

Received: 2012.10.18
Accepted: 2013.02.15
Published: 2013.04.04

Mechanizmy oporności drożdży na stres środowiskowy*

Mechanisms of yeast resistance to environmental stress

Agata Piecuch, Ewa Obłąk

Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie

Zmiany warunków środowiska stanowią dla komórek drożdży stres. Aby się przed nim obronić komórki wykształciły mechanizmy tolerancji na stres, które uaktywniają się pod wpływem bodźca stresowego. W koordynacji ekspresji genów odpowiedzi na stres biorą udział różne czynniki transkrypcyjne np. Msn2/4p, które regulują ekspresję genów tzw. ogólnej odpowiedzi na stres. W obronę przed szokiem termicznym zaangażowane są białka Hsp, kontrolowane przez czynnik Hsf1p. Szok osmotyczny indukuje kaskadę kinaz MAP (HOG), natomiast odpowiedź na stres oksydacyjny wymaga kontroli przez sieć YAP. Oporność na fungicydy uwarunkowana jest głównie aktywnością transporterów błonowych i zmianami w obrębie struktury błony komórkowej.

Słowa kluczowe: oporność • stres • *Saccharomyces cerevisiae*

Summary

Changes in environmental conditions might be a stress factor for yeast cells. There are several mechanisms of stress tolerance, developed by the cell, which activate when the stress appears. Different transcription factors coordinate the expression of stress response genes. Msn2/4p regulate the expression of the general stress response. Heat shock defense involves heat shock proteins (Hsp), controlled by Hsf1p. Osmotic shock induces the MAP kinase cascade (HOG), whereas the oxidative stress response requires the YAP network. Fungicide resistance is mediated mainly by the activity of membrane transporters and changes in the structure of the plasma membrane.

Keywords: resistance • stress • *Saccharomyces cerevisiae*

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1043394>

Word count: 7545
Tables: –
Figures: 3
References: 149

Adres autorki: dr hab. Ewa Obłąk, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław, e-mail: ewa.oblak@micro.uni.wroc.pl

*Praca częściowo finansowana z 1016/S/IGM/2012.

OGÓLNA ODPOWIEDŹ NA STRES

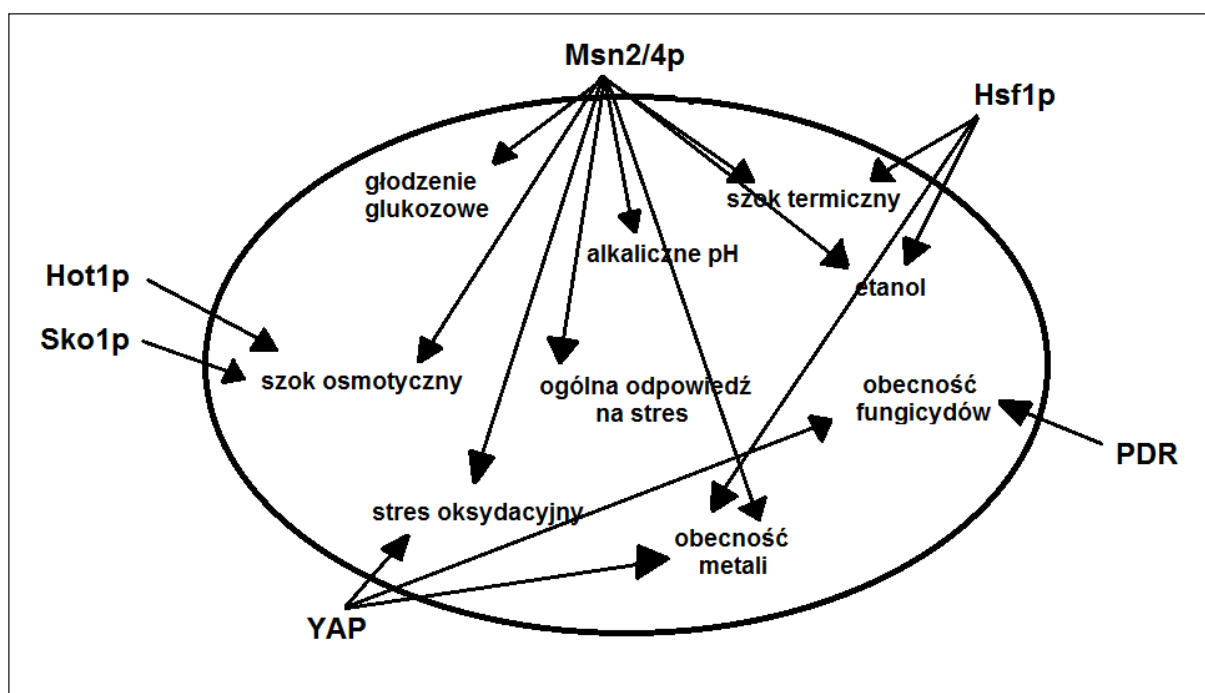
Nawet najdrobniejsze fluktuacje środowiskowe powodują zmiany w ekspresji genów. W tzw. powszechną odpowiedź środowiskową (CER) zaangażowanych jest prawie 800 genów, z czego około 300 ulega indukcji (np. geny glikolizy, syntezy trehalozy, degradacji białek), a pozostałe represji (geny zaangażowane w translację i syntezę białek) [28]. Wiele z indukowanych genów znajduje się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych Msn2p i Msn4p, które realizują program ogólnej odpowiedzi na stres. Czynniki te regulują ekspresję genów docelowych w odpowiedzi m.in. na szok termiczny, szok osmotyczny, zmiany pH, stres oksydacyjny, głodzenie glukozowe i wysokie stężenie etanolu (ryc. 1.) [23].

W części N-końcowej czynniki transkrypcyjne Msn2/4p mają region lokalizacji jądrowej (NLS) oraz sygnał eksportu jądrowego (NES). Za rozpoznanie charakterystycznej sekwencji STRE (stress response element) w promotorze genu docelowego odpowiedzialny jest motyw palca cynkowego znajdujący się w pobliżu C-końca czynników transkrypcyjnych [119].

Ekspresja *MSN2* jest konstytutywna niezależnie od warunków środowiska, natomiast ekspresja *MSN4* zależy od czynników Msn2/4p i jest indukowana stresem. Aktywacja genów obrony przed perturbacjami środowiskowymi zależy od jądrowej lokalizacji czynnika transkrypcyjnego. W warunkach optymalnych dla komórki czynniki Msn2p i Msn4p znajdują się w cytoplazmie, ale pojawienie się sygnałów stresowych indukuje akumulację czynników transkrypcyjnych w jądrze. Mechanizm kontroli lokalizacji subkomórkowej Msn2/4p jest ściśle regulowany przez szlak sygnałny cAMP

zarówno na poziomie importu, jak i eksportu jądrowego. Lokalizacja subkomórkowa Msn2/4p jest kontrolowana przez kinazy białkowe (PKA) zależne od cAMP [31]. W warunkach fizjologicznych poziom cAMP i aktywność kinaz PKA jest na wysokim poziomie. Kinazy PKA (Tpk1/2/3p) fosforylują domenę NLS czynników Msn2/4p, co skutkuje ich cytoplazmatyczną lokalizacją, gdzie kotwiczone są przez białko Bmh2p. Dane wskazują, że w utrzymaniu Msn2/4p w cytoplazmie bierze udział także szlak TOR (target of rapamycin). Obecność rapamycyny hamującej szlak TOR powodowała odłączenie Msn2/4p od Bmh2p i translokację do jądra. Sugeruje to istnienie dwóch szlaków fosforylacji regulujących lokalizację komórkową w odpowiedzi na stres [119]. Różnego rodzaju bodźce stresowe powodują spadek poziomu cAMP i zahamowanie aktywności kinaz PKA, co skutkuje defosforylacją miejsc PKA w czynnikach transkrypcyjnych. Po ustaniu warunków stresowych Msn2/4p eksportowane są z jądra do cytoplazmy dzięki aktywności eksportyny Msn5p [21].

Po imporcie do jądra Msn2/4p rozpoznają swoistą sekwencję w promotorach genów docelowych (STRE). Element ten jest funkcjonalny w dwóch orientacjach: AGGGG i CCCCT. Jedna kopia tej sekwencji jest wystarczająca do aktywacji transkrypcji genu, ale dwie lub trzy kopie znacząco zwiększają ekspresję. Geny docelowe dla Msn2/4p mogą być ekspresjonowane różnymi drogami. Jest to prawdopodobnie związane z występowaniem w ich promotorach także innych sekwencji regulatorowych (np. HSE – heat shock element czy ARE – AP-1 recognition element). Proces wiązania elementu STRE i czynnika transkrypcyjnego kontrolowany jest przez kinazę białkową Gsk3p i zależy od czynnika stresowego [46].



Ryc. 1. Zaangażowanie czynników transkrypcyjnych w odpowiedź na różne bodźce stresowe

Geny *MSN2* i *MSN4* początkowo zostały zidentyfikowane jako supresory defektu inwertazy u mutantów kinazy *Snf1p* [23]. Mimo dużej homologii obu genów i podobnej funkcji obu czynników transkrypcyjnych, niektóre badania wskazują na różnice w regulacji odpowiedzi na stres. Aktywność *Msn2p* i *Msn4p* może się różnić w zależności od bodźca stresowego [22], inne jest także powinowactwo niektórych genów docelowych do tych czynników transkrypcyjnych [135]. Interesujące wyniki uzyskali Jacquet i wsp. [49], w których wykazali, że brak podjednostki katalitycznej PKA u mutantów *pde2* skutkowało stałą lokalizacją jądrową czynnika *Msn2p*, podczas gdy *Msn4p* wciąż oscylował między jądrem a cytoplazmą. Dane te sugerują różnice w podatności obu czynników na szlak cAMP-PKA lub różnice w kontroli lokalizacji jądrowej.

W zależności od rodzaju bodźca stresowego inna jest droga aktywacji czynników transkrypcyjnych *Msn2/4p*. Geny, których ekspresja jest indukowana przez te czynniki kodują m.in. białka metabolizmu węglowego, syntezy trehalozy, białka ochronne (*Hsp*, *Ctt1p*) oraz transportery [28].

Głodzenie glukoze i alkaliczne pH

Glukoza jest preferowanym źródłem węgla dla drożdży, dlatego komórki wykształciły wiele mechanizmów wyczuwania glukozy i przekazywania sygnałów glukozowych. Gdy w środowisku znajduje się glukoza, odbierana jest ona przez receptory znajdujące się w błonie komórkowej. Głównym sensorem glukozy (a także sacharozę i feromonów) jest system GPCR (G protein-coupled receptor) złożony z receptora *Gpr1p* (który bezpośrednio wiąże cukier), białka *G - Gpa2p* i jego regulatora *Rgs2p* [110]. Dodanie glukozy do uprzednio głodzonych komórek powoduje aktywację cykazy adenylanowej przez *Gpa2p*, czego wynikiem jest wzrost poziomu cyklicznego AMP. cAMP aktywuje kinazy białkowe PKA, które z kolei hamują import jądrowy *Msn2/4p* i aktywują ich eksport z jądra. Nagły spadek zawartości glukozy (obserwowany np. przy przejściu do wykładniczej fazy wzrostu) w środowisku skutkuje silnymi zmianami w ekspresji genów. W takich warunkach poziom cAMP jest niski, a kinazy PKA nie są aktywne. Domena NLS czynników *Msn2/4p* jest defosforylowana, dzięki czemu możliwy jest import tych czynników transkrypcyjnych do jądra i aktywacja ekspresji m.in. genów związanych z wykorzystaniem alternatywnego źródła węgla czy kodujących białka ochronne. Gdy komórki zaadaptują się do nowych warunków środowiskowych, nadekspresja genów stresowych nie jest konieczna. Wtedy aktywowana jest kinaza *Snf1p*, która hamuje import jądrowy *Msn2/4p* [31,92].

Jeśli podczas wzrostu hodowli drożdżowej glukoza zawarta w podłożu ulega wyczerpaniu, komórki zmieniają swój metabolizm na tlenowy. Taka nagła zmiana powoduje wzrost zawartości reaktywnych form tlenu, co jest stresem oksydacyjnym dla komórki. Sygnały stresowe są odbierane przez białko *Mtl1p*, którego zadaniem jest inaktywacja szlaku TOR (target of rapamycin). Kinazy białkowe TOR należą do konserwatywnej rodziny kinazy fosfatydiloinozytoli

i pełnią wiele istotnych funkcji w komórce, m.in. regulują transkrypcję i translację, biorą udział w wyczuwaniu składników odżywczych, a także regulują różnicowanie komórek i wzrost filamentarny [19]. Drożdże zawierają dwa wielobiałkowe kompleksy TOR: TORC1 i TORC2. TORC1 bierze udział m.in. w represji transkrypcji niektórych genów w odpowiedzi na głodzenie. Składa się z *Tor1p* lub *Tor2p* oraz białek *Kog1p*, *Lst8p*, *Tco89p* i jest wrażliwy na rapamycynę, która wiąże białka Tor i hamuje aktywność kompleksu. TORC2 umiejscowiony jest w obrębie lub w pobliżu błony komórkowej i jest niewrażliwy na rapamycynę. W jego skład wchodzi białka: *Tor2p*, *Avo1-3p*, *Lst8p* i *Bit61p*. Białka te są zaangażowane m.in. w polaryzację cytoszkieletu aktynowego podczas progresji cyklu komórkowego i w regulację integralności ściany komórkowej [71]. Szlak TOR w warunkach fizjologicznych utrzymuje czynniki transkrypcyjne *Msn2/4p* w cytoplazmie, więc gdy pod wpływem bodźca stresowego zostanie wyłączony, *Msn2/4p* akumuluje się w jądrze i aktywują ekspresję genów stresowych [99].

Wzrost drożdży jest wydajniejszy, gdy pH podłoża jest kwaśne niż w warunkach neutralnego lub alkalicznego pH, dlatego nawet najmniejszy wzrost pH środowiska stanowi dla komórek drożdży stres. Alkaliczacja środowiska zaburza przede wszystkim homeostazę składników odżywczych i wpływa na ekspresję genów pobierania i metabolizmu glukozy. Wysokie pH powoduje przejściowy spadek stężenia cAMP i zahamowanie aktywności kinaz PKA. W wyniku inhibicji PKA czynniki *Msn2/4p* ulegają szybkiej akumulacji w jądrze komórkowym i aktywują geny odpowiedzi na stres, związane m.in. z syntezą trehalozy [16].

Alkaliczacja aktywuje również inne szlaki sygnałne, niezwiązane z ogólną odpowiedzią na stres. Jednym z nich jest szlak wapń/kalcyneuryna. Gdy pH środowiska wzrasta następuje wzmoczony napływ jonów wapnia ze środowiska zewnętrznego do komórki. Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia aktywuje kalcyneurynę, która fosforyluje i aktywuje import jądrowy czynników transkrypcyjnych (np. *Sko1p*) odpowiedzialnych za indukcję różnych genów (jednym z genów aktywowanych na drodze tego szlaku jest *ENA1* kodujący ATPazę sodową) [101].

Stres etanolowy

Drożdże piekarskie są powszechnie wykorzystywane w produkcji napojów alkoholowych, dlatego ważne jest, aby w ich komórkach istniały mechanizmy tolerancji na wysokie stężenia etanolu. Alkohol jest znanym inhibitorem wzrostu, prowadzącym do uszkodzeń mitochondrialnego DNA, inaktywacji niektórych enzymów oraz zaburzeń składu lipidowego błony komórkowej. Dane literaturowe wskazują, że tolerancji na podwyższone stężenie etanolu towarzyszy wzrost stosunku ergosterolu do fosfolipidów oraz zwiększenie ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych [17]. Stres etanolowy indukuje ekspresję genów *TPS1* i *TPS2*, które kodują białka szlaku syntezy trehalozy. Trehaloza pełni w komórce rolę ochronną i jest jedną z determinant oporności na etanol. Ponadto następu-

je indukcja ekspresji białek szoku termicznego Hsp104p, Hsp70p i Hsp26p przy stężeniu etanolu do 10% oraz białka Hsp30p, które negatywnie reguluje H⁺-ATP-azę błonową. Ekspresja większości genów zaangażowanych w odpowiedź na etanol jest pod kontrolą czynników ogólnej odpowiedzi na stres Msn2/4p [33].

SZOK TERMICZNY

Nagły wzrost temperatury powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. W tym czasie zachodzą zmiany warunkujące tolerancję komórki na wzrost w wysokiej temperaturze. Głównymi mechanizmami obrony przed stresem temperaturowym jest wytwarzanie białek kodowanych przez geny ogólnej odpowiedzi na stres oraz białek szoku termicznego. Pod wpływem szoku termicznego, a także innych warunków stresowych (m.in. niskie temperatury, stres osmotyczny i etanolowy) w komórkach drożdży akumulowane są duże ilości trehalozy.

Trehaloza stanowi rezerwy węglowodanów w komórkach, więc może być źródłem energii w czasie głodu, na co wskazuje jej wzrost w komórkach w stacjonarnej fazie wzrostu. Trehaloza syntetyzowana jest przez kompleks syntazy trehalozy, składający się z 3 podjednostek: Tps1p (syntaza trehalozo-6-fosforanu), Tps2p (fosfataza trehalozo-6-fosforanu) Tsl1p/Tps3p (podjednostka regulacyjna). Jej degradacja zachodzi po ustąpieniu warunków stresowych i warunkuje ją aktywność dwóch trehalaz: Nth1p (neutralna trehalaza cytoplazmatyczna) i Ath1p (wakuolarna trehalaza kwaśna). Geny kodujące białka syntezy i degradacji trehalozy mają w swoich promotorach sekwencję STRE, więc podlegają kontroli czynników transkrypcyjnych ogólnej odpowiedzi na stres Msn2p i Msn4p [80; 125].

Podczas stresu środowiskowego trehaloza pełni rolę ochronną dla białek i lipidów błonowych, stabilizując je i utrzymuje integralność strukturalną komórki. Ochronne działanie trehalozy nie jest w pełni wyjaśnione. Jedną z hipotez zakłada stabilizację białek, głównie podczas stresu termicznego, przez tworzenie wiązań wodorowych z polarnymi resztami białkowymi, chroniąc białka przed denaturacją i zapobiegając fuzji błon w komórce [79]. Drastyczny wzrost trehalozy w komórce powoduje wzrost osmolarności komórki, zwiększając siłę mechaniczną ściany komórkowej i jej oporność na enzymy lityczne [127].

Jedną z najistotniejszych zmian zachodzących w komórce pod wpływem szoku termicznego jest indukcja wytwarzania białek szoku termicznego HSP (heat shock proteins). Białka te spełniają różnorodne funkcje w komórce i biorą udział w wielu procesach, takich jak: podział komórkowy, synteza DNA, transkrypcja i translacja, fałdowanie i transport białek. Białka HSP zgrupowane są w kilku rodzinach.

Do rodziny Hsp70p, należą białka szoku termicznego o masie ~70 kDa będące jednymi z najbardziej konserwatywnych w komórce. Wszystkie Hsp70 wiążą się do hydrofobowej powierzchni białek, zwłaszcza tych niesfałdowanych, zapobiegając niepożądanym interakcjom pro-

wadzącym do agregacji i indukując fałdowanie białek [124]. W swej strukturze białka te mają trzy domeny strukturalne: N-końcową domenę NBD (nucleotid binding domain), poprzedzającą domenę wiążącą substrat (SBD) oraz C-końcową domenę CTD, która pomaga przyłączyć substrat do domeny SBD. Funkcjonalność białek Hsp70p zależy od koordynacji działania wszystkich trzech domen. Związanie substratu następuje w hydrofobowej kieszeni SBD, a jego powinowactwo jest zależne od związanego przez domenę NBD nukleotydu. Gdy NBD wiąże ATP powinowactwo do substratu jest niższe i wzrasta, gdy związane jest ADP. Związanie danego nukleotydu skorelowane jest z położeniem CTD, która znajduje się blisko kieszeni SBD, gdy do domeny NBD przyłączone jest ADP. Taka konformacja zapobiega uwalnianiu związanego substratu [42]. Hydroliza ATP powoduje zmiany konformacyjne sprzyjające komunikacji między obiema domenami, co skutkuje uwolnieniem substratu. Jednocześnie związanie substratu zmienia strukturę domeny SBD, co przekazuje sygnał do hydrolizy ATP. Następnie czynniki wymiany nukleotydów (Fes1p i Sse1p) promują odłączenie ADP, powrót Hsp70p do stanu niskiego powinowactwa i uwolnienie substratu, który może osiągnąć odpowiednią konformację do czasu degradacji [53].

Drożdże zawierają przynajmniej 9 białek Hsp70p umiejscowionych w cytoplazmie (Ssa1-4p, Ssb1/2p, Sse1/2p, Ssz1p), 2 występujące w retikulum endoplazmatycznym (Kar2p, Lhs1p) i 3 mitochondrialne Hsp70p (Ssc1p, Ssq1p i Ecm10p). Fałdowanie białek i zapewnienie ich natywnej konformacji jest jedną z podstawowych funkcji białek Ssa i Ssb. Białka Ssb1/2p są związane z rybosomami i ułatwiają elongację łańcuchów polipeptydowych na wczesnych etapach syntezy, natomiast aktywność białek Ssa (Ssa1-4p) przejawia się w późniejszych etapach biosyntezy przez ułatwianie translokacji polipeptydów z nabytą strukturą drugorzędową. Ponadto wykazano, że białko Ssb1p pośredniczy w kierowaniu białek na szlak degradacji [9].

Białka Kar2p i Lhs1p zlokalizowane są w retikulum endoplazmatycznym. Dane wskazują, że Kar2p jest niezbędne w utrzymaniu homeostazy w komórce i pośredniczy m.in. w transporcie niedojrzałych polipeptydów do światła retikulum, fałdowaniu polipeptydów i kierowaniu źle sfałdowanych białek na szlak degradacji. Tak jak wszystkie białka Hsp70p, Kar2p współdziała z czynnikiem wymiany nukleotydu. Badania wykazują, że tym czynnikiem dla Kar2p jest białko Lhs1p i stymuluje ono uwolnienie związanego z Kar2p nukleotydu, co pozwala na kilkukrotne powtórzenie cyklu przez Kar2p [40, 137].

Mitochondrialne białka Hsp70p (Ssc1p, Ssq1p i Ecm10p) znajdują się w macierzy mitochondrialnej i zaangażowane są w transport prekursorów białkowych z cytoplazmy do macierzy mitochondrialnej [70]. Interakcje białek Ssc1p i Ssq1p z czynnikiem NEF (czynnik uwolnienia nukleotydu) Mge1p znajdującym się w błonie mitochondrialnej wspomagają fałdowanie i oligomeryzację prekursorów białek oraz degradację źle sfałdowanych polipeptydów. Białko Ecm10p, podobnie jak Ssc1p i Ssq1p, bierze udział

w transporcie białek do mitochondrium, jednak pierwotnie zostało ono zidentyfikowane jako białko zaangażowane w biosyntezę ściany komórkowej. Ponadto badania wskazują na udział Ecm10p w rozplataniu mitochondrialnego DNA, ponieważ wpływa ono na aktywność endonukleazy mitochondrialnej (Sce1p) [115].

Kolejnym białkiem szoku termicznego jest Hsp104p. Jest to białko ogólnej odpowiedzi na stres, a jego rola, w przeciwieństwie do pozostałych Hsp polega na demontowaniu agregatów białkowych powstałych na skutek stresu [96]. Hsp104p może występować w komórce w nieaktywnej formie mono-, di- i trimerycznej lub jako aktywny heksamer w kształcie pierścienia. Podczas demontowania agregatów, białka substratowe są rozfałdowywane i przemieszczane przez pierścień Hsp104p. Powstawanie aktywnej postaci Hsp104p jest zależne od związanego nukleotydu i regulowane przez domenę NBD2 (jedną z dwóch domen NBD białka Hsp104p). NBD2 jest domeną regulatorową o słabej aktywności ATP-azowej. Hydroлиза ATP zachodzi z udziałem domeny NBD1, która dostarcza energii do rozdzielania agregatów. Związany nukleotyd określa również powinowactwo Hsp104p do substratów. Związanie ADP skutkuje niskim powinowactwem, natomiast stan związania ATP wysokim [12,44,74].

Ekspresja białka Hsp104p znajduje się w komórce na niskim poziomie w warunkach fizjologicznych. Stres termiczny, etanolowy oraz obecność metali (np. arsenu) indukuje ekspresję tego białka, co zapewnia ochronę komórki przed zniszczeniami spowodowanymi tymi czynnikami. Za indukcję wytwarzania Hsp104p odpowiadają czynniki Msn2/4p oraz czynnik Hsf1p [32,117].

Hsp60p znajduje się w mitochondriach i wymagane jest do fałdowania białek importowanych do macierzy mitochondrialnej. Dane wskazują także na udział Hsp60p w replikacji mtDNA i transmisji nukleotydów [56]. Wykazano również, że białko to zapobiega uszkodzeniom komórkowym powstającym w wyniku egzogennej i endogennej stresu oksydacyjnego. Hsp60p chroni przed inaktywacją oksydacyjną mitochondrialne enzymy zależne od żelaza (akonitaza, dehydrogenaza bursztynianowa) [15].

Hsp12p, zlokalizowane w błonie komórkowej drożdży, chroni błonę przed odwodnieniem. Białko to umiejscawia się również w ścianie komórkowej i cytoplazmie, nadając sztywność i barotolerancję komórce. Ekspresja genu *HSP12* indukowana jest w odpowiedzi na wiele czynników stresowych – szok termiczny, osmotyczny, stres oksydacyjny, wysokie stężenie alkoholi oraz niską temperaturę (0 i 4°C) [142]. Regulacja ekspresji *HSP12* przejawia się na poziomie ogólnej odpowiedzi na stres przez czynniki transkrypcyjne Msn2/4p oraz dzięki obecności elementu HSE w promotorze, do którego wiąże się czynnik Hsf1p. Ekspresja genu *HSP12* jest regulowana także przez czynnik Hot1p na drodze szlaku kinaz HOG [2,103].

Shok termiczny indukuje także ekspresję tzw. małych białek szoku termicznego (sHsp). Do tej grupy należy m.in.

Hsp26p i Hsp42p, które są cytoplazmatycznymi chaperonami, zapobiegającymi powstawaniu agregatów niesfałdowanych białek. Białka substratowe mogą następnie ulec uwolnieniu i sfałdowaniu. Hsp42p funkcjonuje zarówno w warunkach fizjologicznych jak i stresowych, natomiast Hsp26p jedynie w komórkach poddanych stresowi. Poziom ekspresji *HSP26* jest zwiększony w różnych warunkach stresowych: szok cieplny, głodzenie azotowe i węglowe, stres oksydacyjny i niskie pH. W takich warunkach wytwarzanie Hsp26p jest indukowane przez czynniki transkrypcyjne Msn2/4p oraz Hsf1p [3; 145].

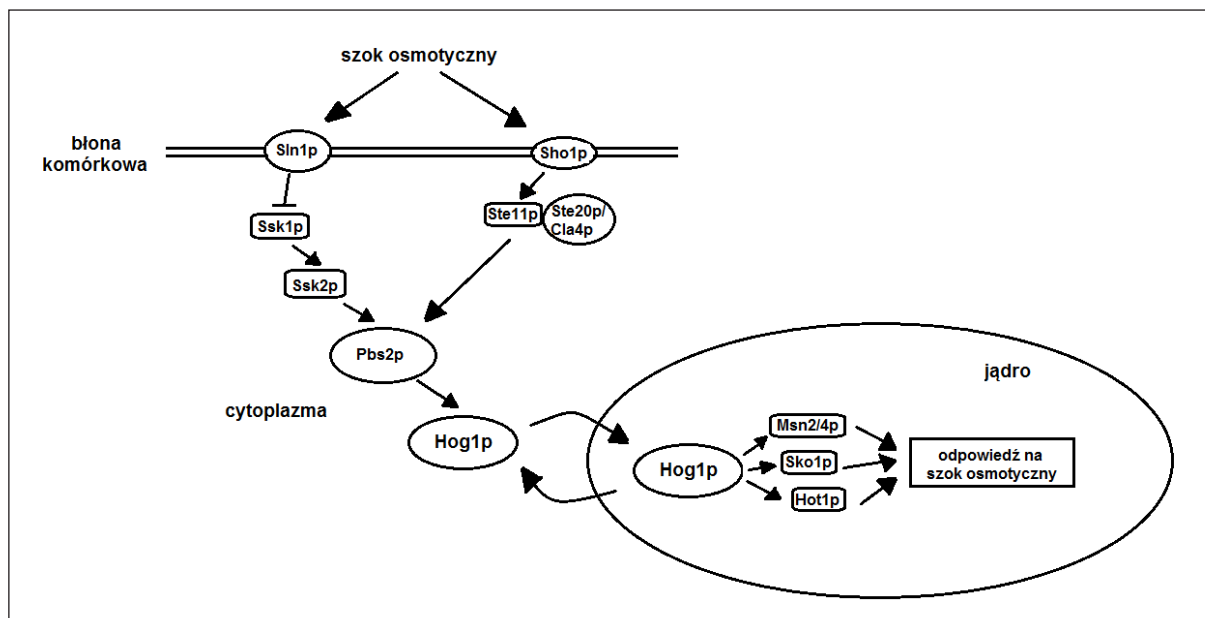
Białka Hsp90p występują w dwóch izoformach – Hsp82p i Hsc82p. Ich aktywność jest wymagana do fałdowania swoistych białek, które trudno podlegają temu procesowi, jak i do ponownego fałdowania zdenaturowanych białek [89]. Białka Hsp90p funkcjonują jako dimery, a ich zdolność fałdowania białek zależna jest od aktywności ATP-azowej. Hsp90p są wymagane do aktywacji wielu białek regulatorowych i sygnalnych, takich jak kinazy i czynniki transkrypcyjne. Poziom ekspresji białka Hsc82p jest wysoki w warunkach fizjologicznych i nieznacznie wzrasta w odpowiedzi na stres cieplny. Natomiast ekspresja Hsp82p silnie wzrasta w warunkach stresowych (np. szok termiczny) [14,108].

Za białko szoku termicznego uznawana jest także ubikwityna, ponieważ ekspresja genu *UBI4* silnie wzrasta pod wpływem różnych czynników stresowych. W wyniku zmienionych warunków środowiska białka mogą ulec denaturacji. Ubikwityna przyłączana jest do tych białek, co jest sygnałem do ich selektywnej i nielizosomalnej proteolizy. Badania wykazały, że mutanty *ubi4* są wrażliwe na różne czynniki stresowe (wysoka temperatura, głodzenie). Inne białka zaangażowane w odpowiedź na stres termiczny to m.in. YscEp (proteaza degradująca kompleksy ubikwityna-białko), białka glikolityczne (np. enolaza, kinaza fosfoglicerynianowa), podnoszące poziom ATP w komórce oraz Ctt1p (katalaza T będąca pod negatywną kontrolą cAMP) [77].

Regulacja odpowiedzi na szok termiczny

Białka szoku termicznego uczestniczą w istotnych procesach biologicznych, takich jak synteza, fałdowanie, transport, dojrzewanie i degradacja białek, organizacja ściany komórkowej czy regulacja cyklu komórkowego. Niektóre z białek Hsp wytwarzane są konstytutywnie w fizjologicznych warunkach, ekspresja innych jest silnie indukowana w odpowiedzi na stres. W regulację transkrypcji genów kodujących białka zaangażowane w adaptację do warunków stresowych biorą udział różne czynniki transkrypcyjne m.in. Hsf1p i Msn2/4p [131].

Białko Hsf1p jest konserwatywnie ewolucyjnie od drożdży po wyższe organizmy eukariotyczne. Jego struktura obejmuje kilka modułów niezbędnych do funkcjonowania białka. Domena wiążąca DNA (DBD), zawierająca motyw helisa-zwrot-helisa, utworzona jest przez reszty aminokwasowe 167-284. Jest ona niezbędna do rozpoznania elementu HSE (heat shock response element) w promotorze genu



Ryc. 2. Szlak kinaz MAP HOG w odpowiedzi na szok osmotyczny

docelowego. Innym istotnym regionem jest domena oligomeryzacji, odpowiedzialna za utworzenie trimery Hsf1p [120]. Na N-końcu i C-końcu znajdują się dwie domeny aktywacyjne (AR1 i AR2). W strukturze białka znajduje się również domena regulacji negatywnej (CE2) oraz region CTM, który redukuje aktywność CE2 [116].

Czynnik Hsf1p rozpoznaje element HSE w promotorach genów docelowych. Podstawowa sekwencja elementu HSE składa się z 5 par zasad: NGAAN, jednak typowy element HSE złożony jest z wielokrotnych, sąsiadujących sekwencji w różnych orientacjach (np. 5'-NGAANNTTCNNGAAN-3'). Liczba tych sekwencji może się różnić, ale zwykle wynosi od trzech do sześciu. Zmienna może być także liczba miejsc HSE oraz odległość między nimi w promotorach genów szoku termicznego. Wszystkie te czynniki mogą wpływać na powinowactwo czynnika transkrypcyjnego do wiązania HSE [26,29].

W komórkach Hsf1p może występować w dwóch konformacjach: niskiej aktywności (w warunkach fizjologicznych) oraz wysokiej aktywności (w warunkach stresowych). W warunkach fizjologicznych Hsf1p podlega konstytutywnej fosforylacji, jednak w odpowiedzi na stres białko to jest hiperfosforylowane, dzięki czemu może osiągnąć aktywną konformację. Hiperfosforylacja indukowana jest różnymi czynnikami stresowymi, takimi jak: szok termiczny, stres oksydacyjny, wysokie pH, obecność salicylanu, głodzenie glukozowe. Zmiana konformacji zwiększa powinowactwo Hsf1p do elementów HSE w promotorach genów szoku termicznego, indukując ich transkrypcję [14,39].

SZOK OSMOTYCZNY

Zmiany w osmolarności środowiska stwarzają warunki stresowe dla komórki uruchamiając swoiste szlaki meta-

boliczne. U drożdży *Saccharomyces cerevisiae* pod wpływem szoku osmotycznego indukowany jest szlak kinaz MAP (mitogen-activated protein) - HOG (high osmolarity glycerol) (ryc. 2).

W błonie komórkowej drożdży są zlokalizowane dwa białka będące sensorami zmian osmotycznych w środowisku – Sln1p i Sho1p. Sln1p występuje w formie dimeru, który z błoną komórkową związany jest za pośrednictwem dwóch domen transbłonowych (TMD). W swej strukturze Sln1p ma także domenę zewnątrzkomórkową (ECD). Taka konfiguracja reaguje na zmiany ciśnienia turgorowego wywieranego na błonę komórkową oraz zmiany sztywności ściany komórkowej. W warunkach fizjologicznych Sln1p ulega autofosforylacji. Grupa fosforanowa zostaje przeniesiona z histydyny H576 na kwas asparaginowy D1144. Następnie fosforylacji ulega histydyna H64 białka Ypd1p, a ostateczny etap stanowi fosforylacja kwasu asparaginowego w cytoplazmatycznym regulatorze odpowiedzi - Ssk1p.

W warunkach stresu osmotycznego aktywacji ulega kinaza MAP Hog1p. Do tego procesu niezbędna jest obecność nieufosforylowanej postaci Ssk1p. W związku z tym, w tych warunkach aktywność kinazowa Sln1p jest zredukowana. Białko to gromadzi się w błonie komórkowej w postaci nieufosforylowanej w specyficznych skupieniach [24,72,106].

Nieufosforylowane białko Ssk1p wiąże się z N-końcowym regionem Ssk2p. Interakcje te są wymagane do autofosforylacji i aktywacji kinazy Ssk2p (MAPKKK), która następnie fosforyluje kinazę Pbs2p (MAPKK), aktywującą Hog1p (MAPK) [103].

Drugie białko, będące osmosensorem – Sho1p, ma cztery transbłonowe segmenty oraz C-końcowy region zawierający domenę SH3. Po odebraniu bodźca stresowego przez Sho1p,

kinaza MAPKKK (Ste11p) fosforyluje Pbs2p. Za aktywację Ste11p odpowiadają interakcje z kinazami Ste20p/Cla4p. Ufosforylowane białko Pbs2p aktywuje następnie Hog1p w pozycji treonina 174 i tyrozyna 176. W warunkach fizjologicznych Hog1p zlokalizowany jest w równych ilościach zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze. Fosforylacja indukowana stresem osmotycznym skutkuje zwiększoną akumulacją Hog1p w jądrze komórkowym i w konsekwencji aktywacją ekspresji genów docelowych [126].

Stres osmotyczny indukuje również zamykanie Fps1p – kanału swoistego dla eksportu glicerolu. Dane wskazują, że regulacja aktywności tego białka nie zależy od żadnego szlaku przekazywania sygnałów w odpowiedzi na stres osmotyczny [56].

Głównymi celami kinazy MAP Hog1p są Sko1p, Hot1p oraz Msn2p i Msn4p. Sko1p jest czynnikiem transkrypcyjnym, który w fizjologicznych warunkach hamuje ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres osmotyczny przez przyłączanie do promotora genu kompleksu represorowego Tup1p–Ssn6p/Cyc8p. Pod wpływem stresu osmotycznego kompleks ten jest hamowany przez bezpośrednią fosforylację Sko1p przez Hog1p [107]. Indukuje to ekspresję genów kodujących m.in. Ena1p (pompa Na⁺ warunkująca tolerancję na sól), Hal1p (cytoplazmatyczne białko zaangażowane w halotolerancję) i Msn2p (czynnik transkrypcyjny zaangażowany w ogólną odpowiedź na stres) [97,101]. Hot1p jest czynnikiem transkrypcyjnym kontrolującym ekspresję genów zaangażowanych w syntezę i transport glicerolu (np. *GPD1*, *GPP2*). Hot1p wchodzi w interakcje z Hog1p, które umożliwiają przyłączenie kinazy MAP do promotorów genów docelowych dla Hot1p. Od tych interakcji zależy przyłączenie polimerazy RNA II do promotorów i indukcja ekspresji genów odpowiedzi na stres [1].

Głównym osmoprotektantem jest glicerol, w którego syntezę zaangażowane są głównie białka Gpd1p i Gpp2p. Gpd1p to dehydrogenaza fosforanu 3-glicerolu zależna od NAD, a Gpp2p jest jedną z fosfataz DL-fosforanu-3-glicerolu. Wytwarzanie obu tych białek jest znacznie zwiększone pod wpływem szoku osmotycznego [95]. Jednocześnie zamknięciu ulega kanał Fps1p, eksportujący glicerol. Fps1p jest białkiem błony komórkowej mającym 6 domen transbłonowych i należącym do rodziny MIP (membrane intrinsic proteins). Mechanizmy te mają na celu akumulację glicerolu w komórce, co skutkuje wyrównaniem osmolarności wewnątrz i na zewnątrz komórki. Chroni to komórkę przed potencjalnymi uszkodzeniami związanymi ze zwiększonym ciśnieniem osmotycznym [11,75]. Ponadto glicerol stanowi źródło węgla i jest prekursorem lipidów odgrywających rolę w przekazywaniu sygnałów [124].

STRES OKSYDACYJNY

Metabolizm tlenowy generuje powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS) w komórce, takich jak nadtlenek wodoru, rodniki hydroksylowe czy anionorodnik ponadtlenkowy. Czynniki te prowadzą w sposób pośredni lub bezpośred-

ni do uszkodzeń DNA, lipidów i białek. W komórkach muszą więc istnieć mechanizmy utrzymania równowagi między powstawaniem a unieczynnieniem ROS. Wiele badań dotyczących tych mechanizmów prowadzonych jest na drożdżach z wykorzystaniem H₂O₂ jako czynnika generującego stres oksydacyjny dla komórek. Wykazują one zmiany w ekspresji ponad 160 białek pod wpływem nadtlenu wodoru. Ekspresja genów kodujących te białka kontrolowana jest przez kilka czynników transkrypcyjnych, głównie Yap1p i Skn7p, ale również przez Msn2/4p [43].

Do genów indukowanych pod wpływem stresu oksydacyjnego należą geny kodujące białka o własnościach wychwytyjących wolne rodniki oraz białka opiekuńcze (Hsp). Zmianom ulega także metabolizm węglowodanów – spowolnienie glikolizy przez represję genów kodujących dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego. Indukowany jest również szlak pentozowy, na co wskazuje zwiększona ekspresja genów *PGM2* (fosfoglukomutaza), *ZWF1* (dehydrogenaza glukozy-6-fosforanu), *TKL1/2* (transketolazy), *TAL1* (transaldolaza) i *UGP1* (pirofosforylaza UDP-glukozy). Zwiększeniu ulega także wytwarzanie trehalozy przez *TPS1* (syntaza trehalozy-6-fosforanu) [22].

Indukcji ulega również ekspresja genów kodujących białka zaangażowane w utrzymanie homeostazy redoks w komórce. Jednym z nich jest system tioredoksyny, który składa się z tioredoksyny (Trx), reduktazy tioredoksyny (Trr) i NADPH. U drożdży występują dwa takie systemy: Trx1p, Trx2p i Trr1p w cytoplazmie oraz Trx3p i Trr2p w mitochondriach. Tioredoksyna zawiera w centrum aktywnym konserwatywną sekwencję zawierającą cysteiny. Gdy jest w postaci zredukowanej grupa ditiolowa w miejscu aktywnym katalizuje redukcję wiązań disiarczkowych wielu białek [88,136].

W sposób podobny do systemu tioredoksyn działa system glutaredoksyn. Istnieją dwie podrodziny tego systemu zależnie od ilości cystein w miejscu aktywnym. Pierwsza z nich chroni komórkę przeciwko H₂O₂ (Grx2p) i anionorodnikom ponadtlenkowym (Grx1p). Druga podrodzina grupuje trzy dodatkowe białka Grx3p, Grx4p i Grx5p. Ostatnie z nich odgrywa szczególnie ważną rolę w ochronie komórki przed zniszczeniami wywołanymi nadtlakiem wodoru i menadionem [69].

Dysmutaza nadtlenu (SOD) katalizuje reakcję przemiany dwóch cząsteczek O₂^{•-} do H₂O₂ i tlenu cząsteczkowego. Enzym ten jest metaloproteiną i odgrywa ważną rolę w ochronie przed uszkodzeniami spowodowanymi stresem oksydacyjnym. Większość organizmów eukariotycznych syntetyzuje dwie różne postaci tego enzymu: Sod1p zawierającą cynk i miedź i znajdującą się głównie w cytoplazmie (niekiedy umiejscawia się też w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej) oraz mitochondrialną Sod2p zawierającą mangan [52,73].

W ochronie komórki przed uszkodzeniami spowodowanymi reaktywnymi formami tlenu biorą udział także katalazy. Są to enzymy rozkładające nadtlenek wodoru do

tlenu cząsteczkowego i wody. U drożdży występują dwie katalazy. Cytoplazmatyczna katalaza kodowana jest przez gen *CTT1*. Jego ekspresja indukowana jest różnymi czynnikami stresowymi, ponieważ w promotorze genu znajduje się kilka sekwencji regulatorowych rozpoznawanych przez różne czynniki (Yap1p, Msn2p, Hog1p). Drugą katalazę obecną w peroksysomach koduje gen *CTA1*. Enzym ten usuwa nadtlenek wodoru powstały z beta-oksydacji kwasów tłuszczowych [51].

Ważnym naturalnym antyoksydantem w komórce jest glutation. W postaci zredukowanej (GSH) dzięki wolnej grupie tiolowej służy do redukcji nadtlenu wodoru oraz wychwytuje reaktywne czynniki elektrofilowe, chroniąc komórkę przed uszkodzeniem ze strony toksyn. Podczas stresu oksydacyjnego wytwarzane są duże ilości utlenionego glutationu (GSSG), które najprawdopodobniej przenoszone są do wakuoli lub redukowane przez reduktazę glutationu [104]. Glutation chroni także białka przed utlenieniem dzięki glutationylacji (formowaniu wiązań disiarczkowych między grupą tiolową białka i glutationem) [30]. Za pośrednictwem Yap1p, w warunkach stresu oksydacyjnego, indukowana jest ekspresja genów syntezy glutationu – *GSH1* (syntaza gamma-glutanilcysteiny), *GSH2* (syntaza glutationu) [35,146]. Największą jego zawartość obserwuje się w mitochondriach, cytosolu oraz jądrze komórkowym, gdzie prawdopodobnie odgrywa istotną rolę we wzroście i rozwoju komórek, a także chroni je przed reaktywnymi formami tlenu [149].

Regulacja odpowiedzi na stres oksydacyjny

U drożdży głównym mechanizmem regulacji odpowiedzi na stres oksydacyjny jest sieć YAP. Czynniki transkrypcyjne tej sieci należą do rodziny białek AP-1 i mają charakterystyczną domenę zamka leucynowego. Scharakteryzowano osiem czynników transkrypcyjnych Yap1–Yap8p. Czynniki te wiążą się do swoistej sekwencji ARE (AP-1 recognition element) – TTGACTCA, w promotorach genów docelowych [25]. Najlepiej poznanym czynnikiem jest Yap1p. Odgrywa on główną rolę w odpowiedzi komórki na stres oksydacyjny oraz pośredniczy w oporności wielolekowej. Głównymi genami regulowanymi przez Yap1p są *TRX2* (tioredoksyna), *TRR1* (reduktaza tioredoksyny), *TSA1* (peroksydaza tioredoksyny), *GSH1* (syntaza glutamylcysteiny), *GSH2* (syntaza glutationu), *GPX2* (peroksydaza glutationu) i *GLR1* (reduktaza glutationu). Wykazano również, że Yap1p aktywuje ekspresję kilku transporterów: *YCF1*, *SNQ2*, *PDR5* (ABC) oraz *ATR1*, *FLR1* (MFS) [10,58,93].

Regulacja ekspresji genów przez Yap1p odbywa się na poziomie lokalizacji komórkowej. Yap1p w warunkach fizjologicznych znajduje się w cytoplazmie. Aby związał się z promotorem genów docelowych musi ulec akumulacji jądrowej. W warunkach fizjologicznych Yap1p jest utrzymywany w cytoplazmie na stałym poziomie, dzięki aktywności Crm1p (eksportyna), która rozpoznaje region NES (nuclear export signal) znajdujący się na końcu karboksylowym w domenie CRD (cysteine rich domain). W strukturze Yap1p występują dwie domeny CRD zlokalizowane na N-końcu i na C-końcu. Wysokie stężenie

oksydantów powoduje utlenienie domeny CRD przez peroksydazę zależną od glutationu Gpx3p, co jest sygnałem stresu oksydacyjnego. Indukuje to powstanie dwóch wiązań disiarczkowych między cysteinami w domenie CRD. Zmiana konformacji białka maskuje region NES i dzięki temu umożliwia jego akumulację w jądrze [5,37].

W akumulację jądrową zaangażowane są dwa mechanizmy zależne od induktora. Jeden z nich to ROS (nadtlenek wodoru i anionorodnik ponadtlenkowy), w którym za aktywację odpowiada utworzenie wiązań disiarczkowych między cysteinami w domenach N-końcowej i C-końcowej (Cys303–Cys598, Cys310–Cys629). Dzięki tym zmianom maskowany jest element NES, co promuje akumulację w jądrze. Drugi mechanizm indukowany jest diamidami i jonami metali ciężkich (selen, kadm, rtęć) oraz benomylem. Nie wykazano w tym wypadku wiązań między obiema domenami, jedynie wiązania disiarczkowe między trzema resztami cysteiny w domenie C-CRD (Cys598, Cys620 i Cys629) – w odpowiedzi na diamid oraz modyfikacje cystein domeny C-CRD w odpowiedzi na jony metali ciężkich. Nie wiadomo jednak jak ten mechanizm wpływa na blokowanie wiązania Yap1p–Crm1p [4,64].

Powrót do warunków fizjologicznych skutkuje eksportem Yap1p z jądra i ponowną akumulacją w cytoplazmie. Proces ten regulowany jest przez negatywne sprzężenie zwrotne systemu tioredoksyny. Gdy stężenie ROS jest wysokie Yap1p aktywuje ekspresję wielu antyoksydantów, m.in. systemu tioredoksyny. Gdy poziom wolnych rodników spada obecność Yap1p w jądrze nie jest konieczna. Tioredoksyny redukują wiązania disiarczkowe powstałe w czynniku Yap1p podczas stresu, co skutkuje odsłonięciem regionu NES i eksportem z jądra do cytoplazmy przez eksportynę Crm1p [4,83].

Do rodziny yAP należą także inne czynniki transkrypcyjne. Yap2p wykazuje dużą homologię z Yap1p. Mechanizm jego aktywacji jest taki sam jak w przypadku aktywacji Yap1p. Gen *YAP2* został zidentyfikowany jako nadający oporność na metale i stres chemiczny, gdy jego ekspresja jest zwiększona, jednak dokładna rola w tym procesie nie została potwierdzona [4].

YAP4 koduje czynnik transkrypcyjny, który początkowo scharakteryzowano u mutantów z brakiem stabilności chromosomów, dlatego nazwano go Cin5p. Jego nadekspresja zwiększa tolerancję komórki na sole oraz warunki oporność na leki antymalaryczne i cisplatynę. Dalsze badania wykazały, że *YAP4* indukowany jest także innymi czynnikami stresowymi m.in. stresem oksydacyjnym i szokiem osmotycznym. W promotorze genu *YAP4* znajduje się element STRE, co wskazuje na jego aktywację przez czynniki transkrypcyjne ogólnej odpowiedzi na stres – Msn2/4p. Dane wskazują również na obecność Yap4p w szlaku HOG, gdyż jego nadekspresja częściowo odwracała fenotyp wrażliwości na sól u mutantów *hog1*. Ponadto ekspresja genów biorących udział w syntezie glicerolu jest częściowo zależna od Yap4p w warunkach szoku osmotycznego [27,90].

Yap5p jest jedynym czynnikiem, który bierze udział w homeostazie żelazowej w komórkach drożdży. Dane wskazują, że Yap5p jest odpowiedzialny za indukcję *CCC1*, który koduje białko transportujące żelazo do wakuoli. *CCC1* ma dwa miejsca ARE, jednak Yap5p rozpoznaje tylko jedno z nich. Ponadto wykazano także, że Yap5p indukuje ekspresję *TYW1*, co skutkuje obniżeniem poziomu żelaza w cytoplazmie [68,69].

Yap6p podobnie jak Yap4p warunkuje tolerancję na sole: sól i lit. Ponadto sugeruje się jego rolę w regulacji ekspresji genów metabolizmu węglowodanów [84].

Inny czynnik transkrypcyjny – Yap8p (Arr1p) nadaje komórkom oporność na arsen, dzięki zwiększeniu ekspresji *ACR2* i *ACR3* indukowanej arsenem. Yap8p wiąże się do pseudopalindromowej sekwencji TGATTAATAATCA i aktywuje ekspresję *ACR3*, którego produkt aktywnie usuwa arsen z komórki [148].

W genomie drożdżowym zidentyfikowano również czynnik Yap3p, który rozpoznaje miejsca ARE z niższą wydajnością niż pozostałe białka. Na XV chromosomie zlokalizowano także *YAP7*, kodujący przypuszczalny czynnik transkrypcyjny [25].

OPORNOŚĆ DROŻDŻY NA METALE

Toksyczne metaloidy, takie jak arsen i antymon występują powszechnie w środowisku. Mechanizmy tolerancji na obecność tych substancji obejmują eksport metaloidów przez systemy transportu oraz kontrolę importu do komórki. U drożdży występuje kilka transporterów uczestniczących w pobieraniu lub wyrzuceniu arsenu i antymonu. Zidentyfikowano dwa mechanizmy pobierania metaloidów. Jednym z nich jest system transportu fosforanów, w który zaangażowane są białka Pho84p (transporter) oraz białka związane z Pho84p – Pho87p i Pho88p. Mutacje w genach kodujących te białka zwiększają tolerancję na obecność arsenu w środowisku. Inne badania wskazują, że wzrost tolerancji może być także związany z mutacjami w genie *PHO86*, kodującym białko transportujące Pho84p z retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego. W inny szlak importu zaangażowane jest białko Fps1p. Jest to kanał glicerolowy, należący do rodziny MIP. Redukcja aktywności Fps1p zmniejsza pobieranie do komórek drożdży arsenu i antymonu, jednak nadekspresja *FPS1* powodowała wzrost tolerancji na arsen, co wskazuje na dwukierunkowy transport tego metalu przez Fps1p i jego rolę w detoksykacji komórki z arsenu [78,129].

Usuwanie metaloidów z komórki również może się odbywać dwiema drogami. Gen *ACR3* koduje błonowy transporter arsenu (III) i (V). Inne dane wskazują, że jego nadekspresja powoduje także oporność na antymon [148]. Drugie białko zaangażowane w detoksykację komórki z arsenu to Ycf1p. Jest to transporter należący do rodziny ABC zlokalizowany w błonie wakuolarnej, który transportuje substraty w postaci koniugatów glutationowych. Poza tolerancją na arsen, Ycf1p jest zaangażowany także w de-

toksykację komórki z innych toksycznych metali, takich jak rtęć czy kadm [36,85]. Ważnym czynnikiem biorącym udział w detoksykacji komórki z jonów kadmu jest też system tioredoksyn oraz glutation, ponieważ po ekspozycji na kadm większość zasymilowanej siarki przekształcana była przez komórkę w glutation [141]. Wykazano również, że w obecności rtęci indukowana jest (za pośrednictwem Yap1p) ekspresja genów syntezy glutationu [35].

Obecność arsenu i antymonu w środowisku indukuje także ekspresję genów zaangażowanych w odpowiedź na różne warunki stresowe: *CTT1* (katalaza cytoplazmatyczna), *HSP12* i *HSP104* (białka szoku termicznego). W kontroli ekspresji genów zaangażowanych w detoksykację komórki z metaloidów bierze udział Yap1p. Reguluje on transkrypcję genów *YCF1* i *ACR3*. Wykazano również, że ekspresja *ACR3* jest także pod kontrolą Yap8p [148].

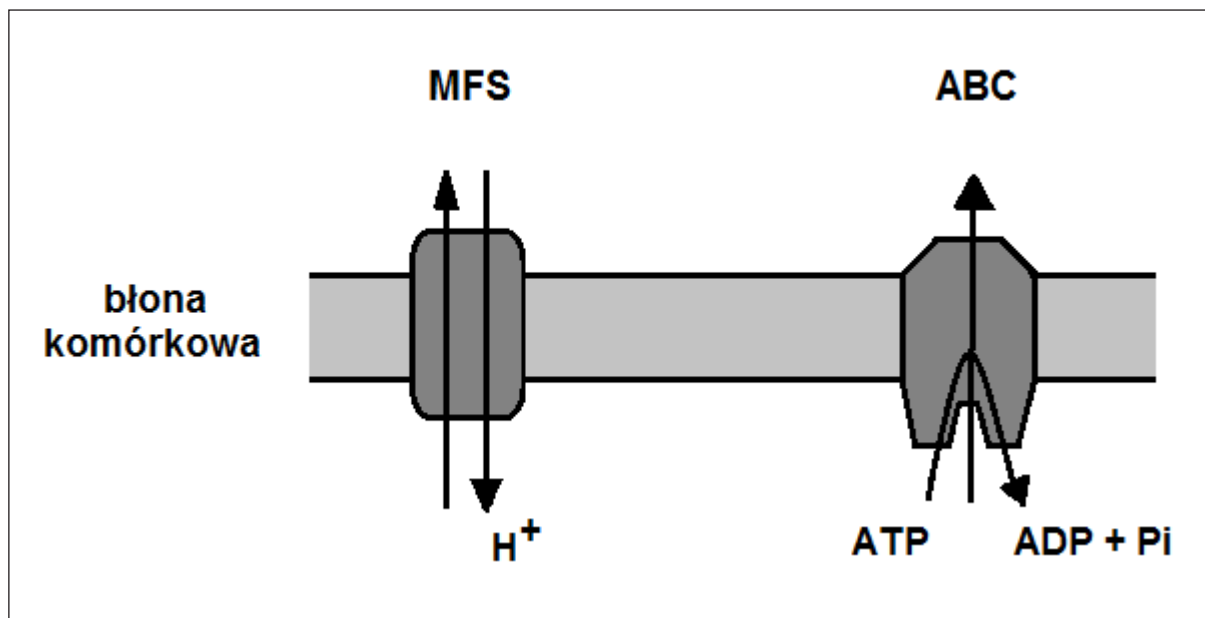
Istotną rolę w tolerancji na metale odgrywają białka wiążące metale. Metalotioeniny (MT) to klasa niskocząsteczkowych białek bogatych w cysteinę. Białka te działają w odpowiedzi na różnego rodzaju bodźce stresowe (obecność metali, hormonów, interleukin, stres oksydacyjny). Do tej grupy należy białko Cup1p, które bezpośrednio wiąże metale, takie jak kadm i miedź. Ulega aktywacji w odpowiedzi na miedź poprzez elementy powtórzeniowe w promotorze (*UAS_{CUP1}*), do których wiąże się czynnik transkrypcyjny Ace1p aktywowany miedzią. Dzięki wiązaniom tiolowym w cysteinach Ace1p wiąże miedź i formuje białko aktywne Cu-Ace1p, które z kolei wiąże cztery niezależne miejsca w *UAS_{CUP1}* i aktywuje ekspresję *CUP1*. *CUP1* może być również aktywowane przez czynnik Hsf1p w odpowiedzi na szok termiczny [128].

Homeostaza żelazowa regulowana jest przez czynniki transkrypcyjne Atf1/2p. Geny docelowe tych czynników mają w promotorach element odpowiedzi na żelazo (5'-CACCC-3'), a regulacja ich ekspresji odbywa się na poziomie lokalizacji subkomórkowej. Z kolei odpowiedź komórki na brak lub nadmiar cynku w środowisku jest zależna od czynnika transkrypcyjnego Zap1p, który kontroluje m.in. ekspresję transporterów błonowych (*ZRT1*, *ZRT2*), pobierających cynk do wnętrza komórki [111].

OPORNOŚĆ DROŻDŻY NA INHIBITORY WZROSTU

Transportery ABC

Transportery ABC (ATP-binding cassette) to duża grupa białek występująca powszechnie u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Białka te są umiejscowione zarówno w błonie komórkowej, wakuolarnej, mitochondrialnej, peroksysomów jak i w cytoplazmie [8]. Białka należące do rodziny transporterów ABC mają konserwatywną strukturę. Główna domena białka składa się z dwóch homologicznych części, z których każda zawiera domenę transmembranową (TMD) z kilkoma (zwykle sześcioma) α -helisami oplatającymi błonę oraz domenę wiążącą ATP (NBD). Domena NBD łączy hydrolizę ATP z transportem substratu i może być zlokalizowana C- lub N-terminalnie



Ryc. 3. Schemat budowy transporterów MFS i ABC

w stosunku do TMD. Hydroliza ATP jest kluczową aktywnością białek ABC (ryc. 3). Każda domena NBD ma długość około 200 aminokwasów i ma kilka konserwatywnych regionów. Należą do nich motywy Walker A i Walker B (oddzielone 90-120 aminokwasami) oraz region sygnowy z sekwencją konsensusową LeuSerGlyGlyGln (sygnatura ABC, motyw C) leżący tuż przed motywem Walker B. Struktura krystalograficzna bakteryjnych transporterów ABC wskazała, że obie domeny NBD wchodziły ze sobą w interakcje (motywy Walker A i B jednej domeny reagują z motywem C drugiej domeny). Niektóre białka ABC nie mają domen transbłonowych. Białka te nie uczestniczą w transporcie, ale łączą hydrolizę ATP z innymi procesami komórkowymi, np. naprawą DNA czy translacją białek [98,112].

Badania dotyczące funkcjonowania transporterów ABC są ważne w medycynie, ponieważ warunkują one oporność mikroorganizmów na antybiotyki i związki grzybobójcze. Innym ważnym zagadnieniem jest oporność komórek nowotworowych na chemioterapię, warunkowana nadekspresją *MDR1* kodującego glikoproteinę-P [8]. Zrozumienie mechanizmu aktywności i regulacji transporterów ABC jest niezwykle ważne w związku z coraz częściej pojawiającym się zjawiskiem lekooporności wśród organizmów. Drożdże *S. cerevisiae*, m.in. ze względu na wysoką homologię z ludzkimi genami, są doskonałym modelem badań białek rodziny ABC.

Główną rolą transporterów ABC jest eksport różnego rodzaju substancji: leki przeciwnowotworowe, substancje cytotoksyczne, fungicydy, antybiotyki i inne ksenobiotyki. Przeważnie transport ten jest nieswoisty i substratem dla danej pompy może być wiele różnych inhibitorów wzrostu, co stwarza ryzyko wystąpienia oporności wielolekowej (MDR).

Klasyfikacja transporterów ABC obejmuje 6 podrodziny: PDR, MDR, ALDP, MRP/CFTR, YEF3, RLI.

Oporność wielolekowa drożdży przypisywana jest głównie aktywności białek należących do rodziny PDR (pleiotropic drug resistance). Białka te tworzą swoistą sieć podlegającą ścisłej regulacji. Do rodziny PDR należą białka: Pdr5p, Pdr10p, Pdr15p, Pdr11p, Pdr12p, Snq2p, Pdr18p, Pdr16p, Pdr17p, Aus1p. Najlepiej poznanymi transporterami są Pdr5p i Snq2p, umiejscowione w błonie komórkowej i mające szeroki zakres substratowy (antybiotyki, fungicydy, detergenty, jonofory, hormony steroidowe i leki antynowotworowe) [6,7,78]. Pdr5p funkcjonuje jako homodimer i poza wielolekoopornością bierze także udział w eksporcie kationów, translokacji lipidów i quorum sensing [47,59].

Bliskim homologiem Pdr5p jest Snq2p, które zostało scharakteryzowane jako nadające komórce oporność na N-tlenek-4-nitrochinoliny (4NQO). W późniejszych badaniach wykazano, że nadekspresja genu kodującego to białko powoduje oporność także na wiele innych związków. Ponadto, podobnie jak Pdr5p, Snq2p zaangażowane jest w transport kationów i quorum sensing [47,87,122].

Innymi bliskimi homologami Pdr5p są transportery Pdr10p i Pdr15p. Aktywność transportera Pdr15p jest silnie indukowana przez różne czynniki stresowe, m.in. stres osmotyczny, szok termiczny, niskie pH, głodzenie i obecność słabych kwasów. Białko to bierze udział w detoksykacji komórki podczas stresu metabolicznego [145]. Pdr10p odpowiedzialny jest m.in. za utrzymanie prawidłowego rozmieszczenia i funkcji kilku białek (np. syntazy chityny Chs3p). Wykazano także, że Pdr10p wpływa na dystrybucję innego członka podrodziny PDR – Pdr12p. Transporter ten nadaje komórce oporność na słabe kwasy organiczne. Wykazano, że do substratów Pdr12p należą

środki stosowane do konserwacji żywności (kwas benzoesowy, kwas sorbowy, kwas propionowy) oraz kwasy organiczne powstające w komórce (C3-C7) [34,45,109]. Pozostałe białka PDR nie zostały dokładnie poznane. Dane literaturowe sugerują, że Aus1p i Pdr11p biorą udział w transporcie steroli, jednak dokładny mechanizm ich działania nie jest znany [81,144]. Białka Pdr16p i Pdr17p biorą udział w transporcie fosfolipidów. Transporter ten jest zaangażowany w tolerancję na leki azolowe, ponieważ delecja *PDR16* skutkowałą hiperwrażliwością na tę grupę związków. Delecja *PDR17* nie wpływała na stopień wrażliwości komórki na leki, jednak podwójne mutanty $\Delta pdr16\Delta pdr17$ wykazują hiperwrażliwość na różnorodne inhibitory wzrostu [121,139].

Transportery MFS

Drugą rodziną transporterów u drożdży są pompy MFS (major facilitator superfamily). Białka te są umiejscowione w błonie komórkowej. Transportują substraty z komórki dzięki energii, którą uzyskują z gradientu protonów po obu stronach błony komórkowej. Eksport substratu najczęściej odbywa się na zasadzie symportu z jednoczesnym wypływem jonów H^+ lub Na^+ lub antyportu z jednoczesnym ich wypływem (ryc. 3). Ze względu na liczbę transbłonowych domen TMD dzielimy je na 12- i 14- transbłonowe. Białka te katalizują transport chemioterapeutyków, ale również intermediatów cyklu Krebsa, oligosacharydów i innych substancji endogennych [114].

U drożdży *S. cerevisiae* występują dwie podrodziny transporterów MFS. Do pierwszej z nich: DHA1 należą takie białka jak Qdr1p-Qdr3p, Aqr1p, Flr1p, Dtr1p, Tpo1-4p [113].

Qdr1p i Qdr2p są homologami i odpowiadają za usuwanie z komórki chinidyny i barbanu. Do substratów Qdr1p należą także związki azolowe: flukonazol i ketokonazol, natomiast Qdr2p chroni komórkę przed lekami antynowotworowymi (cisplatyną i bleomycyną). Podobne spektrum substratowe ma Qdr3p, homolog Qdr1p i Qdr2p [91,135,140]. Kolejnym transporterem należącym do tej rodziny jest Aqr1p, który nadaje komórce oporność na chinidynę i krótkołańcuchowe kwasy monokarboksyłowe. Jest on także determinantą tolerancji na ketokonazol i fiolet krystaliczny [132]. Do substratów Flr1p należą fungicydy: benomyl i mankozeb, metotreksat (lek antynowotworowy), 4-NQO, flukonazol i cykloheksymid [13,130]. Białka Tpo1-4p warunkują oporność na toksyczne stężenie poliamid (np. spermina, spermidyna). Substratami dla Tpo1p są leki antymalaryczne, herbicydy czy fungicydy, natomiast Tpo2p i Tpo3p są zaangażowane w tolerancję komórki na kwas propionowy i octowy [113].

Drugą rodziną transporterów MFS jest DHA2. Należą do niej trzy białka: Atr1p, Azr1p i Sge1p. Transporter Atr1p pośredniczy w usuwaniu m.in. 4-NQO, aminotriazolu i związków cyny. Ponadto wykazano, że *ATR1* warunkuje oporność na bor [57]. Nadekspresja genu *AZR1* nadaje komórce oporność na takie związki, jak kwas propionowy,

fiolet krystaliczny, ketokonazol, flukonazol i polimiksyne B, natomiast białko Sge1p transportuje z komórki barwniki (np. fiolet krystaliczny, bromek etydyny) [50,133].

Usuwanie substancji toksycznych znajdujących się w środowisku jest jedną z funkcji transporterów MFS, jednak ich fizjologiczna rola prawdopodobnie nie jest związana z eksportem leków. Wykazano, że zwiększona ekspresja białka Qdr2p pełni istotną rolę w utrzymaniu odpowiedniego poziomu jonów potasu, natomiast Aqr1p pośredniczy w eksporcie niektórych aminokwasów (m.in. homoseryny i treoniny). Inne białko, Dtr1p bierze udział w dojrzewaniu ściany komórkowej spor [113]. Białka Tpo1p-Tpo4p odpowiadają za transport poliamin. Wykazano, że ich nadekspresja redukowałą toksyczność wywoływaną przez poliaminy i indukowała ich akumulację w wakuoli [138].

Regulacja oporności wielolekowej

Oporność wielolekowa u drożdży zależy od ekspresji wielu genów tworzących swoistą sieć, która znajduje się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych. Najlepiej scharakteryzowanymi czynnikami są Pdr1p i Pdr3p. Białka te należą do rodziny czynników transkrypcyjnych GAL4, zawierających w swej strukturze N-końcowy motyw palca cynkowego Zn_2Cys_6 wiążący DNA. Oba te czynniki wiążą się do tej samej sekwencji PDRE (Pdr1p/Pdr3p response element), obecną w różnej liczbie i kombinacjach w promotorach genów docelowych. Domena palca cynkowego rozpoznaje triplety CGG w miejscu PDRE, co umożliwia wiązanie czynników transkrypcyjnych. PDRE tworzy sekwencja palindromowa 5'-TCCGCGGA-3', jednak Pdr1p i Pdr3p tolerują niektóre pojedyncze zmiany zasad w tej sekwencji i nie wykazują zaburzeń w wiązaniu [55,61].

Czynniki Pdr1p i Pdr3p zawierają w swej strukturze tzw. domeny aktywacyjne (AR). Mutacje zachodzące w tych domenach powodują zwiększenie aktywności tych czynników (np. *pdr1-8*, *pdr1-10*, *pdr1-12*). Niektóre spontaniczne mutacje w genach kodujących czynniki Pdr1p i Pdr3p, zwiększają aktywację transkrypcji genów docelowych, nadając fenotyp oporności wielolekowej. Pojedyncze mutacje punktowe w *locus PDR1* (*pdr1-2*, *pdr1-3*, *pdr1-6*, *pdr1-7*, *pdr1-8*) zwiększają poziom mRNA genów docelowych (*PDR5*, *SNQ2*, *YOR1*, *PDR10*, *PDR15*, *PDR16*). Mutacje w *locus PDR3* - *pdr3-2* do *pdr3-10* powodowały zwiększoną ekspresję *PDR5*, *SNQ2*, *PDR15*, *PDR10* i *PDR3*. Mutacje *pdr1* i *pdr3* skutkują nie tylko fenotypem wielolekowej oporności. Wykazano, że mutanty *pdr1-2* są niezdolne do wzrostu pod wpływem stresu osmotycznego, termicznego i podwyższonego pH, natomiast *pdr3-11* nie wykazuje wzrostu na podłożu z mleczanem lub glicerolem/etanolem, *pdr1-11* jest temperaturowrażliwy. Pod kontrolą transkrypcyjną Pdr1p/Pdr3p znajduje się wiele genów. Należą do nich geny kodujące m.in. transportery ABC: Pdr5p, Pdr10p, Pdr15p, Snq2p, Yor1p oraz transporter MFS Tpo1p [20]. Co więcej, Pdr1p/Pdr3p aktywuje ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w odpowiedź na stres (ograniczenie składników odżywczych, stres osmotyczny, uszkodzenia DNA) [61,105].

W regulację białek Pdr zaangażowane są także inne czynniki transkrypcyjne. Ekspresja *SNQ2* regulowana jest dodatkowo przez czynnik Yrr1p i Stb5p. Natomiast *PDR15* ma w promotorze sekwencję STRE rozpoznawaną przez Msn2/4p. Swoitym czynnikiem transkrypcyjnym jest War1p. Białko to aktywuje ekspresję *PDR12* w odpowiedzi na obecność słabych kwasów organicznych. War1p jest konstytutywnie związany z promotorem *PDR12* w miejscu WARE. Aniony powstałe po dysocjacji kwasów organicznych w komórce pośrednio lub bezpośrednio aktywują War1p, który ulega nagłej fosforylacji, co skutkuje aktywacją ekspresji *PDR12* [63, 66, 145].

Pdr1p jest potranslacyjnie modyfikowany przez Pdr13p, który należy do rodziny białek Hsp70p. Pdr13p reguluje funkcje Pdr1p, ale nie wykazano wpływu na aktywność Pdr3p. Dane wskazują także na korelację *PDR13* z systemem ogólnej odpowiedzi na stres. Delecja *PDR13* indukowała ekspresję kilku genów będących pod kontrolą czynników Msn2/4p (*CTT1*, *HSP12*, *CUP1*) [41].

W regulacji ekspresji genów oporności wielolekowej bierze udział czynnik Yap1p. W promotorach genów kodujących niektóre transportery MFS znajdują się elementy rozpoznawane i wiązane przez Yap1p (ARE). *FLR1* ma trzy miejsca ARE, jednak eliminacja ARE3 prawie całkowicie redukuje funkcje Flr1p. Innym transporterem kontrolowanym przez Yap1p jest Atr1p. Ekspresja *ATR1* zależna jest również od czynnika Gcn4p, natomiast w regulację *FLR1* zaangażowany jest także czynnik Yrr1p [18, 130].

Yap1p jest zaangażowany w aktywację niektórych białek Pdr, co wskazuje na interakcje dwóch dużych sieci genów: PDR i YAP u drożdży. *PDR5* i *SNQ2* mają w swoim promotorze zarówno miejsca PDRE jak i ARE. Obecność funkcjonalnego *YAP1* wymagana jest do ekspresji *SNQ2* stymulowanej stresem. Wykazano, że Yap1p przyczynia się do oporności na 4-NQO i diazaborinę przez oddziaływanie na geny kodujące transportery PDR i MFS. Spekuluje się jednak, że w oporność wielolekową zależną od Yap1p zaangażowane są raczej pośrednie interakcje tego czynnika z Pdr1p i Pdr3p, prawdopodobnie interakcje z białkiem represorowym dla Pdr1/Pdr3p (np. Ngg1p) [38, 82, 86].

Inne mechanizmy oporności drożdży na leki

Stosowanie na szeroką skalę związków przeciwgrzybiczych, takich jak azole, polieni, allylaminy oraz echinokandyny stwarza problem narastającej oporności na te leki. Mechanizm ich działania na komórkę drożdży jest różnorodny.

Celem działania niektórych związków może być ergosterol błony komórkowej, który reguluje jej płynność, asymetrię i integralność. Azole są inhibitorami 14 α -demetylasy lanosterolu (Erg11p), która jest enzymem cytochromu P450 i zawiera hem w centrum aktywnym. Ich aktywność związana jest z obecnością w cząsteczce leku niezwiązanego azotu, który oddziałuje z żelazem zawartym w hemie, zapobiegając aktywacji tlenu, która jest konieczna do

biosyntezy ergosterolu. Skutkiem zahamowania Erg11p jest gromadzenie się w błonie komórkowej intermediatów, takich jak lanosterol, 4,14-dimetylozymosterol i 2,4-metylenodihydrostanosterol (zamiast ergosterolu). Prowadzi to do zmiany funkcji i struktury błony komórkowej drożdży. Mechanizm oporności na azole jest związany z modyfikacjami 14 α -demetylasy lanosterolu. Wysokie stężenie leków azolowych w środowisku indukuje mutacje punktowe w genie *ERG11*, co prowadzi do powstania zmodyfikowanego produktu białkowego o zmniejszonym powinowactwie do leku. Tak na przykład mutacja punktowa w *ERG11* (w pozycji 467 arginina na lizynę) powoduje zmianę strukturalną i funkcjonalną enzymu, z kolei mutacje w miejscu aktywnym (w pozycji 315 treonina na cysteinę oraz w pozycji 310 kwas asparaginowy na glicynę) skutkują redukcją aktywności enzymu i obniżeniem powinowactwa do azoli (flukonazol) [142]. Innym mechanizmem oporności na te związki jest nadekspresja *ERG11*, która skutkuje zwiększoną syntezą ergosterolu w komórce [62]. Wykazano także, że zmiany molekularne w obrębie genu *ERG3* skutkują opornością drożdży na leki azolowe. *ERG3* koduje desaturazę C-5 sterolu, enzym szlaku biosyntezy ergosterolu. Defekty w Erg3p powodowały akumulację prekursorów ergosterolu, co powodowało oporność komórek na flukonazol [49].

Inną grupą związków przeciwgrzybiczych są polieni (amfoterycyna B, nystatyna). Leki te mają charakter amfifilowy i wbudowują się w błonę komórkową wchodząc w interakcje z ergosterolem. Skutkuje to powstawaniem porów w błonie komórkowej i wpływem jonów i innych składników z komórki. Oporność na te związki związana jest z zastąpieniem ergosterolu pochodnymi sterolowymi (3-hydroksysterol lub 3-oksysterol). Innym mechanizmem obrony przed polienami jest obniżenie poziomu ergosterolu w błonie komórkowej. Sugeruje się także, że zwiększona aktywność katalazy obniża oksydacyjny efekt tych leków i nadaje komórkom tolerancję [118].

Kolejną klasą leków przeciwgrzybiczych działających na syntezę ergosterolu są allylaminy (terbinafina). Hamują one enzym Erg1p – epoksydazę skwalenu, działający w początkowym etapie biosyntezy ergosterolu. W wyniku inhibicji Erg1p dochodzi do nagromadzenia skwalenu, którego nadmierna ilość prowadzi do wzrostu przepuszczalności błony. Postaci odporne wśród mikroorganizmów są rzadko spotykane w środowisku. Mutogeneza drożdży *S. cerevisiae* wykazała kilka substytucji w *ERG1*, które przyczyniają się do oporności na terbinafinę. Większość z nich nie była jednak zlokalizowana w domenie będącej miejscem aktywnym enzymu, ale w pobliżu C-końca, który uważany jest za miejsce interakcji leku z enzymem [60, 65].

Echinokandyny to grupa związków hamująca syntezę glukanu przez blokowanie aktywności enzymu, syntazy 1,3 β -D-glukanu. Do oporności na ten związek może dojść w wyniku mutacji w genie *FKS1*, kodującego syntezę 1,3 β -D-glukanu, co prowadzi do powstania zmienionego produktu białkowego o niższym powinowactwie do leku [100].

Celem działania leków przeciwrzybiczych (antymetabolity – 5-fluorocytosyna) może być także synteza kwasów nukleinowych. 5-fluorocytosyna jest pobierana za pomocą permeazy cytozynowej do cytoplazmy komórki, gdzie ulega redukcji do fluorouracylu przez enzym deaminazę cytozynową. Fluorouracyl wbudowuje się do RNA blokując syntezę białka w komórce drożdży. 5-fluorocytosyna może również być przekształcona w fluoro-deoksyuridyne i zaburzać syntezę DNA, co prowadzi do nieprawidłowego podziału komórek drożdży. Oporność na ten związek może być związana ze zmniejszonym wytwarzaniem permeazy lub brakiem deaminazy cytozynowej [95].

W toku ewolucji drobnoustroje nabyły oporność na różne klasy inhibitorów wzrostu (np. aktywny wyrzut leku przez pompy ABC i MFS lub zmiana składu lipidowego błony komórkowej). Badania dotyczące tych mechanizmów są bardzo istotne w zwalczaniu mikroorganizmów, zwłaszcza chorobotwórczych. W tym celu prowadzone są intensywne badania nad syntezą nowych związków hamujących wzrost drobnoustrojów, co zapewni skuteczną terapię w leczeniu wielu chorób, np. grzybic powodowanych przez *Candida albicans*. Organizmem modelowym w tych badaniach są często drożdże *S. cerevisiae*, które mają podobne mechanizmy oporności, jak te występujące u *C. albicans* (np. pompy ABC).

PIŚMIENICTWO

- [1] Alepuz P.M., de Nadal E., Zapater M., Ammerer G., Posas F.: Osmostress-induced transcription by Hog1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J.*, 2003; 22: 2433-2442
- [2] Alepuz P.M., Jovanovic A., Reiser V., Ammerer G.: Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol. Cell*, 2001; 7: 767-777
- [3] Amoros M., Estruch F.: Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol. Microbiol.*, 2001; 39: 1523-1532
- [4] Azevedo D., Nascimento L., Labarre J., Toledano M.B., Rodrigues-Pousada C.: The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *FEBS Lett.*, 2007; 581: 187-195
- [5] Azevedo D., Tacnet F., Delaunay A., Rodrigues-Pousada C., Toledano M.B.: Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 35: 889-900
- [6] Balzi E., Wang M., Leterme S., Van Dyck L., Goffeau A.: PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 2206-2214
- [7] Banerjee D., Lelandais G., Shukla S., Mukhopadhyay G., Jacq D., Devaux F., Prasad R.: Responses of pathogenic and nonpathogenic yeast species to steroids reveal the functioning and evolution of multidrug resistance transcriptional networks. *Eukaryot. Cell*, 2008; 7: 68-77
- [8] Bauer B.E., Wolfger H., Kuchler K.: Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1461: 217-236
- [9] Becker J., Craig E.A.: Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.*, 1994; 219: 11-23
- [10] Beckhouse A.G., Grant C.M., Rogers P.J., Dawes I.W., Higgins V.J.: The adaptive response of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide is mediated by the Yap1 and Skn7 transcription factors. *FEMS Yeast Res.*, 2008; 8: 1214-1222
- [11] Beese S.E., Negishi T., Levin D.E.: Identification of positive regulators of the yeast *fps1* glycerol channel. *PLoS Genet.*, 2009; 5: e1000738
- [12] Bösl B., Grimminger V., Walter S.: Substrate binding to the molecular chaperone Hsp104 and its regulation by nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 38170-38176
- [13] Broco N., Tenreiro S., Viegas C.A., Sá-Correia I.: FLR1 gene (ORF YBR008c) is required for benomyl and methotrexate resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its benomyl-induced expression is dependent on *pdh3* transcriptional regulator. *Yeast*, 1999; 15: 1595-1608
- [14] Burnie J.P., Carter T.L., Hodgetts S.J., Matthews R.C.: Fungal heat-shock proteins in human disease. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2006; 30: 53-88
- [15] Cabiscol E., Belli G., Tamarit J., Echave P., Herrero E., Ros J.: Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 44531-44538
- [16] Casado C., González A., Platara M., Ruiz A., Arino J.: The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast. *Biochem. J.*, 2011; 438: 523-533
- [17] Chi Z., Arneborg N.: Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, 1999; 86: 1047-1052
- [18] Coleman S.T., Tseng E., Moye-Rowley W.S.: *Saccharomyces cerevisiae* basic region-leucine zipper protein regulatory networks converge at the ATR1 structural gene. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 23224-23230
- [19] Cutler N.S., Pan X., Heitman J., Cardenas M.E.: The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol. Biol. Cell*, 2001; 12: 4103-4113
- [20] DeRisi J., van den Hazel B., Marc P., Balzi E., Brown P., Jacq C., Goffeau A.: Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett.*, 2000; 470: 156-160
- [21] De Wever V., Reiter W., Ballarini A., Ammerer G., Brocard C.: A dual role for PP1 in shaping the Msn2-dependent transcriptional response to glucose starvation. *EMBO J.*, 2005; 24: 4115-4123
- [22] Estruch F.: Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2000; 24: 469-486
- [23] Estruch F., Carlson M.: Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 1993; 13: 3872-3881
- [24] Fassler J.S., West A.H.: Genetic and biochemical analysis of the SLN1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.*, 2010; 471: 291-317
- [25] Fernandes L., Rodrigues-Pousada C., Struhl K.: Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17: 6982-6993
- [26] Flick K.E., Gonzales L. Jr., Harrison C.J., Nelson H.C.: Yeast heat shock transcription factor contains a flexible linker between the DNA-binding and trimerization domains. Implications for DNA binding by trimeric proteins. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 12475-12481
- [27] Furuchi T., Ishikawa H., Miura N., Ishizuka M., Kajiya K., Kuge S., Naganuma A.: Two nuclear proteins, Cin5 and Ydr259c, confer

- resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.*, 2001; 59: 470-474
- [28] Gasch A.P.: Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast*, 2007; 24: 961-976
- [29] Giardina C., Lis J.T.: Dynamic protein-DNA architecture of a yeast heat shock promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 1995; 15: 2737-2744
- [30] Giustarini D., Rossi R., Milzani A., Colombo R., Dalle-Donne I.: S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J. Cell. Mol. Med.*, 2004; 8: 201-212
- [31] Görner W., Durchschlag F., Wolf J., Brown E.L., Ammerer G., Ruis H., Schüller C.: Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J.*, 2002; 21: 135-144
- [32] Grably M.R., Stanhill A., Tell O., Engelberg D.: HSF and Msn2/4p can exclusively or cooperatively activate the yeast HSP104 gene. *Mol. Microbiol.*, 2002; 44: 21-35
- [33] Grajek W., Szymanowska D.: Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji alkoholowej. *Biotechnologia*, 2008; 3: 46-63
- [34] Gregori C., Schüller C., Frohner I.E., Ammerer G., Kuchler K.: Weak organic acids trigger conformational changes of the yeast transcription factor War1 in vivo to elicit stress adaptation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 25752-25764
- [35] Grant C.M.: Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol.*, 2001; 39: 533-541
- [36] Gueldry O., Lazard M., Delort F., Dauplais M., Grigoras I., Blanquet S., Plateau P.: Ycf1p-dependent Hg(II) detoxification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 2486-2496
- [37] Gulshan K., Rovinsky S.A., Coleman S.T., Moye-Rowley W.S.: Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 40524-40533
- [38] Hahn J.S., Neef D.W., Thiele D.J.: A stress regulatory network for co-ordinated activation of proteasome expression mediated by yeast heat shock transcription factor. *Mol. Microbiol.*, 2006; 60: 240-251
- [39] Hahn J.S., Thiele D.J.: Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* heat shock transcription factor under glucose starvation conditions by Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 5169-5176
- [40] Hale S.J., Lovell S.C., de Keyzer J., Stirling C.J.: Interactions between Kar2p and its nucleotide exchange factors Sil1p and Lhs1p are mechanistically distinct. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 21600-21606
- [41] Hallstrom T.C., Katzmann D.J., Torres R.J., Sharp W.J., Moye-Rowley W.S.: Regulation of transcription factor Pdr1p function by an Hsp70 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 1147-1155
- [42] Han W., Christen P.: Interdomain communication in the molecular chaperone DnaK. *Biochem. J.*, 2003; 369: 627-634
- [43] Hasan R., Leroy C., Isnard A.D., Labarre J., Boy-Marcotte E., Toledano M.B.: The control of the yeast H₂O₂ response by the Msn2/4p transcription factors. *Mol. Microbiol.*, 2002; 45: 233-241
- [44] Hattendorf D.A., Lindquist S.L.: Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *EMBO J.*, 2002; 21: 12-21
- [45] Hatzixanthis K., Mollapour M., Seymour I., Bauer B.E., Krapf G., Schüller C., Kuchler K., Piper P.W.: Moderately lipophilic carboxylate compounds are the selective inducers of the *Saccharomyces cerevisiae* Pdr12p ATP-binding cassette transporter. *Yeast*, 2003; 20: 575-585
- [46] Hirata Y., Andoh T., Asahara T., Kikuchi A.: Yeast glycogen synthase kinase-3 activates Msn2p-dependent transcription of stress responsive genes. *Mol. Biol. Cell*, 2003; 14: 302-312
- [47] Hlaváček O., Kucerová H., Harant K., Palková Z., Váchová L.: Putative role for ABC multidrug exporters in yeast quorum sensing. *FEBS Lett.*, 2009; 583: 1107-1113
- [48] Jackson C.J., Lamb D.C., Manning N.J., Kelly D.E., Kelly S.L.: Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* sterol C5-desaturase conferring resistance to the CYP51 inhibitor fluconazole. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 309: 999-1004
- [49] Jacquet M., Renault G., Lallet S., De Mey J., Goldbeter A.: Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 2003; 161: 497-505
- [50] Jacquot C., Julien R., Guilloton M.: The *Saccharomyces cerevisiae* MFS superfamily SGE1 gene confers resistance to cationic dyes. *Yeast*, 1997; 13: 891-902
- [51] Jamieson D.J.: Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1998; 14: 1511-1527
- [52] Jensen L.T., Sanchez R.J., Srinivasan C., Valentine J.S., Culotta V.C.: Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* iron-sulfur cluster assembly genes and oxidative stress relevant to Cu,Zn superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 29938-29943
- [53] Kabani M., Beckerich J.M., Brodsky J.L.: Nucleotide exchange factor for the yeast Hsp70 molecular chaperone Ssa1p. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 4677-4689
- [54] Karlgren S., Pettersson N., Nordlander B., Mathai J.C., Brodsky J.L., Zeidel M.L., Bill R.M., Hohmann S.: Conditional osmotic stress in yeast: a system to study transport through aquaglyceroporins and osmotic stress signaling. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 7186-7193
- [55] Katzmann D.J., Hallstrom T.C., Mahé Y., Moye-Rowley W.S.: Multiple Pdr1p/Pdr3p binding sites are essential for normal expression of the ATP binding cassette transporter protein-encoding gene PDR5. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 23049-23054
- [56] Kaufman B.A., Kolesar J.E., Perlman P.S., Butow R.A.: A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 2003; 163: 457-461
- [57] Kaya A., Karakaya H.C., Fomenko D.E., Gladyshev V.N., Koc A.: Identification of a novel system for boron transport: Atr1 is a main boron exporter in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 2009; 29: 3665-3674
- [58] Kho C.W., Lee P.Y., Bae K.H., Kang S., Cho S., Lee do H., Sun C.H., Yi G.S., Park B.C., Park S.G.: Gpx3-dependent responses against oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008; 18: 270-282
- [59] Kihara A., Igarashi Y.: Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. *Mol. Biol. Cell*, 2004; 15: 4949-4959
- [60] Klobucniková V., Kohut P., Leber R., Fuchsichler S., Schweighofer N., Turnowsky F., Hapala I.: Terbinafine resistance in a pleiotropic yeast mutant is caused by a single point mutation in the ERG1 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 309: 666-671
- [61] Kolaczowska A., Goffeau A.: Regulation of pleiotropic drug resistance in yeast. *Drug Resist. Updat.*, 1999; 2: 403-414
- [62] Kontoyiannis D.P., Sagar N., Hirschi K.D.: Overexpression of Erg1p by the regulatable GAL1 promoter confers fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1999; 43: 2798-2800
- [63] Kren A., Mamnun Y.M., Bauer B.E., Schüller C., Wolfger H., Hatzixanthis K., Mollapour M., Gregori C., Piper P., Kuchler K.: War1p, a novel transcription factor controlling weak acid stress response in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 1775-1785
- [64] Kuge S., Arita M., Murayama A., Maeta K., Izawa S., Inoue Y., Nomoto A.: Regulation of the yeast Yap1p nuclear export signal is mediated by redox signal-induced reversible disulfide bond formation. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 6139-6150

- [65] Leber R., Fuchsbichler S., Klobucniková V., Schweighofer N., Pitters E., Wohlfarter K., Lederer M., Landl K., Ruckenstein C., Hapala I., Turnowsky F.: Molecular mechanism of terbinafine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 3890-3900
- [66] Le Crom S., Devaux F., Marc P., Zhang X., Moye-Rowley W.S., Jacq C.: New insights into the pleiotropic drug resistance network from genome-wide characterization of the YRR1 transcription factor regulation system. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 2642-2649
- [67] Li L., Bagley D., Ward D.M., Kaplan J.: Yap5 is an iron-responsive transcriptional activator that regulates vacuolar iron storage in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, 2008; 28: 1326-1337
- [68] Li L., Jia X., Ward D.M., Kaplan J.: Yap5 protein-regulated transcription of the TYW1 gene protects yeast from high iron toxicity. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 38488-38497
- [69] Li W.F., Yu J., Ma X.X., Teng Y.B., Luo M., Tang Y.J., Zhou C.Z.: Structural basis for the different activities of yeast Grx1 and Grx2. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1804: 1542-1547
- [70] Liu Q., Krzewska J., Liberek K., Craig E.A.: Mitochondrial Hsp70 Ssc1: role in protein folding. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 6112-6118
- [71] Loewith R., Hall M.N.: Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*, 2011; 189: 1177-1201
- [72] Lu J.M., Deschenes R.J., Fassler J.S.: *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryot. Cell*, 2003; 2: 1304-1314
- [73] Luk E., Yang M., Jensen L.T., Bourbonnais Y., Culotta V.C.: Manganese activation of superoxide dismutase 2 in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 22715-22720
- [74] Lum R., Tkach J.M., Vierling E., Glover J.R.: Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 29139-29146
- [75] Luyten K., Albertyn J., Skibbe W.F., Prior B.A., Ramos J., Thevelein J.M., Hohmann S.: Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.*, 1995; 14: 1360-1371
- [76] Maciaszczyk-Dziubinska E., Migdal I., Migocka M., Bocer T., Wysocki R.: The yeast aquaglyceroporin Fps1p is a bidirectional anion channel. *FEBS Lett.*, 2010; 584: 726-732
- [77] Mager W.H., Ferreira P.M.: Stress response of yeast. *Biochem. J.*, 1993; 290: 1-13
- [78] Mahé Y., Lemoine Y., Kuchler K.: The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids in vivo. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 25167-25172
- [79] Mahmud S.A., Hirasawa T., Furusawa C., Yoshikawa K., Shimizu H.: Understanding the mechanism of heat stress tolerance caused by high trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *J. Biosci. Bioeng.*, 2012; 113: 526-528
- [80] Mahmud S.A., Hirasawa T., Shimizu H.: Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. *J. Biosci. Bioeng.*, 2010; 109: 262-266
- [81] Marek M., Milles S., Schreiber G., Daleke D.L., Dittmar G., Herrmann A., Müller P., Pomorski T.G.: The yeast plasma membrane ATP binding cassette (ABC) transporter Aus1: purification, characterization, and the effect of lipids on its activity. *J. Biol. Chem.*, 2011; 286: 21835-21843
- [82] Martens J.A., Genereaux J., Saleh A., Brandl C.J.: Transcriptional activation by yeast PDR1p is inhibited by its association with NRG1p/ADA3p. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 15884-15890
- [83] Mason J.T., Kim S.K., Knaff D.B., Wood M.J.: Thermodynamic basis for redox regulation of the Yap1 signal transduction pathway. *Biochemistry*, 2006; 45: 13409-13417
- [84] Mendizabal I., Rios G., Mulet J.M., Serrano R., de Larrinoa I.F.: Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.*, 1998; 425: 323-328
- [85] Mielniczki-Pereira A.A., Schuch A.Z., Bonatto D., Cavalcante C.F., Vaitsman D.S., Riger C.J., Eleuterio E.C., Henriques J.A.: The role of the yeast ATP-binding cassette Ycf1p in glutathione and cadmium ion homeostasis during respiratory metabolism. *Toxicol. Lett.*, 2008; 180: 21-27
- [86] Miyahara K., Hirata D., Miyakawa T.: yAP-1- and yAP-2-mediated, heat shock-induced transcriptional activation of the multidrug resistance ABC transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 1996; 29: 103-105
- [87] Miyahara K., Mizunuma M., Hirata D., Tsuchiya E., Miyakawa T.: The involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p in cation resistance. *FEBS Lett.*, 1996; 399: 317-320
- [88] Murray D.B., Haynes K., Tomita M.: Redox regulation in respiring *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011; 1810: 945-958
- [89] Nathan D.F., Vos M.H., Lindquist S.: In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 12949-12956
- [90] Nevitt T., Pereira J., Rodrigues-Pousada C.: YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2004; 21: 1365-1374
- [91] Nunes P.A., Tenreiro S., Sá-Correia I.: Resistance and adaptation to quinidine in *Saccharomyces cerevisiae*: role of QDR1 (YIL120w), encoding a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily required for multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001; 45: 1528-1534
- [92] Ohdate T., Izawa S., Kita K., Inoue Y.: Regulatory mechanism for expression of GPX1 in response to glucose starvation and Ca in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of Snf1 and Ras/cAMP pathway in Ca signaling. *Genes Cells*, 2010; 15: 59-75
- [93] Oskouian B., Saba J.D.: YAP1 confers resistance to the fatty acid synthase inhibitor cerulenin through the transporter Flr1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 1999; 261: 346-353
- [94] Pahlman A.K., Granath K., Ansell R., Hohmann S., Adler L.: The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 3555-3563
- [95] Paluszynski J.P., Klassen R., Meinhardt F.: Genetic prerequisites for additive or synergistic actions of 5-fluorocytosine and fluconazole in baker's yeast. *Microbiology*, 2008; 154: 3154-3164
- [96] Parsell D.A., Kowal A.S., Lindquist S.: *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 4480-4487
- [97] Pascual-Ahuir A., Serrano R., Proft M.: The Sko1p repressor and Gen4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 2001; 21: 16-25
- [98] Paumi C.M., Chuck M., Snider J., Stagljar I., Michaelis S.: ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2009; 73: 577-593
- [99] Petkova M.I., Pujol-Carrion N., Arroyo J., Garcia-Cantalejo J., Angeles de la Torre-Ruiz M.: Mtl1 is required to activate general stress response through Tor1 and Ras2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 19521-19531
- [100] Pfaller M.A.: Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am. J. Med.*, 2012; 125 (Suppl. 1): S3-S13

- [101] Platara M., Ruiz A., Serrano R., Palomino A., Moreno F., Arino J.: The transcriptional response of the yeast Na⁺-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 36632-36642
- [102] Posas F., Saito H.: Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.*, 1998; 17: 1385-1394
- [103] Prackelt U.M., Meacock P.A.: HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol. Gen. Genet.*, 1990; 223: 97-106
- [104] Queval G., Jaillard D., Zechmann B., Noctor G.: Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ.*, 2011; 34: 21-32
- [105] Rank G.H., Gerlach J.H., Robertson A.J.: Some physiological alterations associated with pleiotropic cross resistance and collateral sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 1976; 144: 281-288
- [106] Reiser V., Raitt D.C., Saito H.: Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J. Cell Biol.*, 2003; 161: 1035-1040
- [107] Rep M., Proft M., Remize F., Tamas M., Serrano R., Thevelein J.M., Hohmann S.: The *Saccharomyces cerevisiae* Sko1p transcription factor mediates HOG pathway-dependent osmotic regulation of a set of genes encoding enzymes implicated in protection from oxidative damage. *Mol. Microbiol.*, 2001; 40: 1067-1083
- [108] Richter K., Muschler P., Hainzl O., Buchner J.: Coordinated ATP hydrolysis by the Hsp90 dimer. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 33689-33696
- [109] Rockwell N.C., Wolfger H., Kuchler K., Thorner J.: ABC transporter Pdr10 regulates the membrane microenvironment of Pdr12 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.*, 2009; 229: 27-52
- [110] Rubio-Teixeira M., Van Zeebroeck G., Voordeckers K., Thevelein J.M.: *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane nutrient sensors and their role in PKA signaling. *FEMS Yeast Res.*, 2010; 10: 134-149
- [111] Rutherford J.C., Bird A.J.: Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot. Cell*, 2004; 3: 1-13
- [112] Rutledge R.M., Esser L., Ma J., Xia D.: Toward understanding the mechanism of action of the yeast multidrug resistance transporter Pdr5p: a molecular modeling study. *J. Struct. Biol.*, 2011; 173: 333-344
- [113] Sá-Correia I., dos Santos S.C., Teixeira M.C., Cabrito T.R., Mira N.P.: Drug:H⁺ antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends Microbiol.*, 2009; 17: 22-31
- [114] Sá-Correia I., Tenreiro S.: The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *J. Biotechnol.*, 2002; 98: 215-226
- [115] Sakasagawa Y., Hachiya N.S., Tsukita S., Kaneko K.: Ecm10p localizes in yeast mitochondrial nucleoids and its overexpression induces extensive mitochondrial DNA aggregations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003; 309: 217-221
- [116] Sakurai H., Fukasawa T.: A novel domain of the yeast heat shock factor that regulates its activation function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001; 285: 696-701
- [117] Sanchez Y., Taulien J., Borkovich K.A., Lindquist S.: Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J.*, 1992; 11: 2357-2364
- [118] Sanglard D.: Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, 2002; 20: 462-469
- [119] Santhanam A., Hartley A., Düvel K., Broach J.R., Garrett S.: PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factors Msn2p. *Eukaryot. Cell*, 2004; 3: 1261-1271
- [120] Santoro N., Johansson N., Thiele D.J.: Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and trans-activation domain requirements for heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 6340-6352
- [121] Schnabl M., Oskolkova O.V., Holic R., Brezná B., Pichler H., Zágorský M., Kohlwein S.D., Paltauf F., Daum G., Griac P.: Subcellular localization of yeast Sec14 homologues and their involvement in regulation of phospholipid turnover. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 3133-3145
- [122] Servos J., Haase E., Brendel M.: Gene SNQ2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. *Mol. Gen. Genet.*, 1993; 236: 214-218
- [123] Sharma D., Masison D.C.: Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein Pept. Lett.*, 2009; 16: 571-581
- [124] Siderius M., Van Wuytswinkel O., Reijenga K.A., Kelders M., Mager W.H.: The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol. Microbiol.*, 2000; 36: 1381-1390
- [125] Smallbone K., Malys N., Messiha H.L., Wishart J.A., Simeonidis E.: Building a kinetic model of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.*, 2011; 500: 355-370
- [126] Smith D.A., Morgan B.A., Quinn J.: Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010; 306: 1-8
- [127] Smits G.J., Brul S.: Stress tolerance in fungi – to kill a spoilage yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2005; 16: 225-230
- [128] Tamai K.T., Liu X., Silar P., Sosinowski T., Thiele D.J.: Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signalling pathways. *Mol. Cell. Biol.*, 1994; 14: 8155-8165
- [129] Tamás M.J., Wysocki R.: Mechanisms involved in metalloid transport and tolerance acquisition. *Curr. Genet.*, 2001; 40: 2-12
- [130] Teixeira M.C., Dias P.J., Simoes T., Sá-Correia I.: Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of FLR1 under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008; 367: 249-255
- [131] Teixeira M.C., Mira N.P., Sá-Correia I.: A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011; 22: 150-156
- [132] Tenreiro S., Nunes P.A., Viegas C.A., Neves M.S., Teixeira M.C., Cabral M.G., Sa-Correia I.: AQR1 gene (ORF YNL065w) encodes a plasma membrane transporter of a major facilitator superfamily that confers resistance to short-chain monocarboxylic acids and quinidine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 292: 741-748
- [133] Tenreiro S., Rosa P.C., Viegas C.A., Sá-Correia I.: Expression of the AZR1 gene (ORF YGR224w), encoding a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily, is required for adaptation to acetic acid and resistance to azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2000; 16: 1469-1481
- [134] Tenreiro S., Vargas R.C., Teixeira M.C., Magnani C., Sá-Correia I.: The yeast multidrug transporter Qdr3 (Ybr043c): localization and role as a determinant of resistance to quinidine, barbiturates, cisplatin, and bleomycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005; 327: 952-959
- [135] Treger J.M., Schmitt A.P., Simon J.R., McEntee K.: Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 26875-26879
- [136] Trotter E.W., Grant C.M.: Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, 2005; 4: 392-400

- [137] Tyson J.R., Stirling C.J.: LHS1 and SIL1 provide luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, 2000; 19: 6440-6452
- [138] Uemura T., Tachihara K., Tomitori H., Kashiwagi K., Igarashi K.: Characteristics of the polyamine transporter TPO1 and regulation of its activity and cellular localization by phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 9646-9652
- [139] van den Hazel H.B., Pichler H., do Valle Matta M.A., Leitner E., Goffeau A., Daum G.: PDR16 and PDR17, two homologous genes of *Saccharomyces cerevisiae*, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 1934-1941
- [140] Vargas R.C., Tenreiro S., Teixeira M.C., Fernandes A.R., Sá-Correia I.: *Saccharomyces cerevisiae* multidrug transporter Qdr2p (Yil121wp): localization and function as a quinidine resistance determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004; 48: 2531-2537
- [141] Vido K., Spector D., Lagniel G., Lopez S., Toledano M.B., Labarre J.: A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 8469-8474
- [142] Welker S., Rudolph B., Frenzel E., Hagn F., Liebisch G., Schmitz G., Scheuring J., Kerth A., Blume A., Weinkauff S., Haslbeck M., Kessler H., Buchner J.: Hsp12 is an intrinsically unstructured stress protein that folds upon membrane association and modulates membrane function. *Mol. Cell*, 2010; 39: 507-520
- [143] White T.C., Marr K.A., Bowden R.A.: Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998; 11: 382-402
- [144] Wilcox L.J., Balderes D.A., Wharton B., Tinkelenberg A.H., Rao G., Sturley S.L.: Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 32466-32472
- [145] Wolfger H., Mamnun Y.M., Kuchler K.: The yeast Pdr15p ATP-binding cassette (ABC) protein is a general stress response factor implicated in cellular detoxification. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 11593-11599
- [146] Wotton D., Freeman K., Shore D.: Multimerization of Hsp42p, a novel heat shock protein of *Saccharomyces cerevisiae*, is dependent on a conserved carboxyl-terminal sequence. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 2717-2723
- [147] Wu A.L., Moye-Rowley W.S.: GSH1, which encodes γ -glutamylcysteine synthetase, is a target gene for γ AP-1 transcriptional regulation. *Mol. Cell Biol.*, 1994; 14: 5832-5839
- [148] 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*, 2004; 15: 2049-2060
- [149] Zechmann B., Liou L.C., Koffler B.E., Horvat L., Tomasić A., Fulgosi H., Zhang Z.: Subcellular distribution of glutathione and its dynamic changes under oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, 2011; 11: 631-642

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.