH})_3$  (i  $\text{Sb}(\text{OH})_3$ ) jest GlpF (Rys. 1A). U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* za pobór do komórki metaloidów w tej formie odpowiada głównie akwagliceroporyna Fps1 (Rys. 1B). Z kolei u pasożytniczych pierwotniaków *Leishmania major* i *L. tarentolae* oraz ludzi są to odpowiednio białka AQP1 oraz AQP7. W warunkach niedoboru glukozy  $\text{As}(\text{III})$  może być także pobierany do komórek drożdży poprzez permeazy heksozowe Hxt1-Hxt17 i Gal2 (Rys. 1B). Arsen nieorganiczny



Rys. 1. Mechanizmy akumulacji i detoksykacji komórek ze związków arsenu

Zarówno u bakterii *E. coli* (A), jak i drożdży *S. cerevisiae* (B) As(III) wnika do komórek zgodnie z gradientem stężeń poprzez akwagliceroporyny. Jeżeli wewnątrzkomórkowe stężenie As(III) jest większe niż w środowisku zewnętrznym, akwagliceroporyny mogą pełnić także funkcje detoksykacyjne transportując nieorganiczny arsen na zewnątrz komórki. U drożdży (B), w warunkach niedoboru glukozy, As(III) może być także pobierany przez transportery heksozowe. U obu organizmów As(V) jest transportowany do komórek przez permeazy fosforanowe, a u drożdży (B) także przez żelazowe, po czym w cytoplazmie ulega enzymatycznej redukcji do As(III) w reakcji katalizowanej przez reduktazy arsenianowe. U bakterii (A) As(V) może również być modyfikowany przez dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego do 1-arseno 3-fosfoglicerynianu (1As3PGA) i w tej formie usuwany na zewnątrz komórki przez białko ArsJ. Po redukcji As(III) może utworzyć u drożdży (B) kompleks z glutationem i zostać przeniesiony do wakuoli dzięki aktywności niespecyficznego transportera typu ABC. U bakterii (A) i drożdży (B) As(III) usuwany jest jednak z komórki wbrew gradientowi stężeń głównie dzięki aktywności zlokalizowanego w błonie komórkowej specyficznego antyportera ArsY/Acr3. U bakterii (A) występuje także pompa arsenowa ArsAB, aktywnie wyrzucająca As(III) z cytoplazmy dzięki hydrolizie ATP, której składnik ArsB może funkcjonować samodzielnie jako transporter wtórny. W komórkach bakterii (A) As(III) często ulega metylacji przez metylotransferazę arsenową przy udziale S-adenozylometioniny. Bakterie (A) posiadają specyficzny dla trójwartościowych, metylowanych form arsenu transporter ArsP. Poza tym lotna trimetyloarsyna może u nich dyfundować bezpośrednio przez błonę komórkową. Komórki przedstawiono schematycznie [56, zmod.].

na +5 stopniu utlenienia (As(V)) występuje w środowisku wodnym o neutralnym pH głównie w postaci oksyanionu  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ , który swoimi właściwościami chemicznymi przypomina jon fosforanowy  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  i u wszystkich organizmów może być substratem dla transporterów fosforanowych. U bakterii *E. coli* występują dwa rodzaje takich transporterów, Pit i Pst, i oba mogą katalizować pobieranie As(V). U drożdży wnikanie jonu  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$  do komórki umożliwiają białka Pho84 i Pho87, będące składowymi transportera fosforanowego (Rys. 1), natomiast u kręgowców permeaza NaPiIIb [56, 95]. Badania wskazują również, że za akumulację kwasu arsenowego w komórkach *S. cerevisiae* może być także odpowiedzialny białkowy kompleks Fet3-Ftr1, umożliwiający transport żelaza [6].

#### 4. Mechanizmy toksycznego działania arsenu trójwartościowego

W komórkach związku arsenu trójwartościowego odznaczają się toksycznością o rozległym spektrum działania. Sprowadza się ona m.in. do zaburzenia procesu fałdowania białek, co może skutkować nieprawidłowym działaniem wrzeczona podziałowego. Prowadzi to w efekcie do wadliwej segregacji chromatyd, co z kolei indukuje powstawanie komórek z aberracjami

chromosomowymi. Poza tym szeroko opisana jest zdolność metaloidu do generowania w komórkach stresu oksydacyjnego, który może prowadzić do modyfikacji zasad azotowych. Znamienny jest również potencjał arsenu do hamowania aktywności białek mających znaczenie w naprawie DNA. Może to w efekcie wywoływać poważne uszkodzenia DNA, skutkujące anomaliami takimi jak fuzje końców chromosomów. Dodatkowo, wpływając na epigenetyczne mechanizmy kontroli ekspresji genów, oddziałując na długość telomerów, rozregulowując punkty kontrolne cyklu komórkowego, arsen może wzmagać w komórkach narastającą niestabilność genomową i w rezultacie przekierowywać je na drogę transformacji nowotworowej [8, 14].

##### 4.1. Stres oksydacyjny

Toksyczność trójwartościowych związków arsenu w dużej mierze wynika z ich zdolności do indukowania stresu oksydacyjnego. Wykazano, że w komórkach ludzkich generują one powstawanie dużych ilości reaktywnych form tlenu (ROS – Reactive Oxygen Species) [30], do czego dochodzi m. in. dzięki ich potencjałowi do przerywania ciągłości zewnętrznej błony mitochondrialnej, co w konsekwencji skutkuje „ucieczką” wolnych rodników [35]. Uszkodzone w ten sposób

organelle są, w warunkach fizjologicznych, eliminowane na drodze autofagocytozy, aby chronić komórki przed toksycznymi efektami stresu oksydacyjnego. Ponieważ jednak As(III) ma zdolność do hamowania samego procesu autofagocytozy, prawdopodobnie przez blokowanie fuzji autofagosomów z lizosomami, nasila w konsekwencji negatywne skutki powodowane akumulacją ROS [46, 66]. Kolejnym mechanizmem, prowadzącym do wzrastania w komórkach poziomu ROS, jest stymulowanie przez As(III) oksydazy NAD(P)H, generującej wolne rodniki [23], a hamowanie katalazy i dysmutazy nadtlenkowej, czyli enzymów o funkcjach antyoksydacyjnych [30]. Poza tym metaloid ten jest zdolny do tworzenia koniugatów z dużymi ilościami wolnego glutationu, które usuwane są następnie do wakuoli lub poza obręb komórki. Proces ten prowadzi do „neutralizacji” toksycznego pierwiastka, ale skutkuje jednocześnie obniżeniem puli dostępnego antyoksydantu, powodując w efekcie zmniejszenie tolerancji komórek na stres oksydacyjny [29].

Generowane działaniem związków arsenu ROS ulegają w komórce akumulacji, co skutkuje powstawaniem szeregu uszkodzeń. W takich warunkach dochodzi może do naruszania struktury DNA, m.in. poprzez wywoływanie chemicznych modyfikacji zasad azotowych (np. formowanie 8-hydroksy-2’deoksyguanozyny (8-OHdG)), które w efekcie prowadzić mogą do podstawień nukleotydów. Oprócz tego ROS przyczyniają się do powstawania miejsc apurynowych i apirymidynowych, mogących skutkować delecjami nukleotydów, a także kowalencyjnych wiązań między białkami i DNA, czy też jednoniciowych pęknięć DNA [41]. Należy również zaznaczyć, że u drożdży *S. cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* nieorganiczny As(III) nie zwiększa istotnie produkcji ROS i powoduje niski poziom oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Wykazano natomiast, że arsen może, prawdopodobnie w sposób bezpośredni, a nie tylko pośredni w wyniku wywoływania stresu oksydacyjnego, niezależnie także od replikacji i transkrypcji, indukować dwuniciowe złamania DNA we wszystkich fazach cyklu komórkowego [49].

Podczas powodowanego arsenem stresu oksydacyjnego uszkodzeniu ulegają również białka, zwłaszcza te bogate w cysteinę. Dzieje się tak, ponieważ obecna w reszcie tego aminokwasu grupa tiolowa (-SH) stanowi główne miejsce, które może być kowalencyjnie modyfikowane przez ROS. Utlenienie reszt cysteiny może powodować modyfikację centrum aktywnego i zmiany konformacyjne enzymów, co prowadzi do zaburzeń, a nawet utraty ich funkcji, zakłócając prawidłowy przebieg wielu procesów fizjologicznych [83]. Szczególnie wrażliwe na zmiany potencjału redoks są białka, w których strukturze występuje motyw palca cynkowego. Pełnią one zasadniczą rolę w komórce, zwłaszcza w procesach transkrypcji i naprawy DNA.

Podczas oksydacyjnych modyfikacji grup tiolowych cystein, tworzących miejsce wiązania cynku, dochodzi do jego uwolnienia i w rezultacie całkowitej dezaktywacji enzymów [44].

#### 4.2. Wiązanie z białkami

Kolejną przyczyną toksyczności związków arsenu jest ich silne powinowactwo do obecnej w reszcie cysteiny grupy tiolowej, która stanowi potencjalne miejsce wiązania arsenu w białkach. Badania wskazują, że As(III) silnie wiąże się z białkami zawierającymi w centrach aktywnych więcej niż jedną grupę tiolową, a jedna cząsteczka As(OH)<sub>3</sub> może formować trójkątne, stożkowe koordynaty białkowe, angażując w wiązanie aż trzy cysteiny jednocześnie [100]. Powstające wiązania As-S odpowiadają za zmiany konformacji, aktywności i/lub interakcji z innymi cząsteczkami różnych enzymów czy transporterów jonowych. Szczególnie niebezpieczne są interakcje arsenu z białkami biorącymi udział w naprawie DNA. Wykazano, że podczas ekspozycji na ten pierwiastek inhibicji ulegają białka kluczowe dla naprawy przez wycinanie zasad (np. ligaza DNA I) oraz naprawy przez wycinanie nukleotydów (np. XPA), jak również uczestnicząca w wielu innych procesach komórkowych polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP-1) [73]. W przypadku białek z motywem palca cynkowego zaproponowano, że As(III) selektywnie wiąże się tylko z tymi, które w miejscu wiązania cynku zawierają trzy lub cztery reszty cysteiny. Wyparcie atomu cynku i zastąpienie go atomem arsenu w specyficzny sposób narusza i uwrażliwia te białka na uszkodzenia powodowane oksydacją przez reaktywne formy tlenu. Dzieje się tak dlatego, że pozbawione ochrony ze strony cynku reszty cysteiny stają się wrażliwe na działanie ROS, podczas którego dochodzi również do uwolnienia metaloidu. Odtworzona w ten sposób cząsteczka As(III) może wchodzić w reakcje z kolejnymi białkami rozpoczynając cykl od nowa [100, 103]. Arsen działa szkodliwie także poprzez interakcje z wieloma białkami nieuczestniczącymi w naprawie DNA. Na przykład, wiązanie się As(III) do dehydrogenazy pirogronianowej znacząco zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie ATP [7], do reduktazy tioredoksynowej zaburza równowagę redoks w komórce [84], natomiast do syntazy NO obniża ilość bioaktywnego tlenu azotu [75].

#### 4.3. Agregacja białek

Do indukowanych działaniem arsenu zaburzeń w trakcie fałdowania białek dochodzi na drodze dwóch mechanizmów. Po pierwsze, metaloid zakłóca osiągnięcie prawidłowej konformacji nowo syntezowanych białek już w trakcie ich translacji poprzez oddziaływanie na jeszcze niesfałdowane segmenty łańcucha

polipeptydowego. Po drugie, bezpośrednio hamuje aktywność białek chaperonowych, prawdopodobnie przez wywoływanie ich agregacji, bezpośrednie wiązanie się, bądź modyfikowanie ich reszt cysteinowych. Oba te mechanizmy prowadzą do zaburzeń w przyjmowaniu przez nowopowstające białka natywnej struktury przestrzennej. Z kolei nieprawidłowo sfałdowane białka ulegają skupieniu tworząc agregaty zdolne do indukowania takiego samego procesu u kolejnych podatnych na to protein, wpływając w ten sposób negatywnie na żywotność komórek [76]. U drożdży piekarniczych znaleziono 143 białka agregujące w wyniku ekspozycji na As(III). Zidentyfikowano także kilka ludzkich homologów białek drożdżowych, które u tego organizmu modelowego najczęściej tworzą agregaty podczas stresu arsenowego. Białka te u ludzi powiązane są z chorobami neurodegeneracyjnymi, np. chorobą Alzheimera czy chorobą Parkinsona, u podłoża których również leżą zaburzenia prawidłowej konformacji, agregacja i ko-agregacja z innymi białkami „niechorobotwórczymi”. Sugeruje to istnienie podobnego mechanizmu agregacji białek u drożdży i ludzi [38]. Ponadto badania wykonane na komórkach *S. cerevisiae* pokazują, że As(III) może dezintegrować cytoszkielet poprzez hamowanie aktywności kompleksu białek opiekuńczych TRiC (TCP1-Ring Complex), który zapewnia prawidłowe fałdowanie nowopowstałych cząsteczek aktyny i tubuliny. Wykazano, że As(III) inhibuje aktywność tego kompleksu, co powoduje, że w komórce pojawiają się niefunkcjonalne, toksyczne białka o nieprawidłowej konformacji. Wynikiem tych zaburzeń jest m.in. źle wykształcone wrzeciono podziałowe, mogące być przyczyną nierównocennego podziału chromosomów [65]. Jednakże, jak wykazano w badaniach na komórkach ludzkich, As(III) ma także zdolność do inhibicji tworzenia wrzeciona podziałowego poprzez bezpośrednie wiązanie się do  $\beta$ -tubuliny, co uniemożliwia polimeryzację pojedynczych cząsteczek tego białka we włókna tubulinowe [8, 101].

## 5. Toksyczność pięciowartościowego arsenu

Toksyczność arsenu pięciowartościowego związana jest z chemicznym podobieństwem jonów arsenianowych ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ) do jonów fosforanowych ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), z którymi współzawodniczą w reakcjach energetycznych. Arsenian może podczas glikolizy łączyć się wiązaniem estrowym z cząsteczką glukozy tworząc wysoce niestabilny i ulegający szybkiej hydrolizie glukozo-6-arsenian. Z kolei w mitochondriach, podczas cyklu Krebsa i fosforylacji oksydacyjnej, z części ADP syntetyzowany może być arsenian adenozy-5-difosforanu. Hamowane są także enzymy uczestniczące w procesie oddychania (np. dehydrogenaza glukozo-6-fosfo-

ranu). Wszystko to powoduje rozprzęganie produkcji ATP, a w konsekwencji wyczerpanie komórkowych zasobów energii [37].

## 6. Mechanizmy detoksykacji komórek ze związków arsenu

Obecność arsenu w toksycznym stężeniu towarzyszy życiu na Ziemi od jego początków. Spowodowało to wystąpienie silnej presji selekcyjnej sprzyjającej wytworzeniu mechanizmów detoksykacji komórek, bez których organizmy żywe nie mogłyby przetrwać [104]. Generalnie detoksykacja komórek ze związków arsenu polega na ograniczeniu ich wnikania lub na zwiększeniu ich usuwania z cytoplazmy, bądź też na biotransformacji do mniej toksycznych form. Najwyższy poziom oporności, zarówno komórki prokariotyczne jak i eukariotyczne, osiągają dzięki aktywnemu transportowi arsenu do wakuoli lub wyrzutowi na zewnątrz błony komórkowej przez specyficzne dla tego metaloidu transportery [68] (Rys. 1). U prokariotów wyewoluowały trzy niezależne od siebie drogi usuwania trójwartościowych związków arsenu: ArsB i Acr3/ArsY dla form nieorganicznych oraz ArsP dla form organicznych. Koegzystencja trzech rodzajów transporterów arsenowych o różnej specyficzności substratowej mogła wytworzyć się z powodu wzrostu złożoności związków arsenu w środowisku [97]. Zmiana charakteru środowiska na utleniający doprowadziła natomiast do powstania mechanizmów oporności na As(V), opierających się głównie na redukcji do As(III) dzięki aktywności reduktazy arsenianowej ArsC, ale również polegających na jego bezpośrednim usuwaniu z komórek przez białko ArsJ [22] (Rys. 1A).

### 6.1. Operony *ars*

Geny oporności na arsen znaleziono w niemal wszystkich zsekwencjonowanych genomach bakterijskich. Występowanie tych genów u współcześnie żyjących mikroorganizmów świadczy o tym, iż presja wywołana powszechnością arsenu w środowisku jest nadal silna [96]. Wysoki poziom oporności na arsen komórek prokariotycznych warunkowany jest obecnością operonu arsenowego *ars*, zlokalizowanego na plazmidach lub chromosomach bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych. Zidentyfikowany jako pierwszy operon *ars* na plazmidzie R773 [19] i R46 [12] z *E. coli* składa się z pięciu genów: *arsR*, *arsD*, *arsA*, *arsB* i *arsC*, natomiast chromosomowa wersja operonu *ars* z *E. coli* zawiera tylko trzy geny: *arsR*, *arsB* i *arsC*, które warunkują oporność na znacznie niższe stężenia arsenu w porównaniu z wersją plazmidową [16]. Podobnie plazmidy pI258 i pSX267 z gram-dodatnich bakte-

rii *Staphylococcus aureus* [42] i *Staphylococcus xylosum* [69] zawierają operon *ars* złożony tylko z trzech genów: *arsR*, *arsB* i *arsC*.

Produkty podstawowych genów operonu *arsRDABC*: *arsA* i *arsB* tworzą pompę arsenową zależną od ATP [25, 26]. Oporność na arsen pięciowartościowy wymaga głównie obecności produktu genu *arsC*, w celu redukcji arsenianu do arseninu, który następnie usuwany jest z komórki przez pompę ArsAB [34]. Gen *arsR* koduje represor transkrypcji operonu *ars* [88], a białko ArsD pełni funkcję „metalochaperonu” odpowiedzialnego za wychwytywanie i dostarczanie As(III) do pompy ArsAB [48] (Rys. 1A).

Główną podjednostką pompy ArsAB stanowi należące do nadrodziny MFS (Major Facilitator Superfamily) białko ArsB, które posiada 12 regionów transbłonowych i zlokalizowane jest w błonie komórkowej, gdzie tworzy kanał dla usuwania arsenu i antymonu z komórki, a także jest miejscem przyłączenia do błony homodimeru podjednostki katalitycznej ArsA, zawierającej konserwatywne sekwencje wiązania ATP i wykazującej aktywność ATPazową indukowaną arseninem i antymoninem [67, 81, 89]. Komórki posiadające funkcjonalny kompleks ArsAB wymagają do usuwania metaloidu energii chemicznej z hydrolizy ATP [25, 26]. Przy braku podjednostki ArsA, jak ma to miejsce w przypadku chromosomowej kopii operonu *ars* u *E. coli* oraz trójgenowego operonu *ars* na plazmidzie u *S. aureus*, białko ArsB katalizuje transport arseninu i antymoninu z użyciem energii elektrochemicznej potencjału błonowego na zasadzie antyportu  $\text{As}(\text{OH})_3/\text{H}^+$  i  $\text{Sb}(\text{OH})_3/\text{H}^+$ , wykazując większe powinowactwo do Sb(III) [45, 59] (Rys. 1A).

Inną permeazą warunkującą oporność na nieorganiczny As(III) jest ArsY/Acr3. Gen kodujący ten transporter, będący składową operonu *ars* złożonego z czterech genów: *arsR*, ORF2 o nieznannej funkcji, *arsY*/*acr3* oraz *arsC*, wykryto po raz pierwszy w obrębie elementu *skin* (for *sigK* intervening) u *Bacillus subtilis* [72]. Białko ArsY/Acr3 posiada 10 segmentów transmembranowych. Jest wtórnym antyporterem metaloidów o dużym powinowactwie do arsenu. Do działania wykorzystuje siłę protomotoryczną pochodzącą z utleniania NADH [82]. Wersje operonu *ars* z genem kodującym białko ArsY/Acr3 są znacznie bardziej rozpowszechnione w genomach bakterii niż operony zawierające *arsB*. Znamienne jest również, że geny *arsY/acr3* i *arsB* nigdy nie występują razem w jednym operonie [97]. Transporter ArsY, podobnie jak ArsB, może łączyć się z białkiem ArsA tworząc kompleks ArsAY, który zwiększa wydajność usuwania arsenu [17, 33, 102]. W komórkach eukariotycznych homologiem białka ArsY jest Acr3, który pełni analogiczną funkcję transportera nieorganicznych form trójwartościowego arsenu [56].

Chociaż permeazy ArsB i ArsY/Acr3 są najczęściej spotykanymi transporterami arsenowymi u bakterii, jakiś czas temu pojawiły się doniesienia o szczepach *Campylobacter jejuni* posiadających chromosomową wersję operonu *arsPRCY*. W skład tego operonu wchodzi między innymi gen kodujący nowy rodzaj błonowego transportera ArsP specyficznego względem związków arsenoorganicznych na +3 stopniu utlenienia i warunkującego oporność na kwas monometyloarsonawy (MMAs(III)), który wydaje się być preferowanym, fizjologicznym substratem dla tej permeazy, oraz w mniejszym stopniu na syntetyczne, aromatyczne związki arsenu [21]. Od tamtej pory obecność wysoce konserwatywnych pod względem topologii homologów ArsP stwierdzono u wielu gatunków bakterii i archeonów, przy czym często współwystępują one z transporterami ArsB lub ArsY [97]. ArsP jest antyporterem transportującym MMAs(III) w sprzężeniu z elektrochemicznym gradientem protonów pochodzącym z utleniania NADH [21]. Zaznaczyć należy, że obecność ArsP jest wystarczająca do nadawania komórkom oporności na trójwartościowe formy arsenu organicznego o czym świadczy także fakt, że gen *arsP* może występować niezależnie od *arsC* i *acr3/arsY* oraz *arsB* [64] (Rys. 1A).

Najnowsze badania operonów *ars* u różnych gatunków bakterii dostarczyły informacji o genach kodujących białka pełniące istotne role w nadawaniu oporności na arsen. Jednym z nowo opisanych genów jest *arsH* kodujący oksydazę ArsH utleniającą trójwartościowe, metylowane i aromatyczne związki arsenu do mniej toksycznych form pięciowartościowych [20]. Innym ważnym elementem operonów *ars* jest gen *arsI*, który koduje liazę ArsI odpowiedzialną za demetylację m.in. wysoce toksycznego kwasu monometyloarsonawego (MMAs(III)) do As(III), ale także degradację aromatycznych związków arsenoorganicznych dzięki zdolności do przecinania wiązań C-As [99]. Opisano również metylotransferazę arsenową ArsM, która nadaje komórkom bakteryjnym oporność na As(III) poprzez jego metylację do mniej szkodliwego kwasu dimetyloarsynowego (DMAs(V)) oraz lotnej trimetyloarsyny (TMAs(III)) [2]. Natomiast produkt aktywności genu *arsN*, N-acetylotransferaza ArsN warunkuje zwiększoną oporność na As(V) poprzez przyczynianie się do zwiększenia stężenia w komórce zredukowanego koenzymu A (CoASH) przez co może pomagać w utrzymaniu równowagi redoks podczas redukcji arsenianu, gdy zmniejszeniu ulegają zasoby glutationu (GSH) [18].

Dotychczas opisane mechanizmy detoksykacji z arsenianu polegają głównie na jego redukcji przez ArsC do około dziesięć razy bardziej toksycznego dla komórek arseninu. Taka strategia wydaje się nielogiczna, jednak należy wziąć pod uwagę fakt występowania

w biosferze głównie zredukowanego As(III) w czasie kształtowania się, w drodze ewolucji, mechanizmów oporności na arsen. Gdy środowisko zmieniało swój charakter na utleniający przeważać zaczął As(V), pojawiła się presja, w wyniku działania której komórki nabyły zdolność do redukcji arsenianu i usuwania arseninu ukształtowanymi już drogami. Jednak system bezpośredniego usuwania As(V) mógłby nieść ważne korzyści dla komórek, pozwalając zaoszczędzić energię wydatkowaną na redukcję i biotransformację arsenianu, nie skutkując pojawieniem się w komórce znacznie bardziej toksycznych form arsenu na trzecim stopniu utlenienia [22].

Analizy operonu *arsRCYH-dsp-gapdh-J* u *Pseudomonas aeruginosa* DK2 wykazały obecność dwóch sąsiadujących genów: *gapdh* kodującego dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego oraz *arsJ* kodującego 410-aminokwasowy, potencjalny transporter MSF, zlokalizowany w błonie komórkowej i posiadający prawdopodobnie 10 regionów transbłonowych. Taki układ genów występuje również w operonach *ars* innych gatunków bakterii takich jak: *Shewanella putrefaciens* 200, *Aeromonas media*, *Marinimicrobium agarilyticum*, *Bermanella marisrubri*, *Oceanimonas* sp. GK1, *Marinobacter daepoensis*. Badania aktywności genów *gapdh* i *arsJ* wykazały, że zwiększają one oporność komórek na As(V), nie zmniejszając wrażliwości na As(III). Komórki bakteryjne ekspresujące *arsJ* są zdolne do usuwania As(V) tylko w obecności dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Wyniki te pozwoliły zaproponować model, w którym GAPDH katalizuje reakcję arsenylacji aldehydu 3-fosfoglicerynowego (G3P), co doprowadza do powstania 1-arseno 3-fosfoglicerynianu (1As3PGA), który jest usuwany z cytoplazmy przez permeazę ArsJ [22] (Rys. 1A). To pierwszy i jak na razie jedyny zaproponowany mechanizm detoksykacji zakładający bezpośrednie usuwanie As(V) na zewnątrz komórki.

## 6.2. Geny ACR

W połowie lat 90-tych z drożdżowego banku genów wyizolowano fragment DNA, który w wielu kopiach nadawał fenotyp bardzo wysokiego poziomu oporności drożdży *S. cerevisiae* na arsenin sodowy [11]. Analiza sekwencji nukleotydowej wykazała, że zawiera on trzy sprzężone ze sobą geny o nieznanym dotąd funkcji. Zidentyfikowane geny nazwano kolejno *ACR1* (Arsenical Compounds Resistance), *ACR2* i *ACR3*, a kodowały one odpowiednio czynnik transkrypcyjny Acr1/Yap8 (YAP – Yeast Activator Protein) należący do rodziny bZIP (basic leucine ZIPper Family), pozytywnie regulujący transkrypcję genów *ACR2* i *ACR3* ze wspólnego promotora [10, 92], reduktazę arsenianową Acr2, niezbędną do redukcji As(V) do As(III) [60],

oraz błonowy transporter arsenu trójwartościowego Acr3 [90] (Rys. 1B). Wkrótce okazało się, że homologi białka Acr3 występują licznie u archeonów, bakterii i grzybów, zidentyfikowano je także u pierwotniaków, glonów, mchów, widłaków, paproci oraz roślin nagonasiennych [62]. Należy w tym miejscu zaznaczyć, że komórki roślin okrytonasiennych i zwierząt nie posiadają funkcjonalnego homologa Acr3, co przekłada się na ich o wiele większą wrażliwość na arsen [56]. Niemniej jednak opisany po raz pierwszy u drożdży *S. cerevisiae* system detoksykacji komórek z nieorganicznych, trójwartościowych związków arsenu oparty na homologach białka Acr3 okazał się być najpowszechniej występującym systemem zarówno u prokariotów jak i eukariotów.

Białko Acr3 u drożdży *S. cerevisiae* jest jak dotąd najlepiej poznanym członkiem-założycielem rodziny permeaz arsenowych Acr3 (Arsenical Resistance-3 Family), zaliczanej wraz z sześcioma innymi rodzinami do nadrodziny BART (Bile/Arsenite/Riboflavin Transporter Superfamily) [57]. Zbudowane jest ono z 404 aminokwasów i, podobnie jak u wielu innych organizmów, lokalizuje się w błonie komórkowej [55]. U paproci *Pteris vittata* zostało ono jednak zidentyfikowane w błonie wakuolarnej, co może świadczyć o tym, że białko to u tej rośliny bierze udział w sekwestracji As(III) do wnętrza wakuoli, a tym samym tłumaczy rolę hiperakumulatora arsenu jaką pełni ta paproć w środowisku [39]. Acr3 w procesie transportu As(III) zużywa energię pochodzącą z gradientu elektrochemicznego protonów generowanego przez błonową H<sup>+</sup>-ATPazę Pma1, a zatem funkcjonuje jako wtórny antyporter, którego zadaniem jest aktywne usuwanie As(III) z cytoplazmy na zewnątrz komórki wbrew gradientowi stężeń [54]. Wykazano, że na podobnej zasadzie działa wspomniane już wcześniej białko ArsY/Acr3 również u *Corynebacterium glutamicum* wykorzystując do tego celu siłę protomotoryczną, której źródłem jest utlenianie NADH, co wyraźnie sugeruje, że mechanizm transportu As(III) jest konserwatywny wśród członków rodziny Acr3 [82]. U bakterii *B. subtilis*, *C. glutamicum* i *Alkaliphilus metalliredigens* białko Acr3 uczestniczy tylko w transporcie As(III) [32, 72, 82]. Chociaż drożdżowe białko Acr3 ma takie samo powinowactwo zarówno do As(III) jak i Sb(III), to jednak transport antymonu zachodzi znacznie wolniej w porównaniu do arseninu, co wyjaśnia, dlaczego nadaje ono komórkom drożdży stosunkowo niską oporność na antymon [54, 55]. U sinic *Synechocystis* sp. białko Acr3 warunkuje taki sam poziom oporności na oba metaloidy [50], za to u bakterii *Shewanella oneidensis* Acr3 wydaje się być specyficzne tylko względem jonów arsenianowych [93]. Taka rozbieżność pod względem specyficzności substratowej może wynikać z różnicy w składzie aminokwasowym regio-

nów transbłonowych (TM), w tym również najistotniejszych dla antyportu  $\text{As(III)/H}^+$  u drożdży – TM4 i TM9, w obrębie których znajdują się reszty najprawdopodobniej bezpośrednio zaangażowane w wiązanie substratów [53, 58]. Ciekawym faktem jest obecność dwóch kopii genu *ACR3* u drożdży *Saccharomyces douglasii* przez co są one bardziej odporne na  $\text{As(III)}$  niż *S. cerevisiae*, które posiadają tylko jedną kopię [51]. Podobną sytuację zaobserwowano u wspomnianej już paproci *P. vittata*, co dodatkowo determinuje jej hiperakumulatorowy charakter [39].

### 6.3. Usuwanie koniugatów arsenu przez pierwotne transportery ABC

U wielu organizmów, zwłaszcza wyższych eukariotów, brak jest swoistych mechanizmów oporności komórek na metaloidy. U tych organizmów w usuwanie  $\text{As(III)}$  i  $\text{Sb(III)}$  z cytoplazmy do wakuoli lub na zewnątrz komórki wbrew gradientowi stężeń mogą być zaangażowane niespecyficzne, pierwotne transportery typu ABC, których działanie zależy od energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Często wymaga to wcześniejszego kompleksowania nieorganicznych związków arsenu i antymonu przez glutation (GSH) [56]. U ssaków, w tym u ludzi, najczęstszą drogą komórkowej biotransformacji nieorganicznych związków arsenu, po redukcji  $\text{As(V)}$  do  $\text{As(III)}$ , jest enzymatyczna metylacja [61]. Również u bakterii metylacja stanowi ważny szlak przekształcenia arsenu [104] (Rys. 1A). Reakcje metylacji przeprowadzane są przez metylotransferazy arsenowe: *As3MT* u ssaków i *ArsM* u bakterii w obecności *S*-adenozylometioniny (SAM) będącej dawcą grupy metylowej ( $-\text{CH}_3$ ) [2, 78]. Ich produktami są kwas monometyloarsonowy ( $\text{MMAs(V)}$ ), monometyloarsonawy ( $\text{MMAs(III)}$ ), dimetyloarsynowy ( $\text{DMAs(V)}$ ) i dimetyloarsynawy ( $\text{DMAs(III)}$ ), a u bakterii także tlenek trimetyloarsyny ( $\text{TMAOs(V)}$ ) i trimetyloarsyna ( $\text{TMAOs(III)}$ ). U niektórych bakterii wysoce toksyczny  $\text{MMAs(III)}$  jest usuwany przez opisany wcześniej transporter *ArsP*, u innych lotna trimetyloarsyna może dyfundować bezpośrednio przez dwuwarstwą fosfolipidową (Rys. 1A). Z kolei u ssaków  $\text{MMAs(III)}$  i  $\text{DMAs(III)}$ , podobnie jak  $\text{As(III)}$ , mogą tworzyć kompleksy z GSH. Powstałe koniugaty glutationowe arsenu nieorganicznego ( $\text{As(GS)}_3\text{(III)}$ ) i organicznego ( $\text{MMAs(GS)}_2\text{(III)}$ ,  $\text{DMAs(GS)}_2\text{(III)}$ ), w tym także w postaci jonu  $(\text{GS})_2\text{AsSe}^-$ , u ludzi usuwane są m.in. z hepatocytów do żółci przez transportery *ABCA1* oraz *MRP1/ABCC1*, *MRP2/ABCC2* i *MRP4/ABCC4* [4, 15, 47, 77]. U drożdży *S. cerevisiae* system usuwania metaloidów z komórki na zewnątrz przy pomocy transportera *Acr3* wspomagany jest przez pompy *Ycf1* i *Vmr1*, które transportują koniugaty  $\text{As(GS)}_3\text{(III)}$  i  $\text{Sb(GS)}_3\text{(III)}$  do wakuoli [85, 91] (Rys. 1A).

### 6.4. Dwukierunkowy transport arsenu

Wyniki heterologicznej ekspresji roślinnych akwagliceroporyn w komórkach drożdży, ukazujące wzrost oporności tych komórek na  $\text{As(V)}$  oraz badania akwagliceroporyn u bakterii i ludzi dostarczyły informacji, iż białka te mogą funkcjonować jako dwukierunkowe kanały i usuwać  $\text{As(III)}$  na zewnątrz komórki zgodnie z gradientem stężeń [9, 94]. Dzieje się tak wówczas gdy wewnątrzkomórkowe stężenie  $\text{As(III)}$  jest wyższe niż na zewnątrz, a ma to miejsce, gdy dominujący w środowisku zewnętrznym  $\text{As(V)}$ , przy udziale reduktazy arsenianowej ulega w komórce redukcji do  $\text{As(III)}$ , co powoduje wzrost stężenia tej formy arsenu w cytoplazmie, wywołując powstanie znaczącej różnicy po obu stronach błony komórkowej. Taka różnica stężeń może również powstać podczas długotrwałej ekspozycji na arsen trójwartościowy, gdy stężenie „wolnego”  $\text{As(III)}$  na zewnątrz komórki spada dzięki kompleksowaniu z eksportowanym do środowiska glutationem [80]. Wykazano, że w takich warunkach także drożdżowa akwagliceroporyna *Fps1*, obok *Acr3*, bierze udział w transporcie  $\text{As(III)}$  na zewnątrz komórki [52] (Rys. 1B). Zarówno poziom transkrypcji, jak i aktywność tego kanału, jest w komórce precyzyjnie regulowana. Podczas początkowych etapów adaptacji do stresu arsenowego ilość transkryptu genu *FPS1* wykazuje gwałtowny spadek, a białko *Fps1* ulega fosforylacji przez kinazę *Hog1*, co powoduje zamknięcie kanału i ograniczenie akumulacji arsenu [52, 79]. Z czasem jednak ekspresja genu *FPS1* wzrasta, a kanał *Fps1* w błonie komórkowej jest w formie otwartej, co przyczynia się do wyrzutu  $\text{As(III)}$  z cytosolu na zewnątrz komórki [52]. Kolejnym przykładem jest akwagliceroporyna *AqpS* kodowana przez gen wchodzący w skład chromosomowej wersji operonu *ars* o specyficznym składzie *arsRSCH* występującego u symbionta roślin strączkowych *Sinorhizobium meliloti*. *AqpS* wraz z reduktazą arsenianową *ArsC* warunkują u tych bakterii oporność jedynie na  $\text{As(V)}$ , który po redukcji do  $\text{As(III)}$  usuwany jest na zewnątrz komórek zgodnie z gradientem stężeń [94]. U innych bakterii, mianowicie *Frankia alni* i *Salinispora tropica* doszło nawet do fuzji genów kodujących akwagliceroporynę i reduktazę arsenianową w jeden gen, którego ekspresja nadaje dużą oporność na arsenian, ponieważ zredukowany do arseninu jest natychmiast usuwany z komórki przez to samo białko, co zapobiega jego akumulacji w cytoplazmie w oszczędny pod względem zużycia energii sposób [87].

## 7. Podsumowanie

Skażenie wód i gleby wysoce toksycznymi związkami arsenu pochodzenia naturalnego jak i antropogenicznego stanowi poważny problem rolniczy i medyczny



w wielu rejonach świata. Szacuje się, że wiele milionów ludzi jest chronicznie ekspozowanych na niebezpieczne dawki arsenu, co prowadzi u nich do poważnych problemów zdrowotnych, w tym rozwoju różnych nowotworów. Z drugiej strony toksyczne właściwości związków arsenu wykorzystywane są w nowoczesnych chemioterapiach przeciwnowotworowych oraz w leczeniu niektórych tropikalnych chorób pasożytniczych. Niestety terapia z użyciem arsenu często bywa nieskuteczna ze względu na nabywanie przez komórki oporności na ten metaloid. Badania nad molekularnymi mechanizmami działania arsenu (i antymonu), a także drogami wnikania oraz usuwania jego związków obejmujące identyfikację białek zaangażowanych w transport, regulację ich ekspresji i stabilności w błonie, określenie specyficzności substratowej oraz ustalenie mechanizmów translokacji metaloidów są zatem niezbędne i kluczowe nie tylko do zrozumienia molekularnych podstaw tolerancji komórek na metaloidy, ale również do praktycznego wykorzystania tej wiedzy w celu wdrożenia skuteczniejszych metod leczenia. Taka wiedza mogłaby bowiem przyczynić się do opracowania strategii kontrolowania transportu arsenu przez błony umożliwiając, w zależności od potrzeby, zwiększenie lub obniżenie jego stężenia wewnątrzkomórkowego, znalezienia inhibitorów tego transportu, a także sposobów uwrażliwiania docelowych komórek na leki oparte na bazie arsenu.

Jednym z podstawowych i najbardziej wydajnych mechanizmów detoksykacji, zarówno u organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych, jest usuwanie trójwartościowych form arsenu na zewnątrz komórki przez specyficzne transportery. Do dziś najlepiej scharakteryzowanym transporterem arsenowym u organizmów eukariotycznych pozostaje białko Acr3, które po raz pierwszy opisano u drożdży *S. cerevisiae*, chociaż białka z rodziny Acr3 występują nie tylko u grzybów, ale także u archeonów, bakterii, glonów, mchów i paproci. Chociaż homologi Acr3 nie zostały zidentyfikowane u wyższych roślin, drożdżowy gen *ACR3* może być z powodzeniem wprowadzony i eksprymowany w komórkach tych organizmów, co wykazano już np. u ryżu [28]. Potencjalnie możliwe jest więc uzyskanie form transgenicznych także innych roślin uprawnych, które mogłyby być uprawiane na glebach zanieczyszczonych arsenem bez ryzyka akumulacji tego metaloidu w tkankach. Z kolei umiejętność kierowania białek Acr3 do błony wakuolaryjnej, zmniejszenia stopnia ich ekspresji i regulacji samego mechanizmu transportu arsenu mogłaby przyczynić się do zastosowania takich hiperakumulatorowych roślin czy genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów w fito- i bioremediacji skażonych terenów w wielu regionach świata.

## Podziękowania

Praca ta powstała dzięki wsparciu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Opus nr 2012/07/B/NZ1/02804.

## Piśmiennictwo

- Ahn R.W., O'Halloran T.V. i wsp.: A novel nanoparticulate formulation of arsenic trioxide with enhanced therapeutic efficacy in a murine model of breast cancer. *Clin. Cancer. Res.* **16**, 3607–3617 (2010)
- Ajees A.A., Rosen B.P.: As(III) S-adenosylmethionine methyltransferases and other arsenic binding proteins. *Geomicrobiol. J.* **32**, 570–576 (2015)
- 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. *Hematol. Oncol.* doi: 10.1002/hon.2253. (2015)
- Banerjee M., Carew M.W., Roggenbeck B.A., Whitlock B.D., Naranmandura H., Le X.C., Leslie E.M.: A novel pathway for arsenic elimination: human multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) mediates cellular export of dimethylarsinic acid (DMAV) and the diglutathione conjugate of monomethylarsonous acid (MMAIII). *Mol. Pharmacol.* **86**, 168–179 (2014)
- Barrett M.P., Croft S.L.: Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Brit. Med. Bull.* **104**, 175–196 (2012)
- Batista-Nascimento L., Toledano M.B., Thiele D.J., Rodrigues-Pousada C.: Yeast protective response to arsenate involves the repression of the high affinity iron uptake system. *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 997–1005 (2013)
- Bergquist E.R., Fischer R.J., Sugden K.D., Martin B.D.: Inhibition by methylated organo-arsenicals of the respiratory 2-oxo-acid dehydrogenases. *J. Organomet. Chem.* **694**, 973–980 (2009)
- Bhattacharjee P., Banerjee M., Giri A.K.: Role of genomic instability in arsenic-induced carcinogenicity. A review. *Environ. Int.* **53**, 29–40 (2013)
- Bienert G.P., Thorsen M., Schüssler M.D., Nilsson H.R., Wagner A., Tamás M.J., Jahn T.P.: A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)<sub>3</sub> and Sb(OH)<sub>3</sub> across membranes. *BMC Biol.* **6**, 10.1186/1741-7007-6-26 (2008)
- 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. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **3**, 13–20 (1998)
- 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*, **13**, 819–828 (1997)
- Bruhn D.F., Li J., Silver S., Roberto F., Rosen B.P.: The arsenical resistance operon of IncN plasmid R46. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**, 149–153 (1996)
- Bundschuh J., Toujaque R. i wsp.: One century of arsenic exposure in Latin America: a review of history and occurrence from 14 countries. *Sci. Total Environ.* **429**, 2–35 (2012)
- Bustaffa E., Stoccoro A., Bianchi F., Migliore L.: Genotoxic and epigenetic mechanism in arsenic carcinogenicity. *Arch. Toxicol.* **88**, 1043–1067 (2014)
- Carew M.W., Leslie E.M.: Selenium-dependent and -independent transport of arsenic by the human multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2): implications for the mutual detoxification of arsenic and selenium. *Carcinogenesis*, **31**, 1450–1455 (2010)

16. Carlin A., Shi W., Dey S., Rosen B.P.: The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* **177**, 981–986 (1995)
17. Castillo R., Saier M.H.: Functional Promiscuity of Homologues of the Bacterial ArsA ATPases. *FEBS Lett.* **584**, 3089–3094 (2010)
18. Chauhan N.S., Ranjan R., Purohit H.J., Kalia V.C., Sharma R.: Identification of genes conferring arsenic resistance to *Escherichia coli* from an effluent treatment plant sludgemetagenomic library. *FEMS Microbiol. Ecol.* **67**, 130–139 (2009)
19. Chen C.M., Misra T.K., Silver S., Rosen B.P.: Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Biol. Chem.* **261**, 15030–15038 (1986)
20. Chen J., Bhattacharjee H., Rosen B.P.: ArsH is an organoarsenical oxidase that confers resistance to trivalent forms of the herbicide monosodium methylarsenate and the poultry growth promoter roxarsone. *Mol. Microbiol.* **96**, 1042–1052 (2015)
21. Chen J., Madegowda M., Bhattacharjee H., Rosen B.P.: ArsP: a methylarsenite efflux permease. *Mol. Microbiol.* **98**, 625–635 (2015)
22. Chen J., Yoshinaga M., Garbinski L.D., Rosen B.P.: Synergistic interaction of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. *Molecular Microbiology*, **100**, 945–953 (2016)
23. Chou W.C., Jie C., Kenedy A.A., Jones R.J., Trush M.A., Dang C.V.: Role of NADPH oxidase in arsenic-induced reactive oxygen species formation and cytotoxicity in myeloid leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4578–4583 (2004)
24. Deb D., Biswas A., Ghose A., Das A., Majumdar K.K., Mazumder D.N.G.: Nutritional deficiency and arsenical manifestations: a perspective study in an arsenic-endemic region of West Bengal. *Public Health. Nutr.* **16**, 1644–1655 (2013)
25. Dey S., Dou D., Tisa L.S., Rosen B.P.: Interaction of the catalytic and the membrane subunits of an oxyanion-translocating ATPase. *Biochem. Biophys.* **311**, 418–424 (1994)
26. Dey S., Rosen B.P.: Dual mode of energy coupling by the oxyanion-translocating ArsB protein. *J. Bacteriol.* **177**, 385–389 (1995)
27. Dilda P.J., Hogg P.J.: Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat. Rev.* **33**, 542–564 (2007)
28. Duan G., Kamiya T., Ishikawa S., Arai T., Fujiwara T.: Expressing *ScACR3* in rice enhanced arsenite efflux and reduced arsenic accumulation in rice grains. *Plant Cell Physiol.* **53**, 154–163 (2012)
29. Flora S.J., Singh N.: Arsenic induced oxidative stress and the role of antioxidant supplementation during chelation: a review. *J. Environ. Biol.* **28**, 333–347 (2007)
30. Flora S.J.: Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 257–281 (2011)
31. Frézard F., Demicheli C.: New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. *Expert. Opin. Drug Deliv.* **7**, 1343–1358 (2010)
32. Fu H.L., Meng Y., Ordóñez E., Villadangos A.F., Bhattacharjee H., Gil J.A., Mateos L.M., Rosen B.P.: Properties of arsenite efflux permeases (Acr3) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **284**, 19887–19895 (2009)
33. Fu H.L., Rosen B.P., Bhattacharjee H.: Biochemical characterization of a novel ArsA ATPase complex from *Alkaliphilus metalliredigens* QYMF. *FEBS Lett.* **584**, 3089–3094 (2010)
34. Gladysheva T.B., Oden K.L., Rosen B.P.: Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. *Biochemistry*, **33**, 7288–7293 (1994)
35. Hossein M.J., Shaki F., Ghazi-Khansari M., Pourhmad J.: Toxicity of arsenic (III) on isolated liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Iranian J. Pharm. Res.* **12**, 121–138 (2013)
36. Huang L., Wu H., van der Kuijp T.J.: The health effects of exposure to arsenic-contaminated drinking water: a review by global geographical distribution. *Int. J. Environ. Health Res.* **25**, 432–452 (2015)
37. Hughes M.F.: Arsenic toxicity and potential mechanism of action. *Toxicol. Lett.* **133**, 1–16 (2002)
38. Istedt S., Sideri T.C., Grant C.M., Tamás M.J.: Global analysis of protein aggregation in yeast during physiological conditions and arsenite stress. *Biology Open*, **3**, 913–923 (2014)
39. Indriolo E., Na G., Ellis D., Salt D.E., Banks J.A.: A vacuolar arsenite transporter necessary for arsenic tolerance in the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* is missing in flowering plants. *Plant Cell*, **22**, 2045–2057 (2010)
40. International Agency for Research on Cancer: Arsenic, metals, fibres, and dusts. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **100C**, 1–526 (2012)
41. Jena N.R.: DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* **37**, 503–517 (2012)
42. Ji G., Silver S.: Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* **174**, 3684–3694 (1992)
43. Jiao W.T., Chen W.P., Chang A.C., Page A.L.: Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. *Environ. Pollut.* **168**, 44–53 (2012)
44. Kröncke K.D., Klotz L.O. Zinc fingers as biologic redox switches? *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 1015–1027 (2009)
45. Kuroda M., Dey S., Sanders O.I., Rosen B.P.: Alternate energy coupling of ArsB, the membrane subunit of the Ars anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **272**, 326–331 (1997)
46. Lau A., Zheng Y., Tao S., Wang H., Whitman S.A., White E., Zhang D.D.: Arsenic inhibits autophagic flux activating the Nrf2-Keap1 pathway in a p62-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 2436–2446 (2013)
47. Leslie E.M., Haimeur A., Waalkes M.P.: Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.* **279**, 32700–32708 (2004)
48. Lin Y.F., Walmsley A.R., Rosen B.P.: An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15617–15622 (2006)
49. Litwin I., Bocer T., Dziadkowiec D., Wysocki R.: Oxidative stress and replication-independent DNA breakage induced by arsenic in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **9**, e1003640 (2013)
50. López-Maury L., Florencio F.J., Reyes J.C.: Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **185**, 5363–5371 (2003)
51. Maciaszczyk E., Wysocki R., Golik P., Lazowska J., Ulaszewski S.: Arsenical resistance genes in *Saccharomyces douglasii* and other yeast species undergo rapid evolution involving genomic rearrangements and duplications. *FEMS Yeast Res.* **4**, 821–832 (2004)
52. Maciaszczyk-Dziubinska E., Migdal I., Migocka M., Bocer T., Wysocki R.: The yeast aquaglyceroporin Fps1p is a bidirectional arsenite channel. *FEBS Lett.* **584**, 726–732 (2010)
53. Maciaszczyk-Dziubinska E., Migocka M., Wawrzycka D., Markowska K., Wysocki R.: Multiple cysteine residues are necessary for sorting and transport activity of the arsenite permease Acr3p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 747–755 (2014)

54. Maciaszczyk-Dziubinska 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*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1855–1859 (2011)
55. Maciaszczyk-Dziubinska E., Wawrzycka D., Sloma E., Migocka M., Wysocki R.: The yeast permease Acr3p is a dual arsenite and antimonite plasma membrane transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, **1798**, 2170–2175 (2010)
56. Maciaszczyk-Dziubinska E., Wawrzycka D., Wysocki R.: Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 3527–3548 (2012)
57. Mansour N.M., Sawhney M., Tamang D.G., Vogl C., Saier M.H.: The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J.* **274**, 612–629 (2007)
58. Markowska K., Maciaszczyk-Dziubinska E., Migocka M., Wawrzycka D., Wysocki R.: Identification of critical residues for transport activity of Acr3p, the *Saccharomyces cerevisiae* As(III)/H<sup>+</sup> antiporter. *Mol. Microbiol.* **98**, 162–174 (2015)
59. Meng Y.L., Liu Z., Rosen B.P.: As(III) and Sb(III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 18334–18341 (2004)
60. Mukhopadhyay R., Rosen B.P.: *Saccharomyces cerevisiae* ACR2 gene encodes an arsenate reductase. *FEMS Microbiol. Lett.* **168**, 127–136 (1998)
61. Naranmandura H., Suzuki N., Suzuki K.T.: Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1010–1018 (2006)
62. National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (19.07.2016)
63. Naujokas M.F., Anderson B., Ahsan H., Aposhian H.V., Graziano J.H., Thompspon C., Suk W.A.: The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem. *Environ. Health Persp.* **121**, 295–302 (2013)
64. Noormohamed A., Fakhr M.K.: Arsenic resistance and prevalence of arsenic resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from retail meats. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 3453–3464 (2013)
65. Pan X., Reissman S., Douglas N.R., Huang Z., Yuan D.S., Wang X., McCaffery J.M., Frydman J., Boeke J.D.: Trivalent arsenic inhibits the functions of chaperonin complex. *Genetics*, **186**, 725–734 (2010)
66. Qi Y., Li H., Zhang M., Zhang T., Frank J., Chen G.: Autophagy in arsenic carcinogenesis. *Exp. Toxicol. Pathol.* **66**, 163–168 (2014)
67. Rosen B.P., Weigel U., Karkaria C., Gangola P.: Molecular characterization of an anion pump. The *arsA* gene product is an arsenite (antimonate)-stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* **263**, 3067–3070 (1988)
68. Rosen B.P.: Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters*, **529**, 86–92 (2002)
69. Rosenstein R., Peschel A., Wieland B., Götz F.: Expression and regulation of the antimoonite, arsenite, and arsenate resistance operon of *Staphylococcus xylosum* plasmid pSX267. *J. Bacteriol.* **174**, 3676–3683 (1992)
70. Sahoo P.K., Kim K.: A review of the arsenic concentration in paddy rice from the perspective of geoscience. *Geosci. J.* **17**, 107–122 (2013)
71. Sarkar A., Paul B.: The global menace of arsenic and its conventional remediation – A critical review. *Chemosphere*, **158**, 37–49 (2016)
72. Sato T., Kobayashi Y.: The *ars* operon in the *skin* element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J. Bacteriol.* **180**, 1655–1661 (1998)
73. Shen S., Li X.F., Cullen W.R., Weinfeld M., Le X.C.: Arsenic binding to proteins. *Chem. Rev.* **113**, 7769–7792 (2013)
74. Subbarayan P.R., Ardalán B.: In the war against solid tumors arsenic trioxide needs partners. *J. Gastrointest. Cancer.* **45**, 363–371 (2014)
75. Sumi D., Taguchi K., Sun Y., Shinkai Y., Kumagai Y.: Monomethylarsonous acid inhibits endothelial nitric oxide synthase activity. *J. Health Sci.* **51**, 728–730 (2005)
76. Tamás M.J., Sharma S.K., Ibstedt S., Jacobson T., Christen P.: Heavy metals and metalloids as a cause for protein misfolding and aggregation. *Biomolecules*, **4**, 252–267 (2014)
77. Tan X., Yang L., Xian L., Huang J., Di C., Gu W., Guo S., Yang L.: ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) promotes arsenic tolerance in human cells by reducing cellular arsenic accumulation. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.* **41**, 287–294 (2014)
78. Thomas D.J., Li J., Waters S.B., Xing W., Adair B.M., Drobná Z., Devesa V., Styblo M.: Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med.* **232**, 3–11 (2007)
79. Thorsen M., Di Y., Tangemo C., Morillas M., Ahmadpour D., Van der Does C., Wagner A., Johansson E., Posas F., Wysocki R., Tamás M.J.: The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in budding yeast. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4400–4410 (2006)
80. Thorsen M., Jacobson T., Vooijs R., Navarrete C., Bliet T., Schat H., Tamás M.J.: Glutathione serves an extracellular defence function to decrease arsenite accumulation and toxicity in yeast. *Mol. Microbiol.* **84**, 1177–1188 (2012)
81. Tisa L.S., Rosen B.P.: Molecular characterization of an anion pump. The ArsB protein is the membrane anchor for the ArsA protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 190–194 (1990)
82. Villadangos A.F., Fu H.L., Gil J.A., Messens J., Rosen B.P., Mateos L.M.: Efflux permease CgAcr3-1 of *Corynebacterium glutamicum* is an arsenite-specific antiporter. *J. Biol. Chem.* **287**, 723–735 (2012)
83. Wang Y., Yang J., Yi J.: Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 649–657 (2012)
84. Wang Z., Zhang H., Li X.F., Le X.C.: Study of interactions between arsenicals and thioredoxins (human and *E. coli*) using mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **21**, 3658–3666 (2007)
85. Wawrzycka D., Sobczak I., Bartosz G., Bocér T., Ulaszewski S., Goffeau A.: Vmr1p is a novel vacuolar multidrug resistance ABC transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **10**, 828–838 (2010)
86. WHO: Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organisation **4**, 315–318 (2011)
87. Wu B., Song J., Beitz E.: Novel channel-enzyme fusion proteins confer arsenate resistance. *J. Biol. Chem.* **285**, 40081–40087 (2010)
88. Wu J., Rosen B.P.: The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein. *Mol. Microbiol.* **5**, 1331–1336 (1991)
89. Wu J., Tisa L.S., Rosen B.P.: Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 12570–12576 (1992)
90. Wysocki R., Bobrowicz P., Ulaszewski S.: The *Saccharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J. Biol. Chem.* **272**, 30061–30066 (1997)
91. Wysocki R., Clemens S., Augustyniak D., Golik P., Maciaszczyk E., Tamás M.J., Dziadkowiec D.: Metalloid tolerance based on phytochelatin is not functionally equivalent to the arsenite transporter Acr3p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 293–300 (2003)
92. Wysocki R., Fortier P.K., Maciaszczyk E., Thorsen M., Leduc A., Odhagen A., Owsianik G., Ulaszewski S., Ramotar D., Tamás M.J.:

- Transcriptional activation of metalloid tolerance genes in *Saccharomyces cerevisiae* requires the AP-1-like proteins Yap1p and Yap8p. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2049–2060 (2004)
93. Xia X., Baldwin S.A. i wsp.: Investigation of the structure and function of a *Shewanella oneidensis* arsenical-resistance family transporter. *Mol. Membr. Biol.* **25**, 691–705 (2008)
94. Yang H.C., Cheng J., Finan T.M., Rosen B.P., Bhattacharjee H.: Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **187**, 6991–6997 (2005)
95. Yang H.C., Fu H.L., Lin Y.F., Rosen B.P.: Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr. Top. Membr.* **69**, 325–358 (2012)
96. Yang H.C., Rosen B.P.: New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomedical Journal*, **39**, 5–13 (2016)
97. Yang Y., Wu S., Lilley R.M., Zhang R.: The diversity of membrane transporters encoded in bacterial arsenic-resistance operons. *PeerJ* **3**:e943 (2015)
98. Ye J., Rensing C., Rosen B.P., Zhu Y.G.: Arsenic biomethylation by photosynthetic organisms. *Trends Plant Sci.* **17**, 155–162 (2012)
99. Yoshinaga M., Rosen B.P.: A C-As lyase for degradation of environmental organoarsenical herbicides and animal husbandry growth promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 7701–7706 (2014)
100. Zhao L., Chen S., Jia L., Shu S., Zhu P., Liu Y.: Selectivity of arsenite interaction with zinc finger proteins. *Metallomics*, **4**, 988–994 (2012)
101. Zhao Y., Toselli P., Li W.: Microtubules as a critical target for arsenic toxicity in lung cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **9**, 474–495 (2012)
102. Zheng W., Scifleet J., Yu X., Jiang T., Zhang R.: Function of arsATorf7orf8 of *Bacillus* sp. CDB3 in arsenic resistance. *J. Environ. Sci.* **25**, 1386–1392 (2013)
103. Zhou X., Cooper K.L., Sun X., Liu K.J., Hudson L.G.: Selective Sensitization of Zinc Finger Protein Oxidation by ROS Through Arsenic Binding. *J. Biol. Chem.* **290**, 18361–18369 (2015)
104. Zhu Y.G., Yoshinaga M., Zhao F.J., Rosen B.P.: Earth abides arsenic biotransformations. *Annu. Rev. Earth and Planet Sci.* **42**, 443–467 (2014)