

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Галкина Ксения Викторовна

**Молекулярно-биологические основы регуляции множественной
лекарственной устойчивости дрожжей в условиях дисфункции
митохондрий**

03.01.03 «Молекулярная биология»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Кнорре Дмитрий Алексеевич

Москва – 2020

Оглавление

Список сокращений	5
Введение.....	7
Обзор литературы	13
1. Мембранные переносчики с широкой субстратной специфичностью как ключевой фактор множественной лекарственной устойчивости.	13
2. Строение и механизм работы ABC-переносчиков.....	14
3. Регуляция экспрессии ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью	19
4. Липофильные катионы как субстраты и возможные активаторы МЛУ	25
5. Редокс-регуляция лекарственной устойчивости	29
6. Связь множественной лекарственной устойчивости с митохондриальной динамикой.....	32
Материалы и методы	35
1. Генотипы штаммов дрожжей, используемых в работе	35
2. Праймеры и плазмиды	43
3. Условия культивирования дрожжевых клеток.....	48
4. Микробиологические среды для культивирования	48
5. Выделение геномной ДНК из дрожжей <i>S. cerevisiae</i>	50
6. Пересаживание ДНК.....	51
7. Полимеразная цепная реакция	51
8. Электрофорез ДНК в агарозном геле	52
9. Выделение тотальной РНК из дрожжей.....	52
10. Обратная транскрипция	54
11. ПЦР в реальном времени	55
12. Трансформация дрожжей <i>S. cerevisiae</i> с использованием 0,1 М LiAc буфера	56
13. Выделение митохондрий из клеток дрожжей <i>S. cerevisiae</i> и измерение скорости поглощения кислорода.....	57
14. Митохондриальное дыхание.....	60
15. Анализ устойчивости к химическим агентам по скорости роста	60

16. Проточная цитофлуориметрия	61
17. Флуоресцентная микроскопия.....	61
18. Определение морфологии митохондрий <i>in vivo</i>	62
19. Скрещивание клеток и растаскивание тетрад.....	63
20. Получение <i>Rho0</i> клеток.....	64
Результаты	66
1. Липофильные катионы индуцируют множественную лекарственную устойчивость в дрожжах	66
1.1 Динамика накопления липофильного катиона $C_{12}R1$ клетками дрожжей <i>S.cerevisiae</i>	66
1.2 Липофильный катион $C_{12}TRP$ стимулирует накопление ABC- переносчиков во внешней мембране клеток.....	68
1.3 $C_{12}TRP$ может быть как активатором, так и конкурентным ингибитором ABC-переносчиков	72
1.4 Разобщение цитоплазматического и митохондриального пула нуклеотидов не препятствует активации МЛУ липофильными катионами	76
1.5 Деполяризация митохондрий не приводит к дополнительной активации ABC-переносчиков под действием липофильных катионов.....	81
1.6 Роль ретроградной митохондриальной сигнализации и транскрипционных факторов Pdr1p, Pdr3p в активации МЛУ под действием $C_{12}TRP$	86
1.7 Поиск генов, функция которых необходима для $C_{12}TRP$ -зависимой активации МЛУ.....	89
2. Редокс-регуляция множественной лекарственной устойчивости в клетках дрожжей	93
2.1 Липофильные катионы - субстраты и конкурентные ингибиторы основных ABC-переносчиков дрожжей <i>C.glabrata</i>	94
2.2 Антиоксиданты препятствуют активации МЛУ в клетках <i>C.glabrata</i> с делецией гена <i>CDR1</i>	99
2.3 Перекись водорода активирует МЛУ в клетках <i>C.glabrata</i> независимо от Pdr1p.....	102
2.4 Исследование влияния липофильных катионов как ингибиторов и активаторов МЛУ-переносчиков на цитостатический эффект азольных антимикотиков.	105

3. Исследование роли белков митохондриальной динамики в активация МЛУ.	109
Обсуждение	114
Выводы.....	119
Благодарности	120
Список литературы	121

Список сокращений

АФК - активные формы кислорода

МИК - минимальная ингибирующая концентрация

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЭГ - полиэтиленгликоль

ТФ - транскрипционный фактор

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПР - эндоплазматический ретикулум

ABC - ATP-Binding Cassette

ADP - аденозиндифосфат

АТР – аденозинтрифосфат

BSA - бычий сывороточный альбумин

CATR - карбоксиатрактилат

CLZ - клотримазол

C₁₂R1 - додецилродамин 19

C₁₂TRP - додецилтрифенилфосфоний

FCCP - карбонил цианид-4-(трифлуорометокси)фенилгидразон

ERMES - Endoplasmatic Reticulum-Mitochondria Encounter Structure

GFP - зеленый флуоресцентный белок

GTP - гуанозинтрифосфат

MFS - Major Facilitator Superfamily

MDR - MultiDrug Resistance

MNZ - миконазол

MRP - Multidrug Resistance-associated Protein

PCP - пентахлорфенол

PDR - Pleiotropic Drug Resistance

R6G - родамин 6G

SDS - додецилсульфат натрия

SkQ1 - пластохинонил-децилтрифенилфосфоний

TMR - тетраметилродамин

TPH - α -токоферол

Введение

Актуальность темы исследования.

Мембранные переносчики с широкой субстратной специфичностью — одна из систем защиты клетки от токсичных соединений. Работа этих переносчиков снижает эффективность химиотерапии и антимикробных препаратов, а также приводит к появлению множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) — резистентности клеток к широкому спектру низкомолекулярных соединений с разными физико-химическими свойствами. Поэтому, понимание механизмов работы этих переносчиков и принципов их регуляции представляет как фундаментальный, так и практический интерес.

Степень разработанности темы.

Известно, что у грибов попадание ксенобиотика (чужеродного соединения) в цитоплазму индуцирует экспрессию генов, кодирующих переносчики с широкой субстратной специфичностью. Транскрипционные факторы Pdr1p/Pdr3p имеют неспецифический карман связывания низкомолекулярных соединений, похожий на соответствующий сайт (карман) связывания ксенобиотиков мембранными переносчиками. Связывание ксенобиотика этими транскрипционными факторами вызывает изменения их конформации и активирует экспрессию генов-мишеней, кодирующих ABC- (ATP binding cassette) и MFS- (major facilitator superfamily) переносчики с широкой субстратной специфичностью [1]. Таким образом, многие субстраты неспецифических переносчиков являются одновременно и индукторами генов, кодирующих эти самые переносчики. Представляет интерес найти такие соединения, которые бы легко проникали в клетки грибов, но при этом не обнаруживались бы данной системой и не приводили к активации генов неспецифических переносчиков. Липофильные катионы способны проникать в клетку, а в клетках — аккумулируются в митохондриях. Адресация терпенов с антигрибковыми свойствами в митохондрии в виде химерных молекул на основе липофильных катионов

позволяет использовать эти соединения против патогенных грибов с множественной лекарственной устойчивостью, нечувствительных к обычным антигрибковым соединениям (Chang et al 2018). Однако механизмы регуляции систем МЛУ, в ответ на появление в клетки липофильных катионов мало изучены.

Цель данной работы — исследование принципов регуляции множественной лекарственной устойчивости на примере клеток дрожжей, подвергнутых воздействию липофильных катионов.

Задачи:

1. Определить динамику ингибирующего и активирующего эффектов липофильных катионов на активность неспецифических АВС-переносчиков в клетках дрожжей.
2. Выявить гены, делеция которых препятствует активации неспецифических АВС-переносчиков под действием липофильных катионов. Проверить, необходимы ли гены ретроградной сигнализации для активации системы неспецифической защиты клетки, вызванной липофильными катионами.
3. Получить и охарактеризовать штамм, в котором подавлена транслокация адениновых нуклеотидов между матриксом митохондрий и цитоплазмой. Проверить, является ли такая транслокация необходимым фактором для активации неспецифических АВС-переносчиков под действием липофильных катионов.
4. Проверить гипотезу о том, что антиоксиданты препятствуют активации неспецифической лекарственной устойчивости в клетках дрожжей *Candida glabrata*.

Научная новизна.

В результате проделанной работы были выявлены принципы регуляции множественной лекарственной устойчивости клеток под воздействием липофильных катионов. Во-первых, было показано, что в зависимости от времени воздействия данные соединения могут выступать как в роли

индукторов, так и в роли конкурентных ингибиторов МЛУ-переносчиков. Во-вторых, было установлено, что ключевая роль в активации МЛУ липофильными катионами принадлежит транскрипционному фактору Pdr1p. Был получен и охарактеризован штамм, в котором ген основного АТФ/АДР-антипортера *PET9* поставлен под регулируемый галактозный промотор. Было показано, что подавление обмена адениновыми нуклеотидами между матриксом митохондрий и цитоплазмой, а также нарушение путей митохондриальной ретроградной сигнализации не препятствуют активации МЛУ под воздействием липофильных катионов. Кроме того, мы показали, что добавление перекиси водорода в качестве прооксиданта способно дополнительно увеличить уровень активности МЛУ на фоне его индукции липофильными катионами. В свою очередь, добавление антиоксиданта пластохинонилдецилтрифенилфосфония снижает уровень активации МЛУ и увеличивает цитостатический эффект миконазола в штамме с делецией гена основного АВС-переносчика.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Полученные результаты вносят вклад в понимание механизмов множественной лекарственной устойчивости у дрожжей. Данные этой работы могут быть использованы для разработки более эффективных противогрибковых препаратов, а также для развития новых стратегий применения уже известных антимикотиков. В частности, согласно нашим данным, антиоксиданты или конкурентные ингибиторы МЛУ-переносчиков могут использоваться в совместной терапии с антимикотиками для увеличения их цитостатического эффекта и, соответственно, снижения рабочей концентрации антимикотиков. Более того, выявленные нами закономерности регуляции активности переносчиков с широкой субстратной специфичностью могут быть использованы не только для преодоления проблемы множественной лекарственной устойчивости клеток при лечении микозов, но и при разработке противоопухолевых препаратов.

Методология и методы исследования.

Работа выполнена с использованием стандартных молекулярно-биологических, биохимических и микробиологических методов. В качестве объектов были использовали штаммы пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, полученных на основе W303 и BY4741 и условно патогенные штаммы дрожжей *Candida glabrata*. Дрожжи растили на различных богатых и синтетических питательных средах согласно (Sherman, 2002). Штаммы, необходимые для исследования, получали согласно стандартным протоколам путем трансформации клеток ПЦР продуктом литий-ацетатным методом; скрещиванием, спорулированием и тетрадным анализом либо инкубацией с бромистым этидием (для потери митохондриальной ДНК). Цифровые изображения были получены с помощью камеры Olympus DP30BW на флуоресцентном микроскопе Olympus BX51 с применением дифференциально-интерференционного контраста. Количественно интенсивность флуоресценции GFP и Нильского красного мы оценивали с помощью CytoFLEX (Beckman Coulter, США) и EC800 (Sony, Япония). Устойчивость к химическим соединениям определяли по скорости роста с помощью планшетного спектрофотометра VARIOSKAN LUX (Thermo Scientific). Относительное количество мРНК генов основных МЛУ-переносчиков измеряли методом ПЦР в режиме реального времени. Данные обрабатывали с использованием пакета статистических программ R (<http://www.R-project.org>).

Положения, выносимые на защиту:

1. Липофильные катионы являются одновременно конкурентными ингибиторами и индукторами МЛУ-переносчиков в клетках дрожжей *S.cerevisiae* и *C.glabrata*. Ингибирующий и активирующий эффекты разнесены во времени.
2. МЛУ, вызванная липофильным катионом C₁₂TPP, не опосредована Rtg-путем ретроградной сигнализации, но зависит от транскрипционного фактора Pdr1p.

3. Перекись водорода активирует экспрессию гена *Yap1p*-зависимого MFS-переносчика *FLR1* и усиливает эффект активации МЛЮ под действием C_{12} ТРР.
4. Делеция гена ключевого неспецифического АВС-переносчика дрожжей *C.glabrata CDR1* делает систему регуляции МЛЮ чувствительной к экзогенным антиоксидантам
5. Нарушения биосинтеза эргостерина на уровне реакций, катализируемых *Erg9p*, *Erg6p*, *Erg5p*, *Erg4p* и нарушения его транспорта белками *Lam*-семейства приводят к изменению содержания в клетках *Pdr5p* — АВС-переносчика с широкой субстратной специфичностью.

Степень достоверности и апробация результатов.

Материалы настоящей работы были представлены на V Съезде Биохимиков России (Сочи, Россия, 2016), Четвёртом съезде микологов России (Москва, Россия, 2017), международной конференции "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, Россия, 2017), 36th Small Meeting on Yeast Transport and Energetics (Мартина Франка, Италия, 2018), Biomembranes 2018 (Долгопрудный, Россия, 2018) и The 44th FEBS Congress (Краков, Польша 2019).

Личный вклад автора.

Основные результаты работы были получены самим автором в период с 2015 по 2019 г. Личный вклад автора заключается в самостоятельном анализе литературы, планировании и выполнении экспериментов, а также в обработке и анализе полученных данных. Автор также самостоятельно представлял результаты исследований на конференциях и участвовал в написании статей.

Структура и объем диссертации.

Материалы диссертации изложены на 133 страницах машинописного текста и включают 36 рисунков и 10 таблиц. Диссертация состоит из разделов: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и

методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы (последний раздел содержит 156 источников).

Обзор литературы

1. Мембранные переносчики с широкой субстратной специфичностью как ключевой фактор множественной лекарственной устойчивости.

Способность клеток выживать в присутствии различных токсичных соединений носит название множественной лекарственной устойчивости (МЛУ). Понимание принципов и механизмов возникновения МЛУ клеток грибов представляет особый интерес, так как медицинские достижения последних десятилетий в трансплантологии, лечении СПИДа и онкологических заболеваний привели к значительному увеличению количества пациентов, страдающих от грибковых инфекций [2–4]. В тоже время, широкое применение в клинике антимикотиков приводит к возникновению МЛУ у патогенных видов грибов и существенно осложняет лечение микозов.

Попадая в грибную клетку некоторые токсичные соединения могут частично разрушаться, например, за счет окисления белками семейства цитохромов P450. Однако основным механизмом, обеспечивающим клеткам МЛУ является работа неспецифических переносчиков плазматической мембраны, выбрасывающих чужеродные соединения из цитоплазмы. Существует два основных класса МЛУ-переносчиков (МЛУ-транспортеров): MFS (major facilitator superfamily) и ABC (ATP binding cassette) переносчики [5]. Основное различие этих классов заключается в источнике энергии, используемом для переноса молекулы ксенобиотика через мембрану. Так, MFS-транспортеры используют энергию переноса протона, а ABC-транспортеры работают за счет энергии гидролиза АТФ [5]. Кроме того, в список субстратов MFS-переносчиков входит относительно узкий спектр соединений, в то время как ABC-переносчики обладают широкой субстратной специфичностью [5,6].

2. Строение и механизм работы ABC-переносчиков

Белки ABC-транспортеры были найдены во всех клетках всех живых организмов [5]. В геноме дрожжей *S.cerevisiae* обнаружено 29 генов ABC-переносчиков [7]. Большинство ABC-переносчиков локализируются в цитоплазматической мембране, но некоторые могут также находиться в мембранах вакуолей, пероксисом и митохондрий (Рисунок 1) [8]. В список их субстратов входят различные ионы, сахара, аминокислоты, витамины, пептиды, стероиды и мембранные фосфолипиды [9,10]. При этом ширина специфичности различных представителей ABC-переносчиков может существенно отличаться даже внутри семейств, выделяемых на основе их структуры [5].

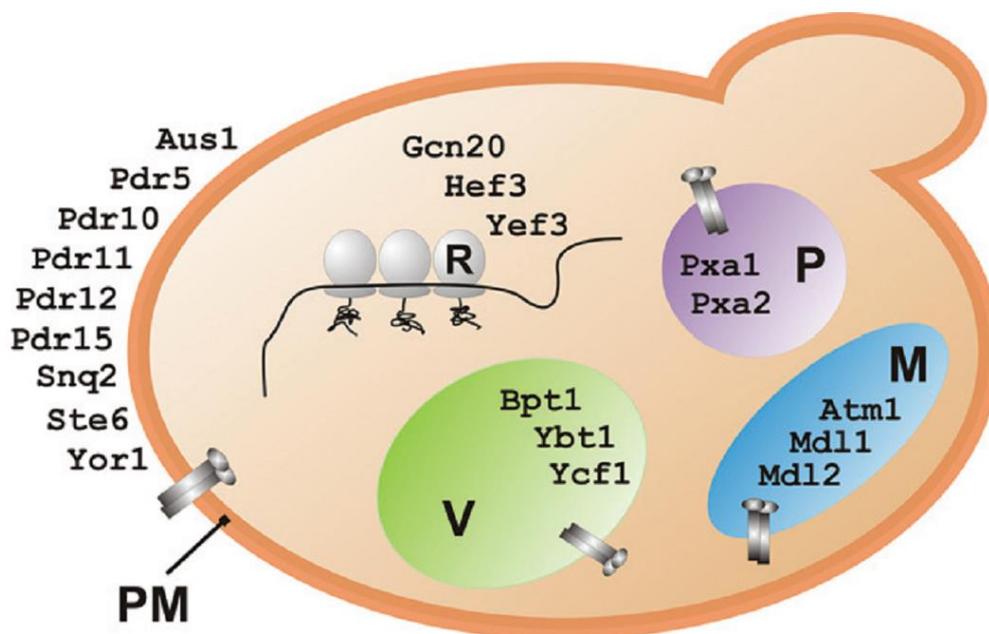


Рисунок 1. Локализация ABC-транспортеров в клетке *S.cerevisiae* [8]. PM - плазматическая мембрана; P - пероксисома; M - митохондрия; V - вакуоль.

Структура ABC-переносчиков включает в себя нуклеотид-связывающие домены, внутри которых происходит связывание и гидролиз АТФ, и трансмембранные домены для закоривания в мембране. В настоящее время, в зависимости от топологии этих доменов, выделяют девять семейств ABC-переносчиков, которые пронумерованы от А до I, согласно номенклатуре HUGO (human genome organisation) [11,12]. Семейства АВСС

(MRP — multidrug-resistance protein) и ABCG (PDR — pleiotropic drug resistance) наиболее часто ассоциируют с возникновением множественной лекарственной устойчивости у дрожжей [7,13–15]. Белки обоих этих семейств содержат по два нуклеотид-связывающих домена и два (в MRP иногда три) трансмембранных домена, состоящих из шести трансмембранных спиралей, соединенных торчащими из мембраны в обе стороны петлями (Рисунок 3) [8].

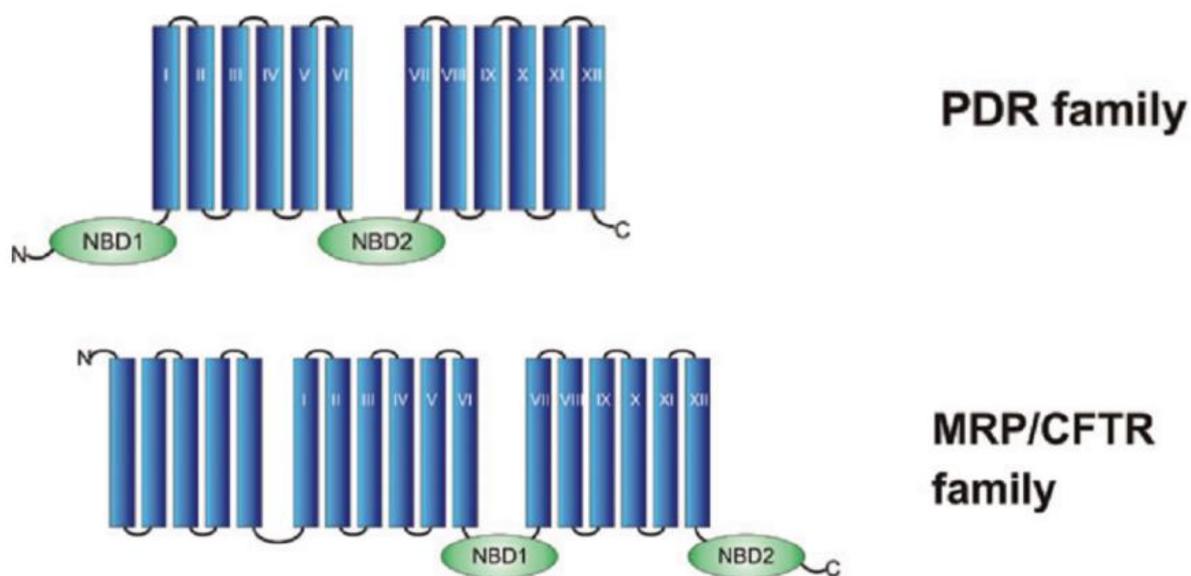


Рисунок 2. Топология белков семейства PDR и MRP. NBD - нуклеотид-связывающий домен. Рисунок создан на основе иллюстрации из работы С.Klein и др. [8].

Крупнейшее семейство PDR-транспортеров содержит два основных и наиболее изученных дрожжевых ABC-транспортера *S. cerevisiae* — Pdr5p и Snq2p. Сверхэкспрессия данных белков приводит к устойчивости дрожжей к широкому спектру соединений, включая азольные антимикотики, гербициды и др. [16,17] (Таблица 1). Еще одним ABC-переносчиком, обеспечивающим МЛУ клеткам *S. cerevisiae* является представитель семейства MRP — Yor1p [18,19]. Делеция гена *YOR1* увеличивает чувствительность клеток к большому количеству ксенобиотиков: азолам, реверомицину А, олигомицину А и др.[18,20] (Таблица 1). Необходимо отметить, что во многих работах вывод о том, что заданное вещество является субстратом того или иного

переносчика с широкой субстратной специфичностью, основан на различии резистентности штаммов дикого типа и штамма с deletированным геном соответствующего переносчика. Однако такой результат лишь косвенно указывает на возможность активного выкачивания данного вещества из клетки. В тоже время, можно предположить, что в некоторых случаях активность переносчика может влиять на липидный состав мембраны и менять ее проницаемость для данного соединения.

Таблица 1

Известные субстраты основных ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью *S. cerevisiae*

Субстраты Pdr5p	Субстраты Snq2p	Субстраты Yor1p
тетраалкилтины, азолы, триалкилтин хлориды, хлорамфеникол [21,22], олигомицин, М-С ₆ -NBD-PE (флуоресцентный аналог фосфолипидов) [23], R6G, родамин 123, даунорубицин, доксорубицин (антрациклиновые антибиотики), тамоксифен, трифлуоперазин, А23187, монезин, нигрицин, прогестерон, дезоксикортикостерон [24], нистатин, морфолины, производные мочевины, тетрациклин,	имазалил (энилконазол) - другие азолы в меньшей степени (итраконазол, кетоконазол, триадимефон, миконазол), нистатин, морфолины, производные мочевины, байкалеин беномил, гельминтоспорол [22], камптотецин [26], кофеин [25]	родамин В, М-С ₆ -NBD-PE (флуоресцентный аналог фосфолипидов) [23], олигомицин [22,23], ауреобазидин А [27], реверомицин А и другие органические анионы с карбоксильными группами, включая уксусную кислоту [19], R6G, доксорубицин, бромистый этидий, эозин Y, верапамил (но не о-фенантролин и флуоресцеин) [28], тетрациклин [22,28], имазалил (энилконазол), миконазол, пропанил, эпоксиконазол, нистатин, производные мочевины, эритромицин, флавоноиды, нигерицин,

трифторперазин, валиномицин, 4NQO, цвиттергент 3-14 [22], кофеин [25]		валиномицин, 4NQO, цвиттергент 3-12 [22]
--	--	---

Изучаются МЛУ-переносчиков патогенных видов дрожжей позволило установить, что большая часть хорошо охарактеризованных АВС-переносчиков из дрожжей различных родов *Candida* это ортологи белков *S. cerevisiae*. Так, в условно патогенных видах *C.albicans* и *C.glabrata* основными АВС-транспортерами, обеспечивающими устойчивость к антимикотикам, являются белки Cdr1p (гомолог Pdr5p в *S. cerevisiae*), Cdr2p и Snq2p [29].

Низкая субстратная специфичность АВС-переносчиков, по-видимому, определяется наличием нескольких сайтов связывания с субстратом. Так, для первого из охарактеризованных МЛУ-переносчиков млекопитающих Р-гликопротеина описано, как минимум, 2 сайта связывания: Н-сайт, который взаимодействует с бисбензимидам (Ноеchst 33342) и R-сайт, связывающий родамин 123 [30]. Таким образом, только часть субстратов, взаимодействующих с одинаковым центром связывания, может являться конкурентными ингибиторами друг для друга. Кроме того, в случае транспорта ряда ксенобиотиков (колхицин, кверцетин, антрациклины) между R- и Н-сайтом проявляется положительная кооперация: связывание вещества с одним из сайтов может стимулировать транспорт за счет другого [30]. Некоторые вещества, например винбластин и актиномицин D, могут взаимодействовать сразу с двумя сайтами связывания [30].

Эксперименты с использованием радиоактивно меченного хлорамфеникола и тритилимидазола показывают, что Pdr5p обладает сразу тремя независимыми сайтами для связывания и транспортировки субстратов [21]. В то время, как заряд и способность образовывать водородные связи являются решающими для распознавания молекулы субстрата Р-

гликопротеином [31,32], АВС-переносчик Pdr5p, по-видимому, выбирает субстрат, в первую очередь, по размеру ($200\text{--}225 \text{ \AA}^3$)[21,33,34]. В случае с Pdr5p гидрофобность субстрата необходима, чтобы достигнуть переносчика, заключенного в мембране, в то время как только один из трех сайтов связывания субстрата является гидрофобным [33].

Механизм работы всех АВС-транспортеров можно описать в рамках одной общей модели, включающей в себя четыре последовательных стадии (Рисунок 3) [35,36].

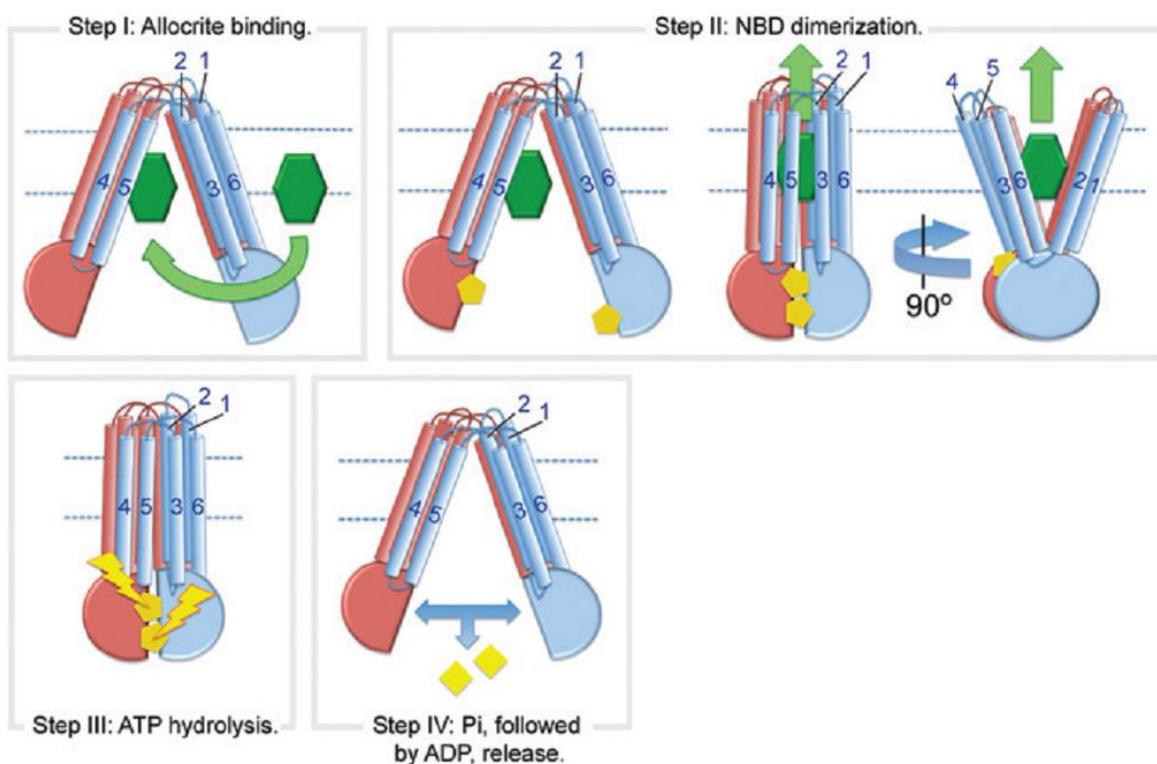


Рисунок 3. Каталитический цикл АВС-транспортера. Нуклеотид-связывающие домены обозначены полукругами [36].

В начале каталитического цикла АВС-транспортер находится в V-конформации с карманом связывания субстрата, открытым в цитоплазму. Взаимодействие с субстратом приводит к “схлопыванию” белка и уменьшению расстояния между нуклеотид-связывающими доменами. При этом 2 молекулы АТФ оказываются зажаты между ними. Подобные конформационные изменения снижают сродство с субстратом в субстрат-связывающем кармане. Высвобождение молекулы субстрата в окружающую среду, предположительно, стимулирует процесс гидролиза молекул АТФ [35].

Диссоциация ADP и фосфата из нуклеотид-связывающего домена, в свою очередь, переводит ABC-переносчик в исходное конформационное состояние.

Подобный механизм клеточной защиты с участием ABC-переносчиков является очень энергозатратным. Так, для дрожжей *S.cerevisiae* с инактивированными ABC-транспортерами было показано, что их количество внутриклеточного АТФ и плотность в стационарной фазе роста выше по сравнению с контрольными клетками дикого типа [37]. Более того, в нормальных условиях сверхэкспрессия основного PDR-переносчика Pdr5p снижает приспособленность и скорость роста клеток *S.cerevisiae* по сравнению с контролем [38]. Подобная энергозатратность, по-видимому, является причиной того, что в отсутствие ксенобиотика гены PDR-транспортеров находятся в репрессированном состоянии и активируются только при попадании в клетку чужеродных соединений.

3. Регуляция экспрессии ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью

Активность МЛУ-переносчиков регулируется на уровне экспрессии ядерными транскрипционными факторами Pdr1p и Pdr3p, содержащими домен “цинковый палец” (Zn_2Cys_6). Несмотря на то, что в *S.cerevisiae* аминокислотная последовательность транскрипционных факторов Pdr1p и Pdr3p совпадает только на 33%, они имеют одинаковую доменную архитектуру: N-концевой ДНК-связывающий домен, центральный регуляторный домен и C-концевой кислый активационный домен [18,39–41]. Pdr1p и Pdr3p локализованы преимущественно в ядре [42], где они образуют гомо- или гетеродимеры и связываются с палиндромными восьми нуклеотидными консенсусными сайтами связывания PDRE (Pdr1/Pdr3 Response Element) в области промотора гена-мишени [5,16,18,41]. Уровень экспрессии *PDR1* в клетке обычно постоянен, в то время как уровень экспрессии *PDR3* может значительно меняться [43,44]. Известно, что

промотор гена *PDR3* содержит две последовательности PDRE, что обеспечивает данному транскрипционному фактору положительную саморегуляцию [41,45]. В то же самое время механизм погашения сигнала активации транскрипции данных транскрипционных факторов неизвестен.

С помощью делеционного анализа было показано, что Pdr1/Pdr3 могут напрямую связываться с некоторыми ксенобиотиками (кетоконазол и т.п.) за счет 250-аминокислотного гидрофобного домена, располагающегося ближе с С-концу [1]. Данное взаимодействие позволяет этим транскрипционным факторам связываться с Gal11p — субъединицей медиаторного комплекса, обеспечивающего посадку РНК-полимеразы II для экспрессии гена-мишени [1,5,46].

В *S. cerevisiae* основными мишенями, которые активируются транскрипционными факторами Pdr1/Pdr3, являются гены основных ABC-переносчиков *PDR5*, *SNQ2*, *YOR1* и гены некоторых MFS-переносчиков [47,48]. Так ген *PDR5* содержит в промоторной области целых три PDRE последовательности и уровень его экспрессии сильно зависит от активности Pdr1/Pdr3 белков [49]. Однако молекулярные механизмы, приводящие к активации самих этих транскрипционных факторов, а также факторы, модулирующие их активность, до конца не ясны.

В частности, известно что ряд белков теплового шока семейства Hsp70 могут взаимодействовать с Pdr1/Pdr3 транскрипционными факторами. Так, было показано, что Ssz1p в комплексе с Zuo1p способен активировать транскрипционный фактор Pdr1p и, как следствие, стимулировать систему множественной лекарственной устойчивости [50]. Другой белок Hsp70 - Ssa1p (и его гомолог Ssa2p) подавляет работу Pdr3p, но не взаимодействует с Pdr1p [51].

Известно, что инкубация с антимикотиками или другими ксенобиотиками - субстратами ABC-переносчиков приводит к активации Pdr1/Pdr3 транскрипционных факторов и, как следствие, индуцирует экспрессию соответствующих генов переносчиков в дрожжевых [52–55] и

животных клетках [56]. Так, добавление к клеткам крысиной печени субстрата МЛУ доксорубина стимулирует экспрессию гена Р-гликопротеина [56]. Субстрат дрожжевых АВС-переносчиков (Pdr5p и Tro1p) 2-метил-4-хлорфеноксиацетат также индуцирует экспрессию соответствующих генов [52]. Индукция генов АВС-транспортеров *PDR5* и *YOR1* наблюдается в ответ на попадание в клетку аторвастатина [55]. Ингибирование пути биосинтеза эргостерина азольными антимикотиками — субстратами АВС-переносчиков приводит к активации транскрипционного фактора Urc2Ap, который, в свою очередь, способен связываться с промоторными PDRE-последовательностями генов АВС-переносчиков и транскрипционного фактора *PDR1* в клетках дрожжей *S. glabrata* [57]. Наиболее парадоксальным примером субстрата, запускающего синтез АВС-транспортеров, является ингибитор белкового синтеза циклогексимид D [58]. В низких концентрациях циклогексимид D стимулирует экспрессию *PDR5* в дрожжах, напрямую связываясь с транскрипционным фактором Pdr1p [1]. Такие соединения как итраконазол и прогестерон могут также напрямую связываться с С-концевым гидрофобным ксенобиотик-связывающим доменом Pdr1/Pdr3p и таким образом запускать экспрессию генов-мишеней Pdr1/Pdr3p [1].

Активация МЛУ в ответ на попадание в клетку ксенобиотиков столь различной химической структуры позволяет предположить наличие в клетке дополнительной системы их детекции. Кроме того, есть указания, что в некоторых случаях активация генов неспецифических АВС-переносчиков происходит независимо от Pdr1p и Pdr3p. Так, в одной из работ на основе специально разработанной системы скрининга был определен набор генов продукты которых, могут быть вовлечены в дополнительные пути активации системы МЛУ и/или взаимодействуют с транскрипционными факторами Pdr1/3 [55]. В данной работе делеция генов *ADA2*, *DEP1*, *ERG3*, *SLX5*, *MDM39*, *NGG1*, *SPT8* приводила к увеличению чувствительности клеток хотя бы к одному из ксенобиотиков, являющихся субстратами генов АВС-

переносчиков (аторвастатин, олигомицин, циклогексимид, флуконазол, кетоконазол). Кроме того, делеции генов *DEP1*, *ERG3*, *SPT8* и *HSP82* уменьшали общее количество переносчика Pdr5p в клетке. Интересно, что в ряде случаев делеции генов регулировали активность плеiotропных МЛУ переносчиков независимо от *PDR1* и *PDR3*. Так, например, гены *DEP1*, *SLX5* и *SPT8* вызывали чувствительность хотя бы к одному из ксенобиотиков, упомянутых выше, в мутантах с одновременной делецией генов *PDR1* и *PDR3* [55].

В некоторых видах дрожжей обнаружен дополнительный механизм активации МЛУ-переносчиков, связанный с работой митохондрий [59–61]. Известно, что в *S. cerevisiae* потеря митохондриальной ДНК (*Rho0* клетки) или делеции в ядерной ДНК, влияющая на функционирование митохондрий (делеция *FZO1* и т.п.), активируют неспецифическую лекарственную устойчивость [62–64]. В данном случае активация МЛУ происходит за счет транскрипционного фактора Pdr3p и белков Rtg1p, Rtg2p — компонентов ретроградного сигнального каскада от митохондрий к ядру, в то время как Pdr1p не играет существенной роли [62]. При этом сигнал о дисфункции митохондрий частично может быть блокирован делецией гена *LGE1* [65]. Lge1p — белок, участвующий в убиквитинилировании гистона H2B, хотя данная его функция, по всей видимости, не связана с регуляцией МЛУ [65,66]. Еще одним возможным фактором, принимающим участие в регуляции МЛУ в ответ на нарушение работы митохондрий является митохондриальная фосфатидилсерин-декарбоксилаза Psd1p. Делеция гена *PSD1* препятствует активации МЛУ в *Rho0* клетках, в то время как его сверхэкспрессия приводит к активации МЛУ за счет работы Pdr3p в клетках с митохондриальной ДНК дикого типа [67]. Наличие системы регуляции, активирующей ABC-переносчики с широкой субстратной специфичностью в ответ на потерю мтДНК, по всей видимости, связано с тем, что клетка ошибочно расценивает нарушение функции митохондрий как появление в

цитоплазме низкомолекулярного ингибитора митохондриальных ферментов и пытается защититься, стараясь выбросить этот ингибитор из клеток.

Таким образом, с одной стороны, дисфункция митохондрий способна запускать механизм множественной лекарственной устойчивости за счет активации ретроградной сигнализации. С другой стороны, митохондриальная дисфункция может приводить к снижению эффективности клеточной энергетики — в отсутствие окислительного фосфорилирования дрожжи вынуждены существовать исключительно за счет гликолиза. Поскольку АВС-транспортеры расходуют АТФ в ходе своей работы, то недостаток энергии, вызванный ингибированием функций митохондрий, может препятствовать работе переносчиков и тем самым способствовать накоплению ксенобиотиков в клетке. Было показано, что в условиях дефицита энергии, клетки накапливают в себе большее количество субстрата АВС-транспортеров [24]. В этом случае, можно предположить, что разобщение митохондриального и цитоплазматического пула адениновых нуклеотидов может также привести к падению активности АВС-переносчиков. Известно, что в дрожжах основным белком, осуществляющим обмен адениновых нуклеотидов между митохондрией и цитоплазмой является АТФ/АДР-антипортер Pet9 (Aac2) [68]. В нашей работе мы исследовали возможность активации неспецифических АВС-переносчиков в условиях подавления АТФ/АДР обмена за счет репрессии белка Pet9 (Aac2).

Исходя из вышеописанных данных, попадание ксенобиотика в клетку, скорее всего, приведет к активации работы неспецифических АВС-переносчиков, обеспечивающих механизм множественной лекарственной устойчивости по одному из путей, представленных на рисунке 4.

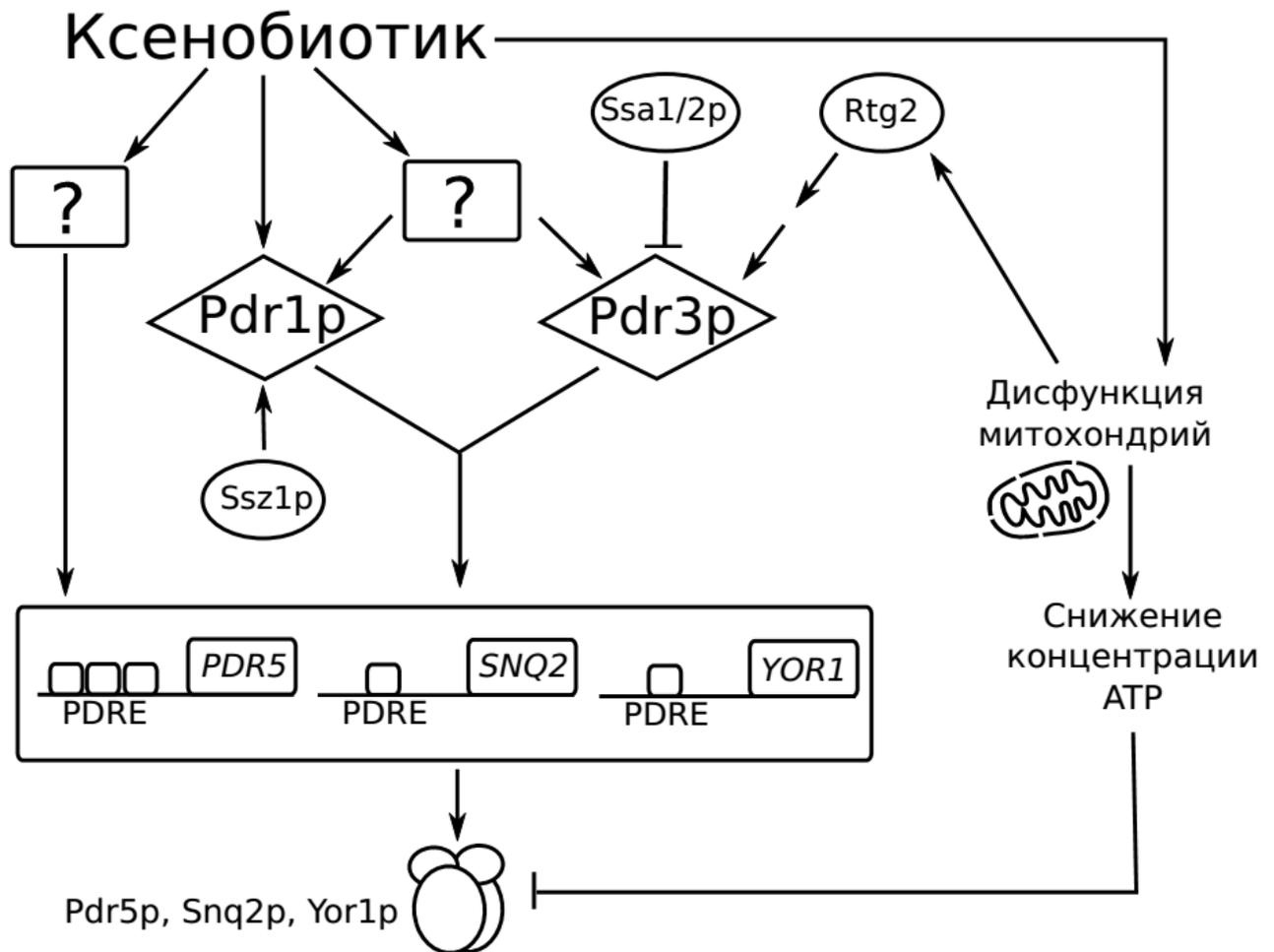


Рисунок 4. Схема возможных путей регуляции экспрессии генов основных ABC-транспортеров в клетке.

В то же самое время, митохондрия может выступать как в роли индуктора, так и в роли ингибитора множественной лекарственной устойчивости в клетке (Рисунок 4). Это позволяет предположить, что определенное воздействие на митохондрию может снизить уровень активации МЛУ и, таким образом, увеличить эффективность действия других ксенобиотиков. Более того, возможно, что митохондриально-направленные соединения могут избегать связывания с транскрипционными факторами Pdr1/Pdr3 либо другими активаторами МЛУ. Так, W. Chang с коллегами в своей работе использовали конъюгаты с положительно заряженным липофильным катионом трифенилфосфонием (TRP) для адресной доставки ряда токсичных веществ в митохондрию. Это позволило снизить уровень активации МЛУ в клетках *C.albicans* и минимальную ингибирующую

концентрацию исследуемых токсинов [69]. Однако в процитированной работе авторы оценивали выживание клеток исключительно с помощью теста МТТ, который имеет свои ограничения. Так, например, изменение скорости восстановления тетразолиевого красителя МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) до формазана может быть следствием не только гибели клеток, но и нарушением работы митохондрий. Поэтому, вопрос об эффективности митохондриально-направленных соединений как перспективных антигрибковых препаратов остается открытым.

4. Липофильные катионы как субстраты и возможные активаторы МЛУ

Электрохимический потенциал облегчает прохождение через цитоплазматическую мембрану и внутреннюю митохондриальную мембрану липофильных положительно заряженных молекул [70]. Липофильные катионы, такие как алкилтрифенилфосфонии (C_nTPP) и родамины, ковалентно соединенные с другими химическими соединениями, могут быть использованы для адресной доставки веществ в митохондрию (Рисунок 5).

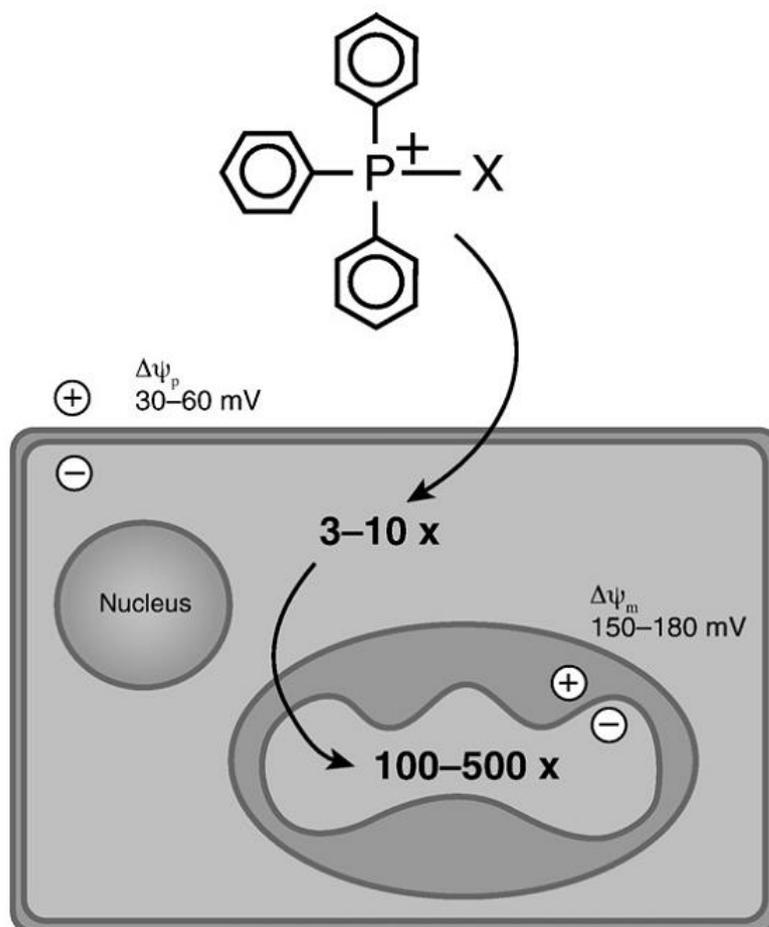


Рисунок 5. Накопление в клетке и митохондриях положительно заряженных катионов на основе трифенилфосфония приводит к тому, что концентрация липофильных катионов в митохондриях интактной клетки значительно превышает их концентрацию в среде (по [71]).

Так, трифенилфосфоний (TPP) используют для доставки в митохондрию флуоресцентных зондов, антиоксидантов и фармакофоров [72,73]. Преимуществами молекул на основе TPP являются небольшие размеры молекул, стабильность TPP -фрагмента внутри клетки, возможность комбинации гидрофильных и липофильных свойств соединения, а также относительная легкость синтеза и очистки [74]. Кроме того, подобные соединения не поглощают свет и не флуоресцируют в видимом и ближнем инфракрасном диапазоне спектра [74]. Соединения на основе родамина, напротив, чаще используются в качестве флуоресцентных потенциал-зависимых митохондриальных красителей [75–77].

Накопление положительно заряженных липофильных катионов в митохондриальном матриксе может менять значение потенциала внутренней мембраны и, таким образом, влиять на функциональную способность митохондрии. Более того, было показано, что родамины способны ингибировать митохондриальную АТФ-азу и препятствовать дыханию митохондрий [76,78]. Додецилтрифенилфосфоний ($C_{12}TPP$) также может выступать в качестве разобщителя митохондриальной дыхательной цепи, который ко-транспортируется в матрикс вместе со свободными жирными кислотами (Рисунок 6) [79]. Разобщающая активность $C_{12}TPP$ позволяет использовать это вещество в качестве средства против ожирения в модельных экспериментах на мышах [80].

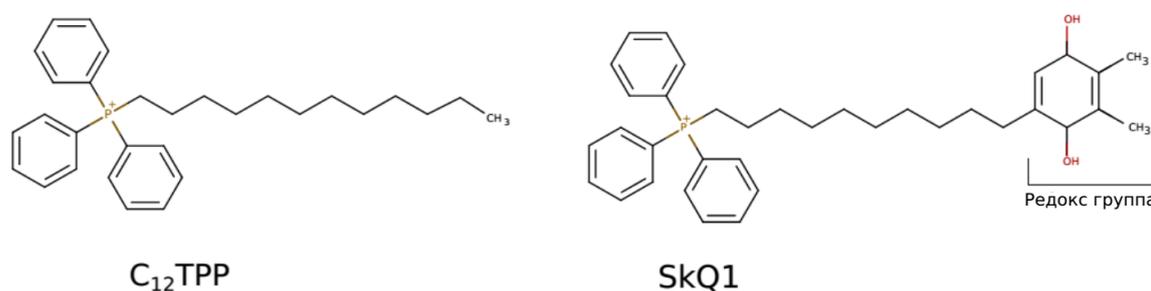


Рисунок 6. Химическая структура додecilтрифенилфосфоний ($C_{12}TPP$, слева) и пластохинонилдecilтрифенилфосфоний (SkQ1, справа).

Присоединение к TPP соединений на основе убихинона способствует эффективному проникновению данных веществ в митохондрию, где они препятствуют перекисному окислению липидов [72]. Одним из таких соединений является пластохинонилдecilтрифенилфосфоний или SkQ1 (Рисунок 6). Липофильный катион SkQ1 способен вступать в окислительно-восстановительные реакции и предотвращать образование супероксида в процессе работы митохондриальной дыхательной цепи [81,82]. Было показано, что низкие концентрации SkQ1 усиливают антиоксидантную способность митохондрий в клетке [81,83].

Липофильные катионы являются субстратами МЛУ-переносчиков [24,84,85]. Более того, липофильные катионы, включая $C_{12}TPP$ могут

конкурировать с другими субстратами МЛУ-переносчиков и таким образом ингибировать активность этих МЛУ-транспортеров [70,86,87]. Так, инкубация клеток *S. cerevisiae* с C_{12} ТРР увеличивала цитостатические эффекты циклогексимида и клотримазола — субстратов АВС-переносчика Pdr5p [87].

Однако, могут ли подобные митохондриально-направленные соединения, подобно остальным субстратам МЛУ-переносчиков, активировать экспрессию АВС-транспортеров? С одной стороны, накопление липофильных катионов в митохондрии может препятствовать их возможному связыванию с Pdr1p/Pdr3p транскрипционными факторами либо другими цитоплазматическими сенсорами ксенобиотиков и, следовательно, препятствовать активации МЛУ. С другой стороны, если в клетке связывание липофильных катионов с транскрипционными факторами конкурирует поглощением этих катионов митохондриями, то высокая аффинность Pdr1p/Pdr3p может способствовать активации МЛУ даже в условиях высокоэнергизированных митохондрий. Более того, накопление в мембране митохондрий таких разобщителей, как C_{12} ТРР могло бы ингибировать митохондриальные ферменты [88] или стимулировать накопление активных форм кислорода (АФК) [89]. Дисфункция митохондрий, в свою очередь, может запускать механизм активации МЛУ-переносчиков за счет ретроградного сигнального пути.

Кроме того, окислительный стресс, вызванный дисфункцией митохондрий мог бы запускать в клетке дополнительные сигнальные каскады, приводящие к активации МЛУ. Так, например, увеличение в цитоплазме концентрации перекиси водорода, продуцируемой митохондриями, может запускать еще один сигнальный путь [90]. Ключевым белком этого каскада — естественным клеточным сенсором перекиси водорода является транскрипционный фактор Yap1p [90,91]. Основными мишенями Yap1p являются гены антиоксидантных белков [92]. Возможную

роль Yap1p в регуляции генов МЛУ-переносчиков мы рассмотрим подробно в следующем разделе.

Таким образом, возможность активации системы МЛУ в дрожжевых клетках под действием липофильных катионов до сих пор не была показана. Более того, даже в случае существования подобной активации можно предположить несколько возможных путей индукции МЛУ липофильными катионами в клетке (Рисунок 7).

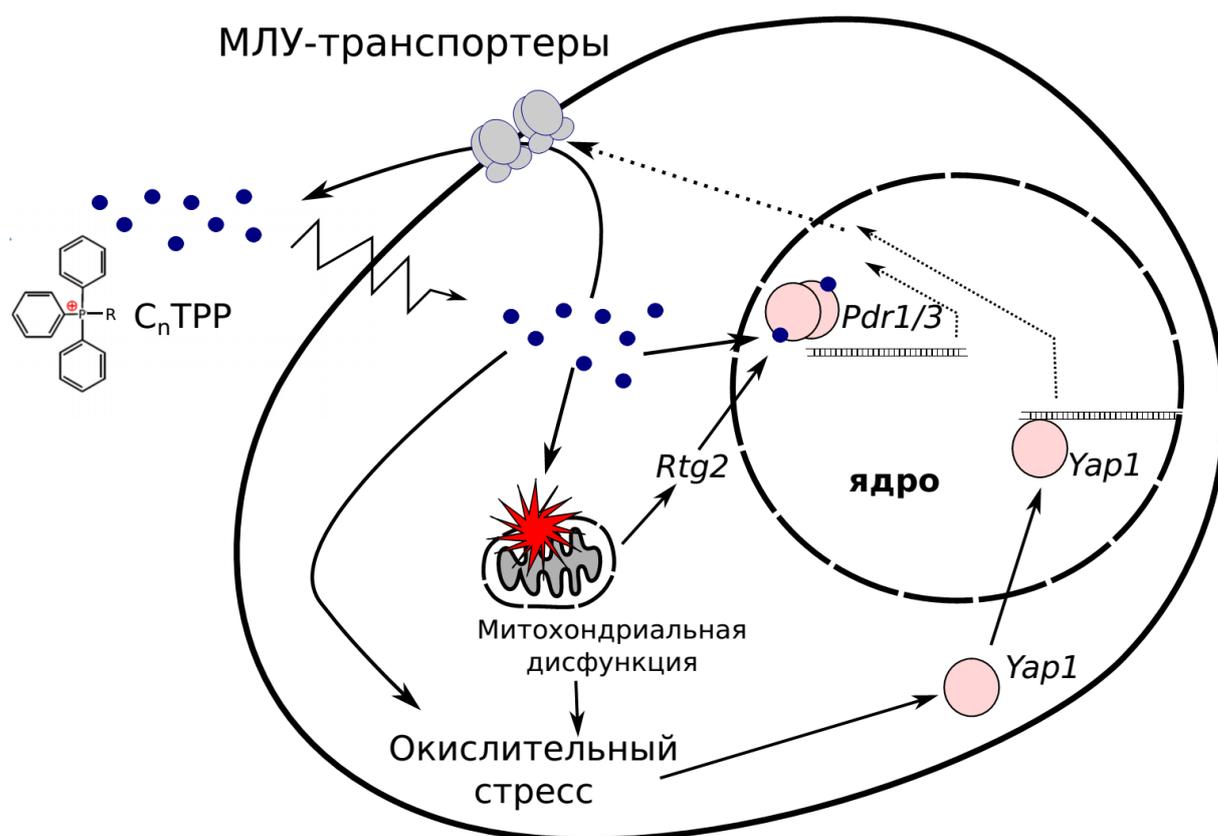


Рисунок 7. Возможные пути активации МЛУ-транспортеров под действием липофильных катионов.

5. Редокс-регуляция лекарственной устойчивости

Нелетальные слабые стрессы стимулируют последующую устойчивость клеток дрожжей как к этим же стрессам, так и к другим стрессовым условиям [93–95]. Данный эффект является результатом программируемого ответа клетки на неблагоприятные условия окружающей

среды [96,97]. Кроме того, шапероны и антиоксидантные белки могут неспецифически увеличивать выживаемость клеток при стрессах различной природы. Во многих случаях первичный стресс может продуцировать вторичный окислительный стресс за счет увеличения скорости генерации перекиси водорода или нарушения функций антиоксидантных ферментов. Так, например, высокая концентрация этанола, тепловой шок или генотоксический стресс увеличивают в клетке уровень АФК [98–102]. Окислительный стресс, в свою очередь, играет двоякую роль в адапционном ответе клетки. С одной стороны, АФК могут окислять ДНК, белки и липиды и тем самым изменять их свойства и функции [103,104]. В то же время, окислительный стресс может запускать генерализованный адапционный ответ и, тем самым, усиливать приспособленность к стрессорным условиям [90]. Преинкубация дрожжевых клеток с прооксидантами увеличивает устойчивость к NaCl [105], этанолу [90,106], генотоксическому стрессу [107]. Более того, в некоторых случаях было показано, что антиоксиданты могут препятствовать активации стрессового ответа [100].

Добавление к дрожжевым клеткам антимикотиков в низких концентрациях также увеличивает адаптацию за счет активации генов ABC-транспортеров [52,108]. В то же время, некоторые ксенобиотики, такие как азольные антимикотики или амфотерицин В могут вызывать окислительный стресс [109–114]. Однако роль вторичного окислительного стресса в регуляции индукции устойчивости к антимикотикам пока остается неясной. С одной стороны, ABC-транспортеры с широкой субстратной специфичностью отсутствуют в списке генов, регулируемых транскрипционным фактором Yap1p, чувствительным к перекиси водорода [92,115]. Полногеномный анализ с помощью микрочипов [96] и Ribo-seq [116] клеток *S.cerevisiae* после инкубации с перекисью водорода не выявили увеличения относительного количества мРНК основных ABC-переносчиков системы МЛУ. С другой стороны, существуют указания на некоторое

пересечение между сигнальными путями, регулируемыми клеточный ответ на пероксид водорода и множественной лекарственной устойчивостью. Во-первых, сверхэкспрессия *YAP1* обеспечивает *PDR1*-зависимую устойчивость к диазаборину [117]. Во-вторых, *Yap1p* увеличивает экспрессию *PDR5* и *SNQ2* в условиях теплового шока [118]. Наконец, *Yap1p* может обеспечивать устойчивость к антимикотикам с помощью увеличения количества МЛУ MFS-транспортера *FLR1* в *S.cerevisiae* [119] и *C.glabrata* [120].

Наличие редокс-компоненты регуляции переносчиков МЛУ наталкивает на идею увеличить чувствительность устойчивых к антимикотикам патогенных штаммов дрожжей путем одновременного добавления вместе с антимикотиками антиоксидантов [121]. Однако, в этом случае, важно полностью понимать взаимодействие редокс-активных соединений с системами регуляции МЛУ-переносчиков. В нашей работе мы исследовали возможные пути редокс-регуляции МЛУ в оппортунистическом патогене человека *C. glabrata*.

Данный вид дрожжей может вызывать инвазивные заболевания человека и часто развивает множественную лекарственную устойчивость при длительной противогрибковой терапии [122,123]. *C. glabrata* филогенетически ближе к виду *S. cerevisiae*, чем к другим патогенным видам рода *Candida* (например, *C. albicans*) [124]. Однако, несмотря на это, и на то, что вид *S. cerevisiae* считается стандартным модельным объектом для исследования МЛУ и действия азольных антимикотиков [125], между *C. glabrata* и *S. cerevisiae* существуют некоторые различия в механизмах МЛУ и реакциях на стресс. Так, например, устойчивость к экзогенной перекиси водорода у *C. glabrata* значительно выше [126]. Кроме того, клетки *C. glabrata* значительно быстрее активируют экспрессию генов, в ответ на окислительный стресс [127].

В нашей работе мы исследовали, будет ли антиоксидант альфа-токоферол препятствовать активации МЛУ в клетках дрожжей *C. glabrata*, вызванной липофильным катионом $C_{12}TPP$. Кроме этого мы сравнили

активирующие эффекты додецилтрифенилфосфония ($C_{12}TPP$) и пластохинонил-децилтрифенилфосфония (SkQ1), предполагая, что наличие редокс-активной группы пластохинона мешает клеткам детектировать липофильные катионы и активировать переносчики МЛУ.

6. Связь множественной лекарственной устойчивости с митохондриальной динамикой

Кроме Rtg- и Yarp-зависимой активации МЛУ при нарушении функции митохондрий в литературе существует еще несколько указаний на другие возможные пути регуляции митохондриями системы множественной лекарственной устойчивости. Так независимо в двух лабораториях генетические скрининги привели к обнаружению взаимосвязи между геном *FZO1* и системой множественной лекарственной устойчивости, включающей в себя транскрипционные факторы Pdr1/Pdr3p и их мишени [62,128]. Белок Fzo1p - GTP-аза, участвующая в механизме слияния митохондрий. В этих работах было показано, что нарушение гена *FZO1* транспозонной вставкой приводит к активации МЛУ и, наоборот, активация Pdr1/Pdr3p компенсирует фенотипы, вызванные потерей *FZO1*. Это указывает на то, что продукты генов *FZO1* и *PDR1/PDR3* могут быть вовлечены в один общий сигнальный путь. Эти два наблюдения позволяют сделать предположение о причинах генетического взаимодействия между *PDR* генами и генами, отвечающими за деление и слияние митохондрий.

Кроме того, было показано, что репликация митохондриальной ДНК в клетках высших эукариот может происходить в участках контакта мембран митохондрий и эндоплазматического ретикулума, которые обогащены холестерином [129]. Однако у грибов, в отличие от животных, основным компонентом большинства клеточных мембран является эргостерин [130,131]. Как обсуждалось выше, нарушение функции митохондрий приводит к активации *PDR1/PDR3* промоторов, под контролем которых находятся гены неспецифических ABC-переносчиков – экспортеров

ксенобиотиков. Мы предполагаем, что среди таких транспортеров могут оказаться не только АВС-переносчики, обеспечивающие МЛУ, но и некоторые АВС-переносчики импортеры, отвечающие за захват эргостерина из среды в условиях, когда биосинтез эргостерина нарушен (*PDR11*, *AUS1*). Активация таких переносчиков могла бы увеличить количество эргостерина в мембранах клетки, в том числе в митохондриальных мембранах. По данным Westermann et al., анализирувавших коллекции мутантных штаммов дрожжей на предмет влияния тех или иных генов на структуру митохондрий, нарушение структуры митохондриальной сети часто связаны с нарушением биосинтеза эргостерина [132]. Следовательно, возобновление притока эргостерина в клетку может в ряду случаев, например в условиях делеции *FZO1*, частично компенсировать фенотип, вызванный делецией, – предотвратить потерю мтДНК. В нашей работе мы попытались найти новые взаимодействия между генами митохондриальной динамики и МЛУ генами.

Подводя итог обзору литературы можно заключить, что в клетках грибов функционирует множество способов регуляции АВС-переносчиков с широкой субстратной специфичностью. Представляет большой практический интерес возможность доставки в клетку низкомолекулярных соединений, которые не будут запускать эти сигнальные пути. Это важно для повышения эффективности антимикробных или противоопухолевых соединений, а также для возможности адекватной интерпретации экспериментальных работ, в которых к клеткам добавляют флуоресцентные зонды или ингибиторы цитоплазматических белков. Однако на данный момент времени неясен ни полный список этих путей регуляции, ни их взаимодействие между собой. В своей работе мы исследовали взаимодействие особого класса низкомолекулярных соединений — липофильных катионов — с системой регуляции АВС-переносчиков на примере двух видов грибов: (1) модельного объекта дрожжей *S.cerevisiae* и (2) одного из клинически значимых оппортунистических патогенов человека — *C.glabrata*. В литературе

предполагается, что липофильные катионы могут накапливаться в митохондриях и потому неэффективно откачиваться из клетки, тем самым они могут быть использованы для создания антигрибковых соединений к которым клеткам будет сложно выработать лекарственную резистентность [69]. Кроме того можно предположить, что липофильные катионы избегают детекции цитоплазматическими сенсорами (транскрипционными факторами Pdr1/Pdr3). Однако, с другой стороны, в высокой концентрации липофильные катионы могут вызывать нарушение работы митохондрий [88], запуская ретроградный сигнальный каскад, регулирующий экспрессию генов ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью. В нашей работе мы попытались оценить вклад нарушения работы митохондрий, подвергнутых воздействию липофильных катионов, в регуляцию работы системы МЛУ дрожжей.

Материалы и методы

1. Генотипы штаммов дрожжей, используемых в работе

В работе использовали штаммы пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, полученных на основе *W303* и *BY4741* и условно патогенных штаммов *C. glabrata*, их генотипы приведены в таблице 2 и таблице 3 соответственно. Работа со штаммами *C. glabrata* проводилась на базе Токийского технологического университета (Япония).

Таблица 2

Генотипы штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, использованных в работе

Название	Генотип	Источник (комментарий)
<i>W303-1A</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3,112, GAL, psi+</i>	Severin and Hyman, 2002
<i>W303-1B</i>	<i>MATalpha ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3,112, GAL, psi+</i>	Severin and Hyman, 2002
<i>Δpdr1^a</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 pdr1Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>W303-1A</i>
<i>Δpdr3^a</i>	<i>MATalpha ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 pdr3Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>W303-1B</i>
<i>Δpdr1Δpdr3^b</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 pdr1Δ::KanMX4 pdr3Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штаммов <i>Δpdr1</i> ,

		<i>Δpr3</i>
<i>Δrtg1</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 rtg1Δ::KanMX4</i>	Зырина А.Н. и др. (Zyrina et al. [90])
<i>Δrtg2</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 rtg2Δ::KanMX4</i>	Зырина А.Н. и др. (Zyrina et al. [90])
<i>Δrtg3</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 rtg3Δ::KanMX4</i>	Зырина А.Н. и др. (Zyrina et al. [90])
<i>Δyap1</i>	<i>MATalpha ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 yap1Δ::KanMX4</i>	Зырина А.Н. и др. (Zyrina et al. [90])
<i>Δrtg2Δyap1</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 rtg2Δ::KanMX4 yap1Δ::KanMX4</i>	Зырина А.Н. и др. (Zyrina et al. [90])
<i>BY4147</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	коллекция штаммов Invitrogen [133]
<i>Δngg1</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ngg1Δ::KanMX4</i>	делеционная коллекция штаммов Invitrogen [133]
<i>Δstg8</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 stg8Δ::KanMX4</i>	делеционная коллекция штаммов Invitrogen [133]

<i>Δmdm39</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mdm39Δ::KanMX4</i>	делеционная коллекция штаммов Invitrogen [133]
<i>Δada2</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ada2Δ::KanMX4</i>	делеционная коллекция штаммов Invitrogen [133]
<i>Δslx5</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 slx5Δ::KanMX4</i>	делеционная коллекция штаммов Invitrogen [133]
<i>Δssz1</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ssz1Δ::KanMX4</i>	делеционная коллекция штаммов Invitrogen [133]
<i>Δdep1</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dep1Δ::KanMX4</i>	делеционная коллекция штаммов Invitrogen [133]
<i>Δerg3</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg3Δ::KanMX4</i>	делеционная коллекция штаммов Invitrogen [133]
<i>Δhsp82</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 slx5Δ::KanMX4</i>	делеционная коллекция штаммов Invitrogen [133]
<i>Pdr5-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PDR5-GFP::HIS3</i>	Huh W-К и др. (Huh et al. [133])
<i>Snq2-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SNQ2-GFP::HIS3</i>	Huh W-К и др. (Huh et al. [133])

<i>Snq2-GFP</i> <i>Δpdr1Δpdr3^b</i>	<i>MATa ade2-101 his3 leu2</i> <i>met15Δ0 ura3 trp1-1 can1-100</i> <i>SNQ2-GFP::HIS3</i> <i>pdr1Δ::KanMX4 pdr3Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штаммов <i>SNQ2-GFP</i> , <i>Δpdr1Δpdr3</i>
<i>Snq2-GFP Δpdr1^b</i>	<i>MATa ade2-101 his3 leu2</i> <i>met15Δ0 ura3 trp1-1 can1-100</i> <i>SNQ2-GFP::HIS3</i> <i>pdr1Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штаммов <i>SNQ2-GFP</i> , <i>Δpdr1Δpdr3</i>
<i>Snq2-GFP Δpdr3^b</i>	<i>MATa ade2-101 his3 leu2</i> <i>met15Δ0 ura3 trp1-1 can1-100</i> <i>SNQ2-GFP::HIS3</i> <i>pdr3Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штаммов <i>SNQ2-GFP</i> , <i>Δpdr1Δpdr3</i>
<i>P_{GAL}-SNQ2</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1</i> <i>ura3-52 can1-100 leu2-3</i> <i>PGAL-SNQ2::HIS3</i>	Кнорре Д.А. и др. (Knorre et al. [87])
<i>P_{GAL}-PDR5</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1</i> <i>ura3-52 can1-100 leu2-3</i> <i>PGAL-PDR5::HIS3</i>	Кнорре Д.А. и др. (Knorre et al. [87])
<i>P_{GAL}-YOR1</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1</i> <i>ura3-52 can1-100 leu2-3</i> <i>PGAL-YOR1::HIS3</i>	Кнорре Д.А. и др. (Knorre et al. [87])
<i>Pdr5-GFP</i> <i>Δpdr1Δpdr3^b</i>	<i>MATa ade2-101 his3 leu2</i> <i>met15Δ0 ura3 trp1-1 can1-100</i> <i>PDR5-GFP::HIS3</i> <i>pdr1Δ::KanMX4 pdr3Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штаммов <i>Pdr5-GFP</i> , <i>Δpdr1Δpdr3</i>

<i>Pdr5-GFP Δpdr1^a</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PDR5-GFP::HIS3 pdr1Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>Pdr5-GFP</i>
<i>Pdr5-GFP Δpdr3^a</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PDR5-GFP::HIS3 pdr3Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>Pdr5-GFP</i>
<i>Pdr5-GFP Δrtg2^b</i>	<i>MATa ade2-101 his3 leu2 met15Δ0 ura3 trp1-1 can1-100 PDR5-GFP::HIS3 rtg2Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штаммов <i>Pdr5-GFP</i> , <i>Δrtg2</i>
<i>Pdr5-GFP Δyap1^b</i>	<i>MATa ade2-101 his3 leu2 met15Δ0 ura3 trp1-1 can1-100 PDR5-GFP::HIS3 yap1Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штаммов <i>Pdr5-GFP</i> , <i>Δyap1</i>
<i>Pdr5-GFP Δrtg2Δyap1^b</i>	<i>MATa ade2-101 his3 leu2 met15Δ0 ura3 trp1-1 can1-100 PDR5-GFP::HIS3 rtg2Δ::KanMX4 yap1Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штаммов <i>Pdr5-GFP</i> , <i>Δrtg2</i> , <i>Δyap1</i>
<i>Yor1-GFP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YOR1-GFP::HIS3</i>	Нuh W-К и др. (Нuh et al. [133])
<i>P_{GAL}-PET9^a</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 P_{GAL}- PET9::HIS3</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>W303-1A</i>
<i>P_{GAL}-PET9 Pdr5-GFP^a</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 P_{GAL}- PET9::TRP1 PDR5-GFP::HIS3</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>P_{GAL}-PET9</i>

<i>P_{GAL}-PET9-GFP^a</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 PET9- GFP::KanMX4 PGAL-PET9::HIS3</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>P_{GAL}-PET9</i>
<i>Δdnm1</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3Δ::LEU2 dnm1Δ::KanMX4</i>	Караваяева Ю.Е. и др. (Karavaeva I.E. et al. [134])
<i>Rho0^c</i>	<i>MATalpha ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3Δ [rho0]</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>W303-1B</i>
<i>URA3^a</i>	<i>MATalpha ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52::URA3 can1-100 leu2-3,112</i>	Получен ранее в нашей лаборатории на основе штамма <i>W303-1B</i>
<i>LEU2^a</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52::URA3 can1-100 leu2-3,112::LEU2</i>	Получен ранее в нашей лаборатории на основе штамма <i>W303-1A</i>
<i>BY4147</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Нух W-К и др. (Нух et al. [133])
<i>Δerg2 Pdr5-GFP^a</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg2Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>Δerg2</i> из делеционной коллекции штаммов Invitrogen [133]

<i>Δerg3 Pdr5-GFP^a</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg3Δ::KanMX4</i>	Получен Т. Широковских основе штамма <i>Δerg3</i> из делеционной коллекции штаммов Invitrogen [133]
<i>Δerg4 Pdr5-GFP^a</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg4Δ::KanMX4</i>	Получен Т. Широковских основе штамма <i>Δerg4</i> из делеционной коллекции штаммов Invitrogen [133]
<i>Δerg5 Pdr5-GFP^a</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg5Δ::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>Δerg5</i> из делеционной коллекции штаммов Invitrogen [133]
<i>Δerg6 Pdr5-GFP^a</i>	<i>MATalpha his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 erg3Δ::KanMX4</i>	Получен Т. Широковских основе штамма <i>Δerg6</i> из делеционной коллекции штаммов Invitrogen [133]

<i>P_{GAL}-ERG9 Pdr5-GFP^a</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PDR5-GFP::HIS3 PGAL-ERG9::KanMX4</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>Pdr5-GFP</i>
<i>Δlam1Δlam2Δlam3 Δlam4 Pdr5-GFP</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3 lam3Δ::KanMX4 lam2Δ::TRP1 lam1Δ::NAT lam4Δ::loxP PDR5-GFP::HIS3</i>	Соколов С.С. и др. (Sokolov S.S. et al. [135])
<i>Idh1-GFP^a</i>	<i>MATa ade2-101 his3-11 trp1-1 ura3-52 can1-100 leu2-3Δ IDH1-GFP::TRP1</i>	Получен в ходе работы на основе штамма <i>W303-1A</i>

a - штамм получен с помощью трансформации ПЦР-продуктом

b - штамм получен с помощью скрещивания и растаскивания тетрад

c - штамм получен индукцией потери мтДНК путем инкубации с бромистым этидием.

Таблица 3

Генотипы штаммов дрожжей *S.glabrata*, использованных в работе

Название	Генотип	Источник (комментарий)
<i>CBS138</i>	<i>wild type, MATa</i>	(Ueno et al. [136])
<i>Δcdr1</i>	<i>MATa cdr1Δ (CAGL0M01760g)::CgHIS3</i>	Okamoto and Chibana
<i>Δcdr2</i>	<i>MATa cdr2Δ(CAGL0F02717g)::CgHIS3</i>	Okamoto and Chibana
<i>Δsnq2</i>	<i>MATa snq2Δ(CAGL0I04862g)::CgHIS3</i>	Okamoto and Chibana
<i>Δpdr1</i>	<i>MATa pdr1Δ(CAGL0A00451g)::CgHIS3</i>	Okamoto and Chibana

2. Праймеры и плазмиды

В таблице 4 приведены последовательности праймеров, которые были использованы для получения мутантных штаммов дрожжей и проверки их генотипа.

Таблица 4

Последовательности праймеров, используемых в работе

Название	Последовательность, 5'-3'	Назначение праймеров
PDR1-F	agccctgatttacattctca	Для переноса делеции гена <i>PDR1</i> из штамма делеционной коллекции Invitrogen [133], содержащего вместо гена канамициновую кассету (<i>KanMX4</i>).
PDR1-R	cccataagaatacacctca	
PDR3-F	aagccattatttccacgaca	Для переноса делеции гена <i>PDR3</i> из штамма делеционной коллекции Invitrogen [133], содержащего вместо гена канамициновую кассету (<i>KanMX4</i>).
PDR3-R	gaatagctcatccaatcgat	
PDR1/PDR3/ YAP1-F_test	ctcgacatcatctgccca	Для проверки генотипа полученного штамма по наличию ПЦР продукта
PDR1-R_test	gttttacagacagcattagaca	

PDR3-R_test	gtcgcagattctcaaaactaa	
YAP1-R-test	ttctatattgacattgaagg	
PDR5-GFP-F	acggtaaactctccaagaaa	Для получения штамма, содержащего Pdr5p, слитого с GFP белком. ПЦР с выделенной ДНК штамма дрожжей, уже содержащего Pdr5-GFP и трансформация целевого штамма полученным ПЦР-фрагментом.
PDR5-GFP-R	acgcacctatatgtagtgat	
PDR5-GFP-F_test	ttgctaacgtagacgtcaaa	Для проверки генотипа штамма, содержащего <i>PDR5-GFP</i> по длине ПЦР продукта
PDR5-GFP-R_test	taaccgtaaggcacagttaa	
RTG2-F_test	gagctcaataagtgatccgaa	Для проверки генотипа штамма, содержащего делецию <i>RTG2</i> по длине ПЦР продукта
RTG2-R_test	gacagtcacatcatgccct	
PET9-F	ttaatttttcacgacaaccsact caaaaaagtatatattcactggt agttatacgGAATTCGA GCTCGTTTAAAC	Постановка гена <i>PET9</i> под галактозный промотор. ПЦР с плазмиды <i>pFAба-HISMХ6-PGAL1</i> и трансформация клеток полученным ПЦР-фрагментом.
PET9-R	ccttctttggagctggggctgg aggtaatggggttttgacttg	

	gcggttgaagaCATTTT GAGATCCGGGTTT T	
PET9-Forv	acagaagtatagacacgatt	Для проверки генотипа штамма, содержащего галактозный промотор перед геном <i>PET9</i>
GAL_prom_test	gtttaacgagctcgaattc	
PET9-GFP-F	tctcaatgtacaccaactgca aatgatcttgtttgtaagaagtt caaaCGGATCCCCGG GTTAATTAA	Получение штамма, содержащего <i>Pet9p</i> , слитый с GFP белком. ПЦР с плазмиды <i>pFABa-GFP-KanMX4</i> и трансформация клеток полученным ПЦР-фрагментом.
PET9-GFP-R	aaagaaaatgtgagaaga ttagattaagaatcaagccag attagacGAATTCGAG CTCGTTTAAAc	
ERG9-F	caataccgacttaccatcctatt tgctttgcccttttctttccact gcactttGAATTCGAG CTCGTTTAAAC	Постановка гена <i>ERG9</i> под галактозный промотор. ПЦР с плазмиды <i>pFABa-KANMX4-PGAL1</i> и трансформация клеток полученным ПЦР-фрагментом.
ERG9-R	tcaaagctgccttcacatcgcac cggatgcaatgccaatgtaat agctttccCATTTTGAG ATCCGGGTTT	
ERG9-F_test	gtgctctgactcagtacatt	Для проверки генотипа штамма, содержащего галактозный промотор перед геном <i>ERG9</i> по длине ПЦР
ERG9-R_test	cgatgggtataatgcatttc	

		продукта
Idh1-GFP-F	cttctactactgacttcacgaat gaaatcatcaacaattatctac catgCGGATCCCCGG GTTAATTAА	Получение штамма, содержащего Idh1p, слитый с GFP белком. ПЦР с плазмиды <i>pFA6a-GFP-TRP1</i> и трансформация клеток полученным ПЦР- фрагментом.
Idh1-GFP-R	gtttatatataattatagataaga atttgaacacacttaagttgcag aacGAATTCGAGCT CGTTTAAAC	

Для получения штаммов дрожжей в работе были использованы следующие плазмиды:

- 1) *pFA6a-HISMX6-PGAL1* – для амплификации продукта ПЦР, содержащего GAL-промотор и ген ауксотрофности *HISMX6* для последующей трансформации клеток и получения штаммов дрожжей, в котором ген *PET9* поставлен под индуцируемый GAL-промотор.
- 2) *pFA6a-KANMX4-PGAL1* – для амплификации продукта ПЦР, содержащего GAL-промотор и ген ауксотрофности *KANMX4* для последующей трансформации клеток и получения штаммов дрожжей, в котором ген *ERG9* поставлен под индуцируемый GAL-промотор.
- 3) *pFA6a-GFP-KanMX4* – для амплификации продукта ПЦР, содержащего ген *GFP* и ген устойчивости к генетицину для последующей трансформации клеток и получения штаммов с конститутивно экспрессирующимся *GFP*, слитым с целевым белком.
- 4) *pFA6a-GFP-TRP1* – для амплификации продукта ПЦР, содержащего ген *GFP* и ген триптофановой ауксотрофности для последующей трансформации клеток и получения штаммов с конститутивно экспрессирующимся *GFP*, слитым с целевым белком.

В таблице 5 приведены последовательности праймеров, которые были использованы для измерения относительного количества мРНК методом ПЦР в реальном времени. Праймеры для образцов, полученных из *C.glabrata* были написаны к.б.н. Р.А.Зиновкиным. Для штаммов *S.cerevisiae* были использованы праймеры, описанные в статье Ну Ф. и др. [137].

Таблица 5

Последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

Праймер	Последовательность 5'-3'	Длина продукта
ScACT1-F	GAATTGAGAGTTGCCCCAGA	137
ScACT1-R	GGCTTGGATGGAAACGTAGA	
ScPDR5-F	GTGCTCATAAATGCCCTGCT	133
ScPDR5-R	TGAACGGCCCTGTA CTCTTC	
ScSNQ2-F	TGCTGGTTGGTGGTCTGTATATTG	135
ScSNQ2-R	GTCCTTGGATTTGGTTCATTGC	
ScYOR1-F	ACTTGCCGTGGTTTGCTATCG	189
ScYOR1-R	AATCGTTCCTGACTTCGGTATGC	
CgACT1-F	GTCCTACGAATTGCCAGAT	160
CgACT1-R	CTTACGAACATCAACATCACA	
CgFLR1-F	GTGCCACTATGCTACTTCTAA	118
CgFLR1-R	TTCTCTGTATAATAGCGGTTGTC	
CgCDR1-F	GAGACTTATACGAAGCAAGAGAA	160
CgCDR1-R	ACAGAAGCATTGGAGTAGAAC	

CgCDR2-F	ATAGCGTTGTTAAGCGTATG	174
CgCDR2-R	TGGTAATGGACTCAGAATCA	
CgSNQ2-F	TGGTAATGACTTCGTTAGA	151
CgSNQ2-R	GATAGCCTTAGCGTATTCT	

3. Условия культивирования дрожжевых клеток

Дрожжи растили на питательных средах различного состава (Таблица 6) в термостатируемой качалке (на жидкой среде в стеклянных пробирках и 50 мл пластиковых пробирках типа "Falcon", перемешивание 250 rpm, температура для *S.cerevisiae* 30°C, для *C.glabrata* 37°C) или термостате на твердых агаризованных средах на чашках Петри при соответствующей температуре. Скорость роста оценивали с помощью измерения оптической плотности на спектрофотометре (длина волны 550 нм). Оптическая плотность, равная 0,1 соответствует плотности клеток $2 \cdot 10^6$ клеток/мл.

4. Микробиологические среды для культивирования

Состав сред приведен в таблице 6. В твердые среды дополнительно добавляли 2% агар. Стерилизацию проводили автоклавированием при 0,5-1 атм в течение 50 минут. Генетицин добавляли после остывания среды перед заливкой чашек.

Таблица 6

Состав сред для культивирования дрожжей

Название среды	Состав
YPD (Yeast Peptone D-Glucose)	2% бактопептон, 2% глюкоза, 1% дрожжевой экстракт (+2% агар)

YPD G418	2% бактопептон, 2% глюкоза, 1% дрожжевой экстракт, 2% агар, 250мг/л генетицин
YPDGly	2% бактопептон, 2% глицерин, 1% дрожжевой экстракт, 0,1% глюкоза, 2% агар
YPGly	2% бактопептон, 2% глицерин, 1% дрожжевой экстракт (+2% агар)
YPGal	2% бактопептон, 2% галактоза, 1% дрожжевой экстракт (+2% агар)
YPRaf	2% бактопептон, 2% раффиноза, 1% дрожжевой экстракт (+2% агар)
YPRafGal	2% бактопептон, 1% галактоза, 1% раффиноза, 1% дрожжевой экстракт (+2% агар)
YNB (Yeast Nitrogen Base) –His	0,66% YNB (без аминокислот), SCM (Synthetic Complete Drop Out Mix) с соответствующим набором аминокислот без His 1.92 г/л (Sigma), 2% глюкоза, (+2% агар)
YNB (Yeast Nitrogen Base) –His RafGal	0,66% YNB (без аминокислот), SCM (Synthetic Complete Drop Out Mix) с соответствующим набором аминокислот без His 1.92 г/л (Sigma), 1% раффиноза, 1% галактоза, (+2% агар)

КАс (Ацетат калия)	2% ацетат калия, 2% агар
--------------------	--------------------------

5. Выделение геномной ДНК из дрожжей *S. cerevisiae*

Реактивы:

1. Зимолиаза из *Arthrobacter luteus*, 7,5 мг/мл (Sigma)
2. Деионизованная вода
3. β -меркаптоэтанол (Amresco)
4. 10%-ный SDS (Amresco)
5. 9 М ацетат аммония
6. Хлороформ

Для выделения ДНК брали клетки дрожжей в жидкой среде и осаждали центрифугированием со скоростью около 2500 об/мин, удаляли супернатант. Затем осадок ресуспендировали в 200 мкл деионизованной воды и инкубировали 30-40 минут при 37 °С в присутствии смеси ферментов «Зимолиаза» (100 мкл раствора концентрации 7,5 мг/мл) и β -меркаптоэтанола (2 мкл) для образования сферопластов. Затем добавляли 100 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия (SDS) и инкубировали 10-15 мин при 60 °С, периодически встряхивая. После этого добавляли 300 мкл 9 М раствора ацетата аммония и 100 мкл хлороформа, охлаждали сперва 2-5 мин при -20 °С, а затем 30 мин при +4 °С, после чего центрифугировали на максимальных оборотах. Супернатант переносили в другую пробирку не затрагивая осадок и пересаждали ДНК.

6. Переосаждение ДНК

Реактивы:

1. Изопропанол
2. 70%-ный этанол, дважды перегнанный.
3. РНКаза А из поджелудочной железы быка, 10 мг/мл (Fermentas).

К пробам ДНК добавляли 0,7 объема изопропанола, встряхивали и оставляли на 1ч при -20°C. Далее центрифугировали при максимальных оборотах в течение 5. Супернатант аккуратно отбирали, осадок ДНК дважды промывали 200 мкл 70% этанола. Центрифугировали, отбирали супернатант, давали пробе подсохнуть и растворяли в 20 мкл деионизированной воды и обрабатывали РНКазой (добавляли РНКазу до конечной концентрации 25 мкг/мл и инкубировали при 37 °С в течение 30 минут).

7. Полимеразная цепная реакция

Реактивы:

1. 50x смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (Eurogene)
2. 50x Tersus-ДНК-полимераза (Eurogene)
3. 10x буфер для Tersus-ДНК- полимеразы (Eurogene)
4. 10x смесь прямого и обратного праймеров в концентрации 2 пкмоль/мкл
5. ДНК матрица
6. Деионизованная вода
7. Минеральное масло

Аmplификацию участка ДНК для последующей трансформации проводили в объеме 50мкл. В случае проверки правильности встраивания конструкции с помощью ПЦР в качестве матрицы использовали суммарную клеточную ДНК, для чего небольшое количество анализируемых клеток с твердой среды помещали в ПЦР-смесь с помощью бактериальной петли. Объем ПЦР смеси в этом случае составлял 20 мкл. Для предотвращения

испарения в пробирку сверху на ПЦР смесь капали 2 капли минерального масла.

Реакцию проводили на приборе фирмы «Терцик» (ДНК-технология, Россия), с условиями, приведенными в таблице 7.

Таблица 7

Протокол ПЦР

Период	Время	Температура, С°	Число циклов
Инициация	2 мин (5 мин для суммарной клеточной ДНК)	94	1
Денатурация	30 с	94	24 (32 для суммарной клеточной ДНК)
Отжиг	30 с	56	
Элонгация	2,5 мин	72	
Достраивание	10 мин	72	1

8. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез проводили в 1% агарозном геле с бромистым этидием (0,1 мг/мл) в буфере ТАЕ 1х 20-30 мин при напряженности поля 5 В/см.

9. Выделение тотальной РНК из дрожжей

Для выделения тотальной РНК из дрожжевых клеток мы использовали метод, описанный в работе Shedlovskiy и др. [138].

Реактивы:

1. жидкая YPD
2. твердая YPD
3. деионизированная вода
4. FAE (98% формамид, 10мМ EDTA)

5. Смесь фенол/хлороформ (объемом 1:1)
6. Хлороформ
7. 3М ацетат натрия (NaAc)
8. 96% этиловый спирт (EtOH)
9. 70% этиловый спирт

Клетки, выращенные ночь на твердой среде YPD, ресуспендировали в жидкой YPD до оптической плотности 0,5 (550-600 нм), добавляли ингибиторы (или растворитель) и инкубировали 1 час при 30 С° в случае *S.cerevisiae* и при 37 С° в случае *C.glabrata*. Далее клетки осаждали центрифугированием (2500g, 5 мин), удаляли супернатант, растворяли осадок в 500 мкл деионизированной воды и переносили в 1,5 мл пластиковые пробирки типа “erpendorf”. Образцы снова центрифугировали (2500g, 5 мин), удаляли супернатант, добавляли 100 мкл FAE, ресуспендировали и инкубировали 10 мин при 70 С°. Затем пробирки встряхивали и центрифугировали 2 мин при 16 000g и 4 С°. После центрифугирования половину объема супернатанта отбирали в отдельную пробирку и замораживали для долгого хранения при -20 С°. Оставшуюся часть супернатанта также переносили в свежую пробирку, добавляли 200 мкл деионизированной воды, 200 мкл смеси фенол/хлороформа, центрифугировали (3 мин, 16 000g, 4 С°) и переносили верхнюю часть супернатанта в чистую пробирку. Затем к образцам добавляли по 200 мкл хлороформа, центрифугировали (1 мин, 16 000g, 4 С°) и снова отбирали водную фазу в чистую пробирку. Добавляли к каждой пробе 23 мкл NaAc, 700 мкл 96% EtOH и оставляли на 1 час при -80 С°. Затем образцы центрифугировали (2 мин, 16 000g, 4 С°), дважды промывали 15-20 мкл 70% EtOH, подсушивали до полного испарения спирта и растворяли в 15 мкл деионизированной воды. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра GeneQuant100 (GE healthcare) или NanoDrop.

10. Обратная транскрипция

Для образцов, полученных из клеток *S.cerevisiae* мы использовали реактивы набора Super Script II Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, США):

1. Super Script II RT
2. RT mix (водный раствор рандомных гексапраймеров Renol Hex и Ologo 0.1 мкг/мкл и 10 мМ dNTP)
3. 5x First-Strand Buffer
4. 0,1 М дитиотриэтол (ДТТ)
5. тотальная РНК *S.cerevisiae*
6. деионизированная вода

В пробирку с раствором, содержащим 1,5-2 мкг РНК добавляли 4 мкл RT mix и деионизированную воду до конечного объема смеси 13 мкл. Образцы инкубировали 5 мин при 65 °С. Затем помещали в лед на 1 мин и центрифугировали при 16 000 g и 4 °С. Затем к образцам добавляли 7мкл смеси, содержащей 4 мкл 5x First-Strand Buffer, 2мкл 0,1 М ДТТ, 0,75мкл Super Script II RT и 0,25 мкл деионизированной воды. В негативный контроль добавляли ту же смесь, но без Super Script II RT. Пробирки оставляли на 10 мин при комнатной температуре, а затем 55 мин при 43 °С и 15 мин при 70 °С. Полученную кДНК (комплементарную ДНК) использовали для ПЦР в реальном времени.

Для образцов, полученных из клеток *C.glabrata* мы использовали реактивы набора ReverTra Ace® qPCR Master Mix with gDNA Remover (Toyobo):

1. 4x DN Master Mix I (с предварительно добавленным 50x gDNA Remover)
2. 5x RT Master Mix II
3. 5x RT Master Mix II no RT-control
4. деионизированная вода
5. тотальная РНК *C.glabrata*

В пробирку с раствором, содержащим 1,5-2 мкг РНК инкубировали 5 мин при 65 °С, затем перемещали в лед и добавляли 4 мкл 4x DN Master Mix I и деионизированную воду до конечного объема пробы 16 мкл. Образцы инкубировали 5 мин при 37 °С и добавляли по 4 мкл 5x RT Master Mix II в каждую пробу. В негативный контроль, вместо этого, добавляли 4 мкл 5x RT Master Mix II по RT-control. Пробы инкубировали 15 мин при 37 °С, затем 5 мин при 50 °С и 5 мин при 98 °С. Полученную кДНК разводили в 50 раз деионизированной водой и использовали для ПЦР в реальном времени.

11. ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени для образцов, выделенных из клеток штаммов *S.cerevisiae* проводили в амплификаторе (BioRad, США). Условия ПЦР приведены в таблице 8. Каждая проба содержала 10 мкл реакционной смеси (2,5x ПЦР буфер (KCl, Трис-HCl (pH 8,8), 6,25 mM MgCl₂), интеркалирующий краситель EvaGreenI, пассивный референсный краситель ROX, Taq ДНК-полимераза, 25 mM dNTP, глицерин, Tween 20); 0,5 мкл праймерной смеси, 5 мкл кДНК и 9,5 мкл деионизированной воды.

Для образцов *C.glabrata* использовали амплификатор StepOne (ThermoFisher Scientific, США) и набор THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (Toyobo). Условия ПЦР также приведены в таблице 8. Каждая проба содержала 1,2 мкл раствора кДНК (10 нг), 7,5 мкл THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix, 6 мкл праймерной смеси (1,5 мкМ) и 0,3 мкл пассивного референсного красителя ROX.

Все эксперименты содержали контрольные стандарты разведения кДНК, негативный контроль обратной транскрипции и негативный контроль для ПЦР, а также три повтора для каждого образца. Количество мРНК исследуемых генов был нормализован относительно гена актина *ACT1*.

Протокол ПЦР в реальном времени

Период	Время	Температура, С°	Число циклов
Инициация	3 мин	95	1
Денатурация	15 сек	94	42
Отжиг	20 сек	ScPDR1 (F+R) - 57 ScSNQ2 (F+R) - 57 ScYOR1 (F+R) - 53 ScACT1 (F+R) - 55 CgCDR1 (F+R) - 57 CgCDR2 (F+R) - 57 CgSNQ2 (F+R) - 57 CgACT1 (F+R) - 58	
Элонгация	20 сек	72	
Кривая плавления	1 мин	50	1
	10 сек	Температура повышается каждые 10 сек на 0,5 °С	78

12. Трансформация дрожжей *S. cerevisiae* с использованием 0,1 М LiAc буфера

Реактивы:

1. Стерильный 0,1 М LiAc буфер, содержащий 100 мМ ацетат лития, 10 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 1мМ ЭДТА.
2. ДНК-носитель из спермы лосося, 2 мг/мл (Sigma).
3. Стерильный 50%-ный ПЭГ-4000.

4. Твердая селективная среда с соответствующими маркерами.

5. YPD жидкая

Клетки растили 3-4 часа в жидкой YPD или отбирали микробиологической петлей с чашки, после чего ресуспендировали в жидкой YPD. Центрифугировали суспензию 2 мин, 2500 об/мин. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл LiAc буфера, после чего инкубировали 15 мин, 30 °С. Центрифугировали 2 мин, 2500 об/мин, удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали в 70 мкл LiAc буфера и инкубировали 15 мин, 30 °С. К данной суспензии добавляли 4 мкл ДНК-носителя, 0,5-1 мкл плазмидной ДНК (или 5-10 мкл ПЦР продукта) и 120 мкл 50 % ПЭГ-4000, тщательно перемешивали. Оставляли суспензию при 30 °С на 30 минут. Снова аккуратно петлей перемешивали смесь. Затем суспензию дрожжевых клеток подвергали тепловому шоку в течение 15 минут при 42 °С в термостате. После теплового шока клетки высевали на твердую среду. При использовании генетицинового маркера к трансформационной смеси добавляли 2мл жидкой YPD и инкубировали 4 часа в термостатируемой качалке при перемешивании 250 rpm и 30°C. После чего смесь центрифугировали 2 мин, 2500 об/мин и удаляли большую часть супернатанта. Оставшиеся 200-300мкл высевали на твердую среду с генетицином. Чашки с трансформированными дрожжами помещали в термостат при 30 °С, на 2 суток.

13. Выделение митохондрий из клеток дрожжей *S. cerevisiae* и измерение скорости поглощения кислорода

Культуру клеток выращивали культуру клеток в четырех колбах по 150 мл YPGal до оптической плотности OD = 5-7 (фаза близкая к переходу в стационар). Клетки осаждали при 4000 об/мин, 5 мин, 4 °С. Осадок дважды промывали 200 мл холодной дистиллированной воды, центрифугировали при 4000 об/мин, 5 мин, 4 °С. После второй промывки пробирку с осадком клеток

взвешивали и определяли массу дрожжей. Наливали в пробирку СИД из расчёта 1:10 к биомассе, предварительно растворив ДТТ в СИД из расчёта 15 мг ДТТ на г сырой массы дрожжей (5-10 мМ). Клетки перемешивали на магнитной мешалке или 15 мин при комнатной температуре. Осаждали при 4000 об/мин, 5 мин, 4 °С. Осадок дважды промывали 200 мл холодной дистиллированной водой, центрифугировали при 4000 об/мин, 5 мин, 4 °С. Сливали супернатант, добавляли в пробирку СИФ (без фермента) из расчета 1:10, ресуспендировали осадок. Измеряли оптическую плотность и добавляли зимолиазу, растворённую в 1 мл СИФ из расчёта 2,5 мг/г дрожжей. Инкубировали в термостатируемой качалке при 28-30 °С. Каждые 5 мин отбирали аликвоту для измерения оптической плотности. Когда оптическая плотность падала в 10 раз реакцию останавливали добавлением PMSF (на кончике шпателя). Для осаждения протопластов суспензию центрифугировали при 4000 об/мин, 5 мин, 4 °С. Супернатант сливали, ресуспендировали протопласты в 40 мл СПП. Центрифугировали при 4000 об/мин, 5 мин, 4 °С. Для разрушения протопластов осадок ресуспендировали в 15 мл СВ1, переносили в гомогенизатор Даунси, добавляли PMSF (на кончике шпателя) и гомогенизировали 20 строк (примерно 2 мин) на льду. Добавляли 40 мл СВ2, переносили гомогенат в пробирку центрифугировали при 3000 об/ мин 5 мин. Сливали супернатант (не до конца) в чистый стакан и центрифугировали при 11000 об/ мин 10 мин. Сливали супернатант и промывали осадок, ресуспендировав в 40 мл СВ2, центрифугировали при 11000 об/мин 10 мин. Супернатант выливали, осажденные митохондрии ресуспендировали 200 мкл СВ2 и переносили в чистую микропробирку объемом 1,5 мл.

Из пробирки отбирали 10 мкл суспензии и использовали для анализа количества белка. Концентрацию белка измеряли с помощью набора Pierce™ BCA (Thermo Fisher) согласно инструкции.

Скорость поглощения кислорода изолированными митохондриями оценивали с помощью кислородного электрода Кларка (Strathkelvin

Instruments 782, Великобритания). Перед началом измерения к среде СИМ добавляли смесь-пируват-малата до конечной концентрации 15 мМ.

Таблица 9

Состав сред, используемых при выделении митохондрий

Среда	pH	Реактивы	Концентрация
СИД – среда инкубации с дитиотриэтолом (ДТТ)	pH 8,6	Tris - HCl	50 мМ
СИФ – среда инкубации с ферментом	pH 7,4	Сорбит	1 М
		ЭДТА	5 мМ
		HEPES-Tris	10 мМ
СПП – среда промывания протопластов	pH 7,2-7,4	Сорбит	1,2 М
		HEPES-Tris	10 мМ
		BSA (добавляли перед началом выделения митохондрий)	0,4% (4 мг/мл)
СВ1 – среда выделения митохондрий 1	pH 7,2	Маннит	0,3 М
		ЭДТА	1 мМ
		Tris-HCl	10 мМ
		BSA (добавляли перед началом выделения митохондрий)	0,4% (4 мг/мл)
СВ2 – среда выделения	pH 7,2	Маннит	0,6 М
		ЭДТА	1 мМ

митохондрий 2		Tris-HCl	10 мМ
		BSA (добавляли перед началом выделения митохондрий)	0,4% (4 мг/мл)
СИМ – среда инкубации митохондрий	рН 7,2-7,4	Маннит	0,6 М
		Tris-HCl	10 мМ
		KCl	10 мМ
		H ₃ PO ₄	0,1 мМ

14. Митохондриальное дыхание

Дыхание изолированных митохондрий измеряли кислородным электродом Кларка (Oroboros Instruments, Инсбрук, Австрия), используя стандартную полярографическую методику, при 25 ° С в СИМ (см. таблица 9) с использованием DATLAB программного обеспечения. Отдельная проба содержала 10 мкл выделенных митохондрий, 5 мМ сукцината. Дыхательный контроль измерялся по FCCP в концентрации 100 нМ. Коэффициент дыхательного контроля высчитывали как число, указывающее во сколько раз увеличилось потребление кислорода после добавления разобщителя. Дыхательный контроль измерялся при участии О.В. Марковой.

15. Анализ устойчивости к химическим агентам по скорости роста

Устойчивость дрожжей к тем или иным веществам, а также взаимодействие двух химических веществ оценивали, выращивая дрожжи в жидкой среде YPD в 96-луночной плашке. Объем лунки составлял 200 мкл, а исходная плотность суспензии - 0,005 (600 нм). Плашку с клетками *S.glabrata* инкубировали 24 часа при 37 °С и 250 rpm в течении 24 часов,

после чего измеряли оптическую плотность при 600 нм с помощью планшетного спектрофотометра VARIOSKAN LUX (Thermo Scientific). Оптическую плотность в контроле (без добавления веществ) принимали за 1 и оценивали относительно нее плотность в других лунках.

16. Проточная цитофлуориметрия

Клетки *S.cerevisiae*, выращенные ночь на твердой среде ресуспендировали в соответствующей жидкой среде до оптической плотности 0.02 (550нм) и анализировали флуоресценцию после 1 часа инкубации в качалке при 30 °С с исследуемым веществом (или растворителем). Флуоресценция GFP анализировали с помощью проточного цитофлуориметра CytoFlex (Beckman) при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссионном фильтре 525/40 нм. Нильский красный добавляли к клеткам после 1 ч инкубации в концентрации 3.5мкМ, инкубировали при 30 °С еще 10 минут и анализировали его флуоресценцию в клетках с помощью 585/42 нм эмиссионного фильтра. Клетки *C.glabrata* ресуспендировали до оптической плотности 0.2 (600нм) и инкубировали при 37 °С. Для измерения накопления Нильского красного в клетках *C.glabrata* использовали концентрацию вещества 7мкМ и проточный цитофлуориметр EC800 (Sony): длина волны возбуждения 488 нм и эмиссионный фильтр 525/40 нм. В каждом эксперименте было проанализировано не менее 10 000 событий (клеток). При анализе данных производили поправку на автофлуоресценцию: из значений флуоресценции белка GFP (или Нильского красного) вычитали значение автофлуоресценции штамма дикого типа, проинкубированного в тех же условиях.

17. Флуоресцентная микроскопия

Исследования проводили на микроскопе Olympus BX 1000 с использованием стандартного набора фильтров (Таблица 10).

Фильтры флуоресцентного микроскопа для визуализации клеток

№	Название	Возбуждающий фильтр, нм	Светоделитель, нм	Барьерный фильтр, нм
1	U-MNU2	360-370	400	420
2	U-MNG2	530-550	570	590
3	U-MNIBA3	470-495	505	510-550

18. Определение морфологии митохондрий *in vivo*

Для исследования морфологии митохондрий клетки штаммов дрожжей растили ночь в качалке при 30 °С в жидкой среде YPD. Во всех случаях финальная плотность суспензий достигала около $2-4 \cdot 10^6$ клеток/мл. Затем по 200 мкл суспензии клеток каждого штамма наливали в пробирки “eppendorf” и окрашивали митохондриально-направленными красителями TMR (200 нМ) либо Mitotracker Green (100 нМ). Затем суспензию клеток инкубировали 10 минут при комнатной температуре и помещали на стекло и фотографировали в соответствующем канале флуоресценции (U-MNG2 для TMR; U-MNIBA для Mitotracker Green). Из полученных фотографий вырезали фрагменты с одиночными клетками и зашифровывали. Морфологию митохондрий для каждой сфотографированной клетки определяли слепым методом, присваивая каждой фотографии наименование класса в зависимости от степени раздробленности митохондриального ретикулума (Рисунок 8). Далее мы сравнивали количество клеток со слитыми, нормальными и фрагментированными митохондриями.

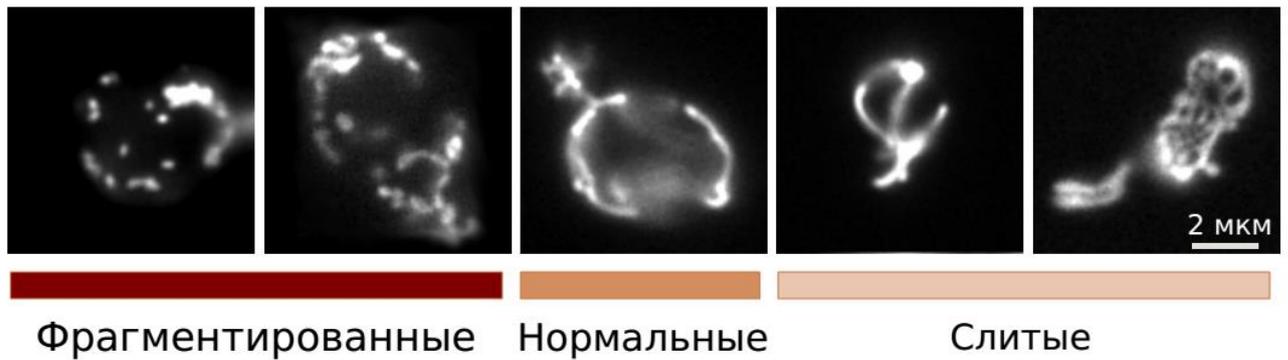


Рисунок 8. Классификация морфологии митохондриального ретикулула.

19. Скрещивание клеток и растаскивание тетрад

Для скрещивания использовали гаплоидные клетки штаммов противоположного типа спаривания (*MATa* и *MATalpha*). Клетки скрещивали с помощью микробиологической петли на чашке Петри с твердой средой YPD, после чего инкубировали сутки при 30 °С. За сутки клетки формировали зиготы, которые переносили на новую чашку, содержащую оба селективных маркера, характерных для родительских штаммов и расщипывали клетки до отдельных колоний. Через день около 10 отдельных колоний расщипывали на чашку Петри с твердой средой КАс. Через 3-4 суток клетки наблюдали в микроскоп и выбирали клоны, содержащие максимальный процент аскоспор (тетрад).

Клетки выбранного клона собирали микробиологической петлей и ресуспендировали в 20 мкл 10% сорбитола. В смесь добавляли 1 мкл зимолиазы (7,5 мг/мл) для растворения оболочки тетрады и инкубировали 20-25 мин при температуре 30 °С. После этого смесь равномерно расщипывали на краю чашки с твердой средой YPD. Затем с помощью иглы микроманипулятора 4 клетки из одной тетрады растаскивали отдельно. Чашку помещали в термостат на 30 °С на 2 суток. Каждую колонию, образованную отдельной клеткой из тетрады переносили на чашки с двойной селективной средой, а затем анализировали с помощью тестерного ПЦР и, при необходимости, флуоресцентной микроскопии.

Для определения типа спаривания полученных гаплоидных штаммов, клетки каждой, выросшей на селективной среде колонии скрещивали с клетками штаммов, содержащих *URA3 (MAT alpha)* и *LEU (MAT a)* селективные маркеры, на чашке Петри с твердой средой YPD и инкубировали ночь в термостате при температуре 30°C. Через сутки дрожжевые клетки пересаживали на твердую среду с селективными маркерами, характерными для обоих родительских штаммов. На данных селективных средах способны вырасти только зиготы, полученные в результате успешного скрещивания. Таким образом, дрожжи с колоний, успешно скрестившиеся с клетками штамма *URA3 (MATalpha)* обладали противоположным ему типом спаривания, то есть *MATa*, и наоборот – успешно скрестившиеся с клетками штамма *LEU (MATa)* были типа спаривания *MATalpha*.

20. Получение *Rho0* клеток

Клетки выращивали ночь при 30 °C на чашке Петри с твердой средой YPD. На следующий день на кончике петли брали клетки с чашки, ресуспендировали в 2,5 мл жидкой среды YPD в 50 мл пробирку типа "Falcon" (оптическая плотность 0,2-0,5) и освежали в термостатируемой качалке 1 час. Затем добавляли 20 мкМ бромистого этидия (Helicon) в пробирку и оставляли на ночь в качалке. На следующий день доводили оптическую плотность клеток до 0,1, разводили в 1000 раз и высевали на чашку с твердой средой YPDGly 100 мкл конечной суспензии, чтобы при размазывании их стеклянной петлей на чашке, примерно, 200 колоний. Оставляли чашку YPDGly в термостате на 2 суток. За это время вырастали большие и маленькие колонии. Затем маленькие колонии (клетки *petite*) расштриховывали на чашку с твердой средой YPD (для дальнейшего использования в экспериментах) и на чашку с твердой средой YPGly (для контроля, поскольку клетки *petite* не растут на YPGly).

Чтобы убедиться в отсутствии мтДНК (*petite Rho0*), клетки снимали петлей с твердой среды и фиксировали в 200 мкл 70% этанола, затем добавляли интеркалирующий ДНК краситель DAPI до конечной концентрации 2 мкг/мл и инкубировали 20-30 мин при комнатной температуре. После этого образец центрифугировали 2 мин со скоростью 2500 об/мин, удаляли супернатант и ресуспендировали в 200 мкл воды или среды. Полученный препарат проверяли на отсутствие мтДНК с помощью флуоресцентной микроскопии в канале U-MNU2.

Результаты

1. Липофильные катионы индуцируют множественную лекарственную устойчивость в дрожжах

Ранее сотрудниками нашей лаборатории было показано, что алкилированные родамины являются субстратами ABC-транспортеров в клетках дрожжей *S.cerevisiae* [70]. С одной стороны, данные соединения накапливаются в матриксе митохондрий и таким образом, они могут избегать непосредственного связывания с транскрипционными факторами Pdr1p, Pdr3p, регулирующими экспрессию PDR генов. С другой стороны, накопление липофильных катионов в митохондрии может вызывать дисфункцию этих органелл и, таким образом, запускать в клетке сигнальный каскад, включающий в себя активацию МЛУ. Мы решили выяснить, могут ли митохондриально-направленные липофильные соединения, подобно другим субстратам PDR-переносчиков активировать механизм множественной лекарственной устойчивости, и если могут, то каким образом.

1.1 Динамика накопления липофильного катиона C₁₂R1 клетками дрожжей *S.cerevisiae*.

Мы исследовали динамику накопления в клетках флуоресцентного катиона C₁₂R1 (додецилродамина 19). С помощью проточной цитометрии мы наблюдали, что при переносе клеток с твердой среды в жидкую, содержащую C₁₂R1, клетки первоначально накапливают краситель, а затем его количество в клетках начинает снижаться (Рисунок 9А).

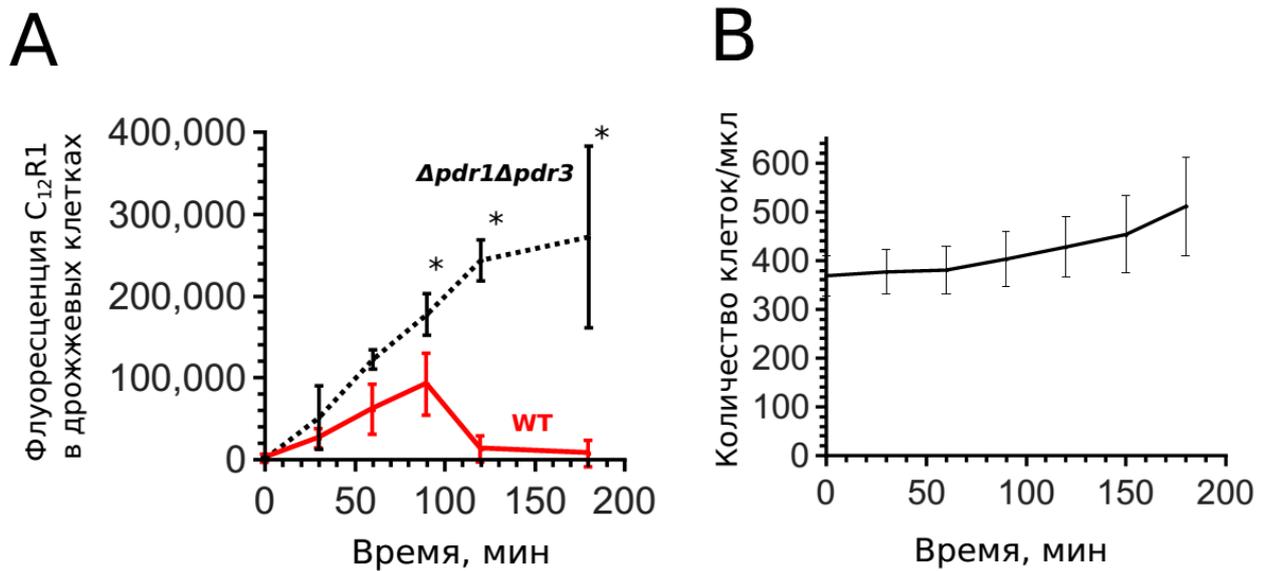


Рисунок 9. Динамика накопления C₁₂R1 клетками дрожжей *S.cerevisiae*. Клетки ресуспендировали до $2 \cdot 10^4$ клеток/мл в жидкой YPD, содержащей 200 нМ C₁₂R1. (А) На графике показано среднее значение по четырем экспериментам (WT - дикий тип) и пяти экспериментам ($\Delta pdr1\Delta pdr3$) со стандартным отклонением. *P = 0.017 для сравнения с диким типом согласно непарному тесту Манна-Уитни. (В) Плотность клеток W303 в богатой жидкой среде не изменяется в течение первых 90 минут после начала измерения с помощью проточной цитофлуорометрии. На рисунке представлено среднее по трем экспериментам со стандартным отклонением.

Обнаруженный нами эффект снижения концентрации C₁₂R1 в клетках не может быть объяснен снижением соотношения количества молекул вещества на клетку, так как рост концентрации клеток в исследуемой суспензии начинался только после 3 ч инкубации клеток в жидкой среде (Рисунок 9В). Мы предположили, что время, через которое мы наблюдаем снижение концентрации C₁₂R1 в клетках соответствует времени, затрачиваемому на активацию транскрипции и трансляции МЛУ-переносчиков. Чтобы проверить эту возможность, мы исследовали динамику накопления C₁₂R1 в клетках штамма с делециями генов транскрипционных факторов *PDR1* и *PDR3*, регулирующих экспрессию основных АВС-переносчиков. В наших экспериментах мы не наблюдали снижения количества C₁₂R1 в клетках этого штамма (Рисунок 9А). Данные наблюдения, позволяют предположить, что липофильный катион C₁₂R1 при попадании в клетки дикого типа запускает механизм активации АВС-транспортеров, что,

впоследствии, приводит к выкачиванию соединения из клетки. Однако, снижение концентрации липофильных катионов в клетке может происходить и за счет других механизмов. Так, например, уменьшение скорости входа этих соединений в клетку при постоянной скорости их откачивания может привести к снижению их концентрации в клетке. Скорость поглощения липофильных катионов клеткой может зависеть от трансмембранного потенциала плазматической мембраны и ее липидного состава. Кроме того, снижение концентрации алкил-родаминов в клетках связано с их деградацией внутри клетки. Поэтому, чтобы проверить предположение об активации неспецифических ABC-переносчиков, мы исследовали активацию экспрессии генов этих переносчиков и накопление в клетках их продукта.

1.2 Липофильный катион C_{12} TRP стимулирует накопление ABC-переносчиков во внешней мембране клеток

Методом ПЦР в реальном времени мы оценили относительное количество мРНК генов трех ABC-переносчиков: *PDR5*, *SNQ2* и *YOR1*. Мы обнаружили, что C_{12} TRP значительно увеличивает относительное количество мРНК этих генов в клетках дрожжей дикого типа, в то время как в штамме *Δpdr1Δpdr3* этот эффект был менее выражен (Рисунок 10).

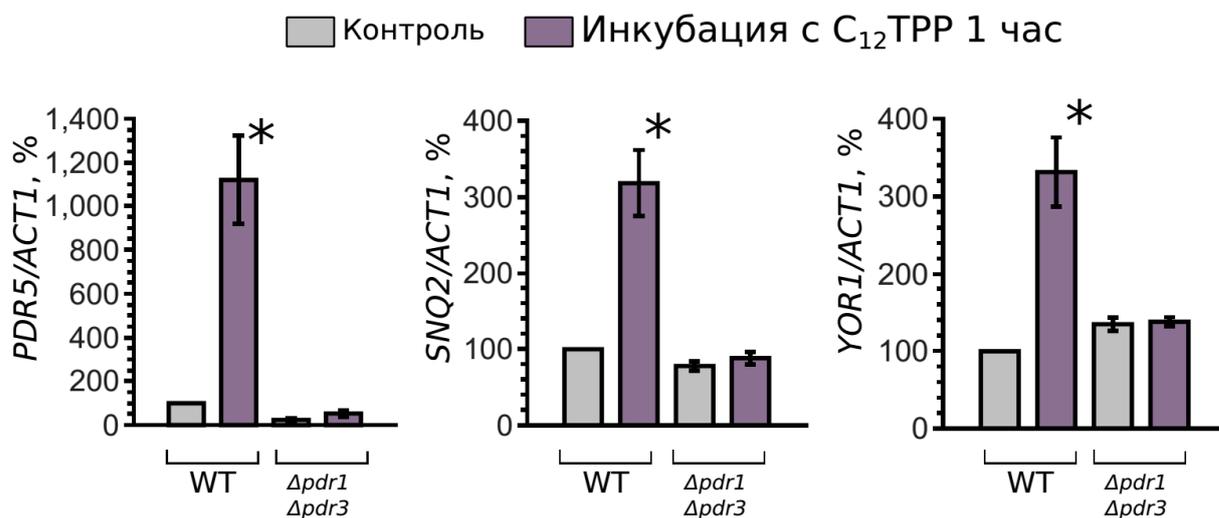


Рисунок 10. $C_{12}TPP$ (5 мкМ, время инкубации 1 час) вызывает увеличение содержания мРНК PDR-генов *PDR5*, *SNQ2* и *YOR1*. Количество мРНК исследуемых генов нормировали на количество мРНК гена *ACT1*. За 100% был взято количество мРНК в клетках дикого типа (WT), не обработанных $C_{12}TPP$. Столбики показывают среднее значение со стандартной ошибкой среднего. Количество независимых повторов равно четырем. * $P = 0,028$ для сравнения с контролем согласно непарному критерию Манна-Уитни.

Полученные данные позволяют утверждать, что $C_{12}TPP$ -индуцированное накопление ABC-транспортеров достигается путем транскрипционной активации соответствующих генов.

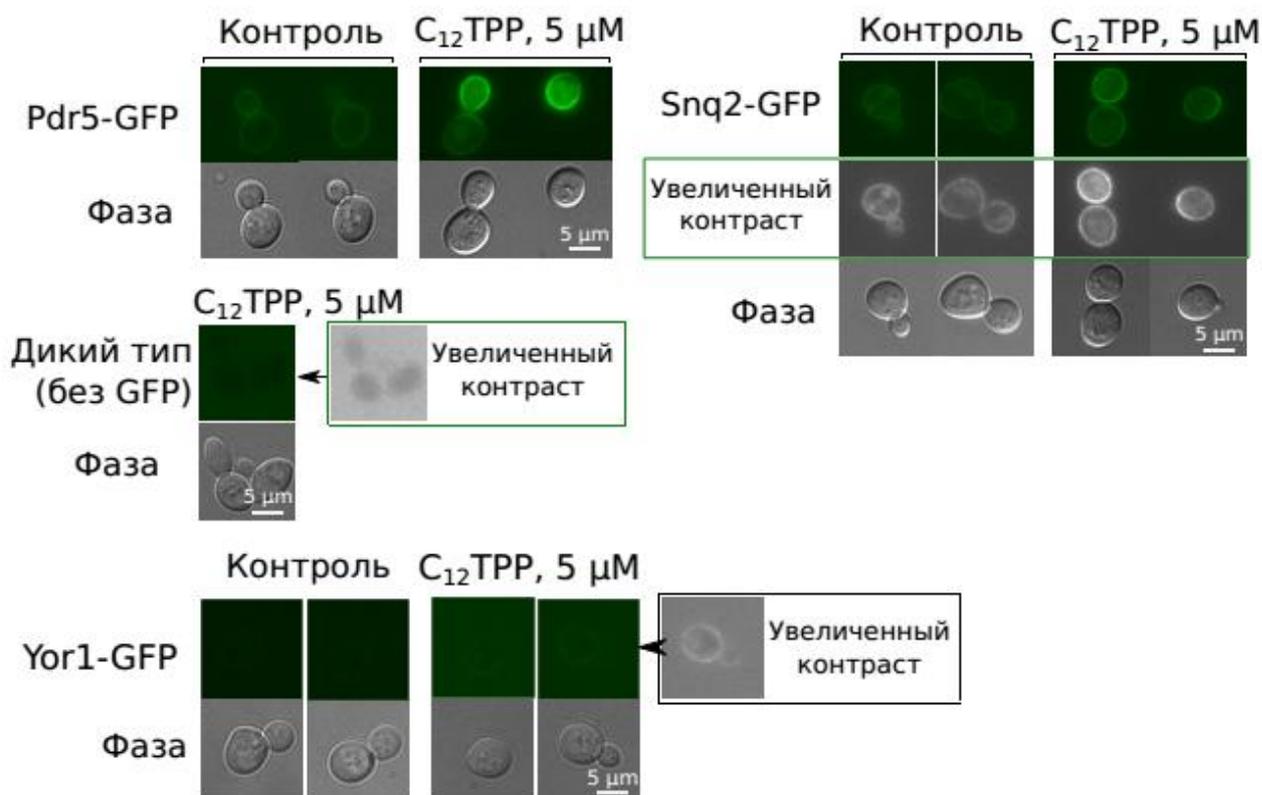


Рисунок 11. $C_{12}TPP$ стимулирует накопление ABC-переносчиков Pdr5p и Snq2p. Время инкубации 1 час. Все фотографии флуоресценции сделаны с одинаковым временем выдержки и настройками контрастности, за исключением отдельной панели “увеличенный контраст”. Зеленый цвет является псевдоокрашиванием.

Активация транскрипции не всегда приводит к увеличению содержания белка в клетке, несмотря на то, что обычно эти процессы хорошо скоррелированы. Чтобы детектировать накопление белков ABC-переносчиков в клеточной мембране, мы использовали набор штаммов, в каждом из которых к геномной копии генов ABC-переносчиков был подшит ген флуоресцентного белка GFP (так, чтобы GFP оказался с C-конца белка). Так как спектр флуоресценции $C_{12}R1$ частично перекрывается со спектром флуоресценции GFP, в последующих экспериментах мы использовали нефлуоресцентный липофильный катион $C_{12}TPP$ (додecilтрифенилфосфоний). С помощью флуоресцентной микроскопии мы обнаружили, что $C_{12}TPP$ стимулирует накопление в мембране двух основных ABC-переносчиков семейства PDR: Pdr5p и Snq2p (Рисунок 11). Количество белка Yor1-GFP в цитоплазматической мембране после инкубации клеток с

C_{12} TRP оказалось значительно ниже по сравнению с Pdr5-GFP и Snq2-GFP (Рисунок 11). По этой причине мы не смогли сделать никаких выводов о динамике накопления данного ABC-транспортера.

Мы также измерили содержание белка Pdr5-GFP с помощью проточной цитофлуорометрии (Рисунок 12). В соответствии с данными, полученными в экспериментах с $C_{12}R1$, после 30 минут инкубации с $C_{12}TRP$ количество Pdr5-GFP в клетках начинало расти (Рисунок 12B).

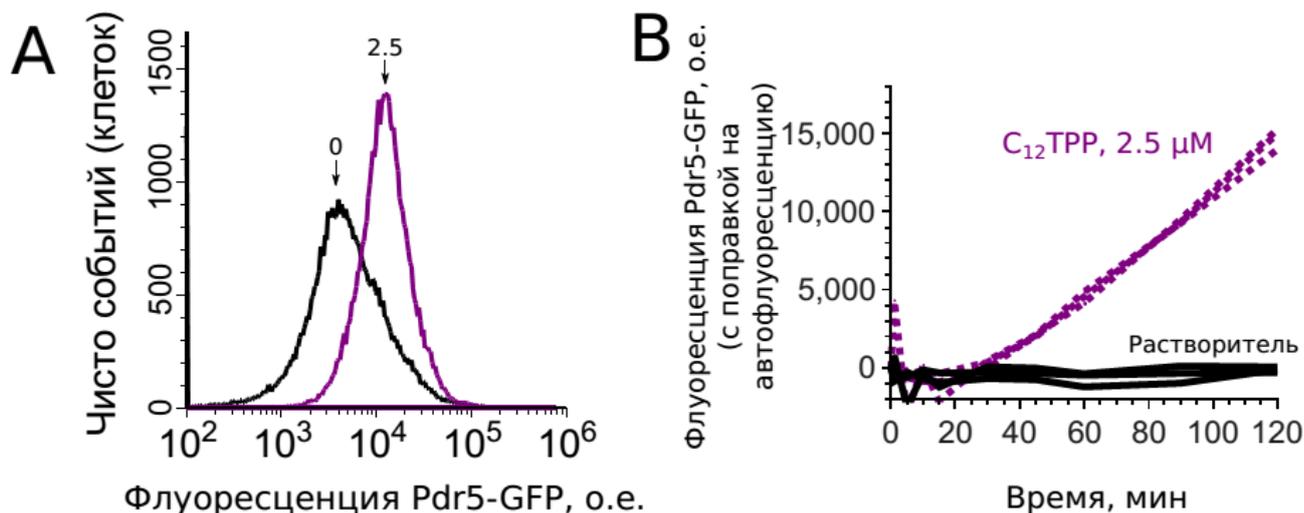


Рисунок 12. (А) Репрезентативный график эксперимента с клетками, экспрессирующими Pdr5-GFP с использованием проточной цитофлуорометрии. Цифры над стрелками соответствуют концентрациям (мкМ) добавленного $C_{12}TRP$. Время инкубации 1 час. (В) Динамика накопления Pdr5-GFP после добавления $C_{12}TRP$. На графике представлено среднее интегральное значение флуоресценции Pdr5-GFP после вычета автофлуоресценции клеток без GFP, измеренной в тех же экспериментах.

Важно отметить, что $C_{12}TRP$ -индуцированное увеличение уровня Pdr5-GFP в клетках происходило не из-за увеличения клеточного объема или площади клеточной поверхности, так как размер клеток обработанных $C_{12}TRP$ не отличался от контроля. Размер клеток мы оценивали по линейному светорассеянию клеток до и после воздействия $C_{12}TRP$ (Рисунок 13).

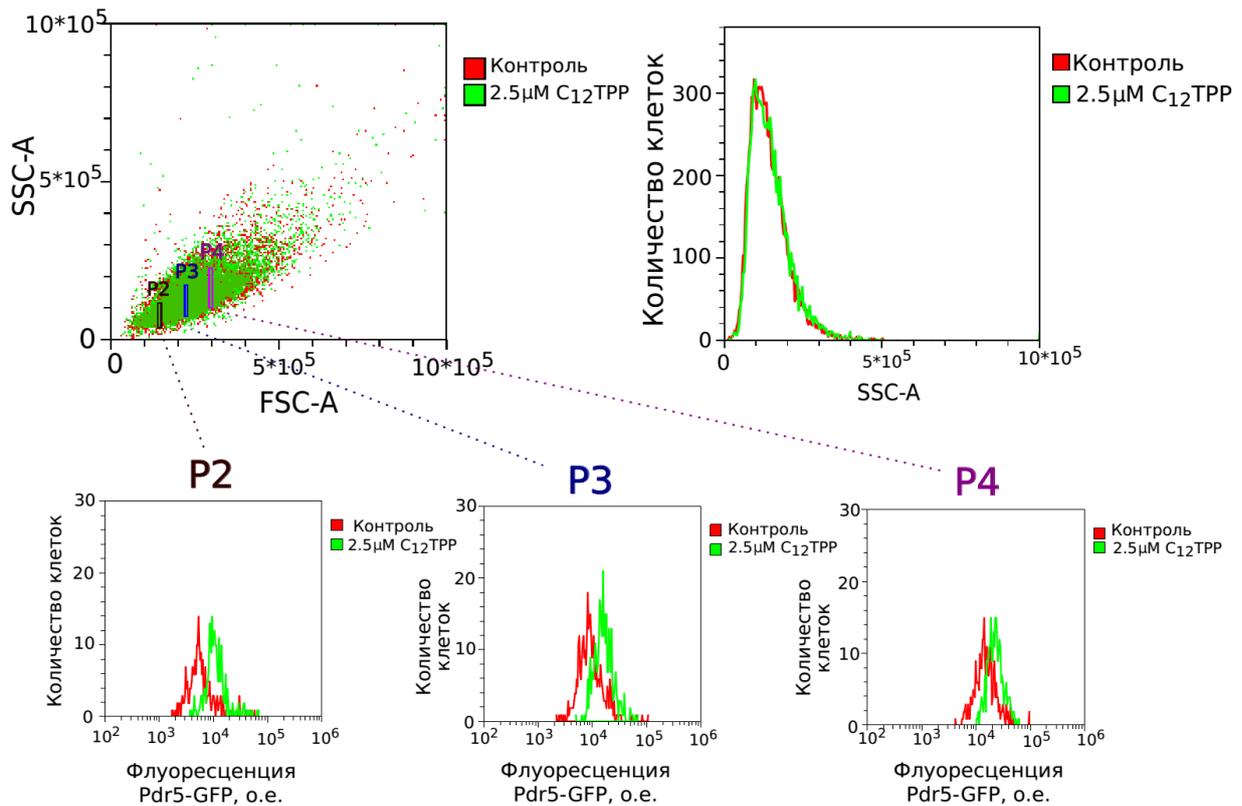


Рисунок 13. C₁₂TPP (2,5 мкМ, инкубация 1 час) не увеличивает размер клеток (соотношение прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния, верхняя панель). Увеличение количества Pdr5-GFP можно видеть в отдельно выделенных по размеру группах (нижние панели).

1.3 C₁₂TPP может быть как активатором, так и конкурентным ингибитором ABC-переносчиков

Наши эксперименты показали, что липофильные катионы активируют экспрессию МЛУ-генов и увеличению концентрации закодированных ими белков. Однако в то же время, липофильные катионы являются субстратами ABC-переносчиков и поэтому, являются конкурентными ингибиторами откачивания других субстратов этих переносчиков [87]. Поэтому, оставалось непонятным, может ли стимулированное C₁₂TPP накопление ABC-транспортеров в клеточной мембране усилить откачивание из клетки других субстратов этих транспортеров? Чтобы ответить на этот вопрос, мы изучили эффект преинкубации клеток с C₁₂TPP на степень накопления в клетках Нильского красного — незаряженного флуоресцентного субстрата ABC-

транспортеров. Известно, что данное соединение является субстратом ABC-переносчиков в дрожжах *Candida albicans* [139]. С помощью проточной цитометрии мы обнаружили, что в клетках штамма *S.cerevisiae*, содержащего ген *SNQ2* под регулируемым галактозным промотором, сверхэкспрессия *SNQ2* значительно снижает степень накопления Нильского красного, в то время, как репрессия этого гена оказывает противоположный эффект (Рисунок 14). Репрессия гена *PDR5* в штамме с регулируемым галактозным промотором перед этим геном, также увеличивала степень накопления Нильского красного в клетках (Рисунок 14). Таким образом, мы показали, что данный краситель является субстратом изучаемых нами ABC-транспортеров в клетках *S.cerevisiae* и может быть использован для решения поставленной задачи.

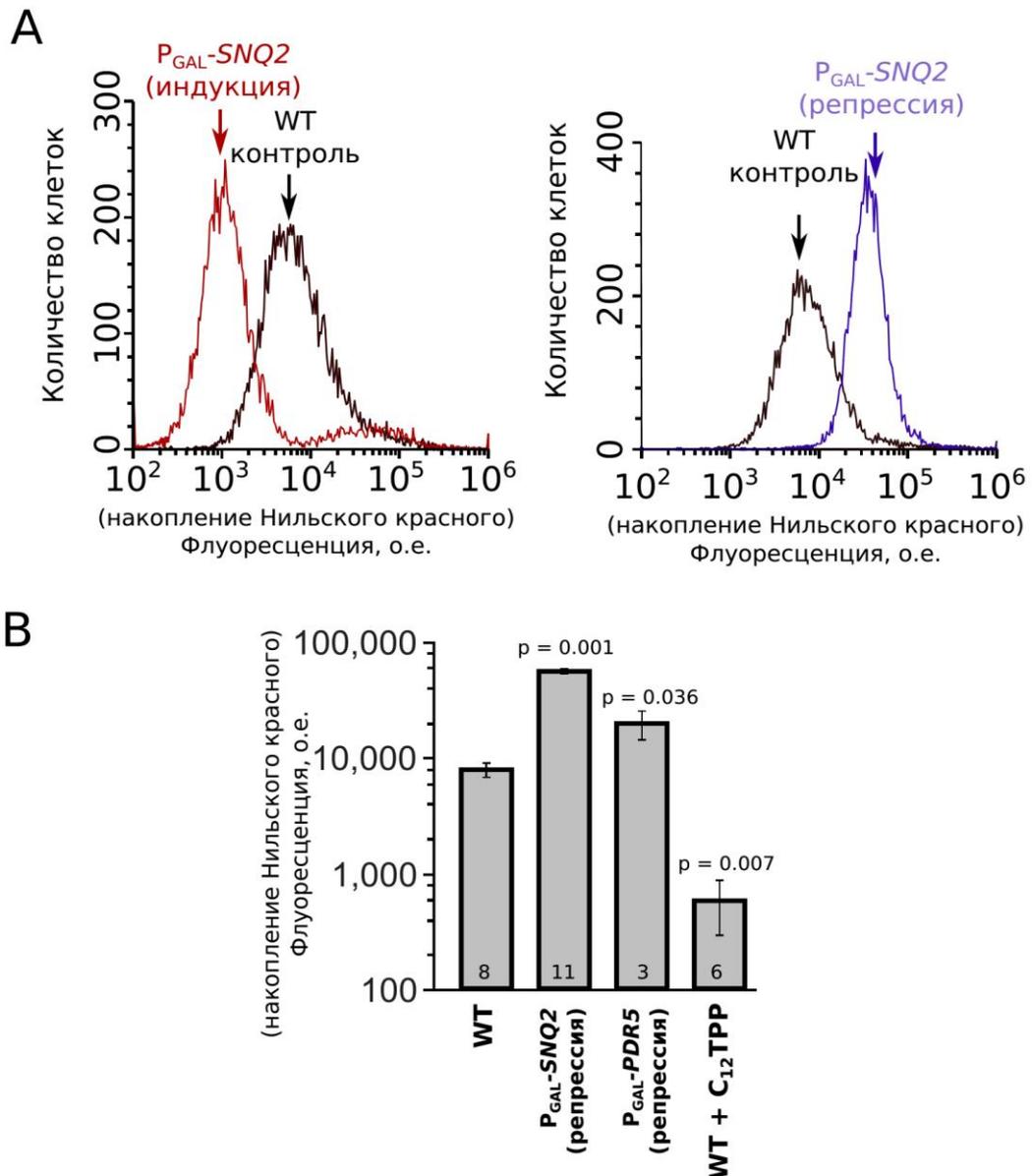


Рисунок 14. Накопление Нильского красного в клетках дрожжей *S.cerevisiae* зависит от уровней экспрессии МЛУ-транспортеров. (А) Репрезентативная картинка эксперимента по проточной цитофлуориметрии, показывающая степень накопления Нильского красного в клетках штамма дикого типа и клетках штамма $P_{GAL-SNQ2}$, выращенных на среде YPRafGal (слева) либо YPD (справа). Время инкубации 1 час. (В) Количественный анализ экспериментов по проточной цитофлуориметрии для клеток, выращенных на среде YPD. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов. Значения P value для сравнения с диким типом были рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни и поправкой на множественность Бонферрони.

С помощью микроскопии и проточной цитометрии мы обнаружили, что прединкубация клеток с $C_{12}TRP$ ингибирует накопление Нильского красного в клетках *S.cerevisiae* (Рисунок 15А-Д). В то же самое время, добавление $C_{12}TRP$ в среду инкубации одновременно с Нильским красным

приводило к резкому увеличению концентрации флуоресцентного субстрата АВС-переносчиков в дрожжевых клетках (Рисунок 15В-D).

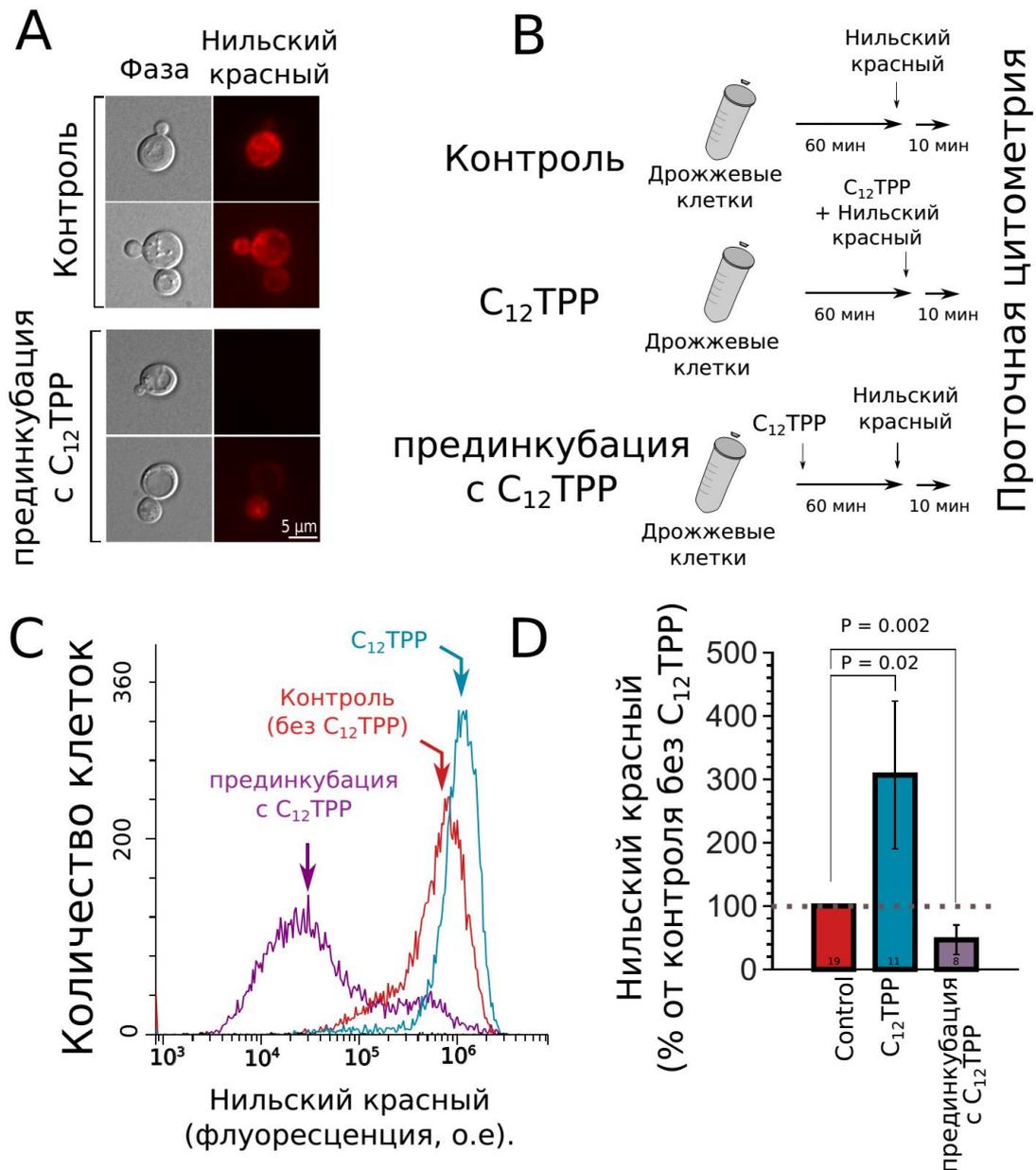


Рисунок 15. Прединкубация клеток с $C_{12}TPP$ предотвращает накопление ими субстрата МЛУ-переносчиков Нильского красного (А) Прединкубация клеток с 2,5 мкМ $C_{12}TPP$ в течение 1 часа снижает уровень накопления Нильского красного в клетках. Красный цвет на фото - псевдоокрашивание. (В) Дизайн эксперимента с Нильским красным. (С) Данные отдельного эксперимента проточной цитофлуорометрии по оценке количества Нильского красного в клетках. $C_{12}TPP$ (2,5 мкМ) добавляли за час, либо одновременно с Нильским красным (3,5 мкМ). (D) Количественный анализ данных проточной цитофлуорометрии (среднее \pm стандартное отклонение). За 100% взято среднее значение флуоресценции Нильского красного в контрольном образце. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов. Значения P value для сравнения с диким типом были рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни и поправкой на множественность Бонферрони.

На основании этих экспериментов мы сделали вывод, что в зависимости от времени воздействия на клетку $C_{12}TRP$ может быть как ингибитором, так и активатором в регуляции МЛУ.

1.4 Разобщение цитоплазматического и митохондриального пула нуклеотидов не препятствует активации МЛУ липофильными катионами

Известно, что липофильные катионы ингибируют митохондриальное дыхание [86] и разобщают дыхание и фосфорилирование [79,140]. Нарушение работы дыхательной цепи и разобщение приводит к деполяризации митохондрий, что, в свою очередь, приводит к снижению скорости синтеза митохондрией АТФ. Поскольку митохондриальный и цитоплазматический пулы АТФ/АДР сопряжены за счет работы переносчиков адениновых нуклеотидов, дисфункция митохондрий могла бы вызвать значительное изменение концентрации АТФ в цитоплазме. Важно отметить, что в отличие от многоклеточных животных, концентрация АТФ в клетках дрожжей может значительно изменяться в зависимости от условий среды [141]. Можно предположить, что дрожжи способны воспринимать снижение количества митохондриального АТФ как сигнал дисфункции митохондрий и активировать МЛУ. Чтобы проверить эту возможность мы получили штамм, в котором ген основного митохондриального АТФ/АДР-переносчика *PET9* (*AAC2*) поставлен под контролируемый галактозный промотор (Рисунок 16А). Клетки полученного штамма $P_{GAL}-PET9$ оказались не способны расти на несбраживаемом источнике углерода — глицерине (Рисунок 16В). Подобный фенотип также характерен для штаммов дрожжей с нефункциональной мтДНК, так как именно в ней находятся гены, кодирующие ферменты дыхательной цепи. Мы убедились в наличии мтДНК в дрожжевых клетках с помощью окраски DAPI (Рисунок 16С). Более того, скрещивание клеток штамма $P_{GAL}-PET9$ с *Rho0* клетками, несущими нормальную копию гена *PET9* вернуло клеткам способность расти на

несбраживаемом субстрате (Рисунок 16B). Данный результат подтверждает, что клетки штамма $P_{GAL}-PET9$ содержат функциональную мтДНК. Чтобы подтвердить функциональность галактозного промотора, на основе нашего штамма мы получили штамм, в котором $Pet9p$ был помечен GFP. Инкубация клеток в среде с галактозой приводила к появлению в клетках сигнала GFP, который не был виден при росте клеток на среде богатой глюкозой или раффинозой (Рисунок 16D). Кроме того, мы выделили митохондрии из клеток дикого типа и клеток с репрессией $PET9$. Отсутствие $Pet9p$ приводило к ингибированию поглощения кислорода, стимулируемого ADP (Рисунок 16E). В то же время, разобщитель дыхательной цепи FCCP увеличивал скорость поглощения кислорода митохондриями из клеток с репрессированным $PET9$ (Рисунок 16E). Данные результаты полярографического эксперимента указывают на то, что репрессия $PET9$ практически полностью ингибирует обмен ATP/ADP между матриксом митохондрий и цитоплазмой, но не приводит к значительному снижению трансмембранного потенциала митохондрий.

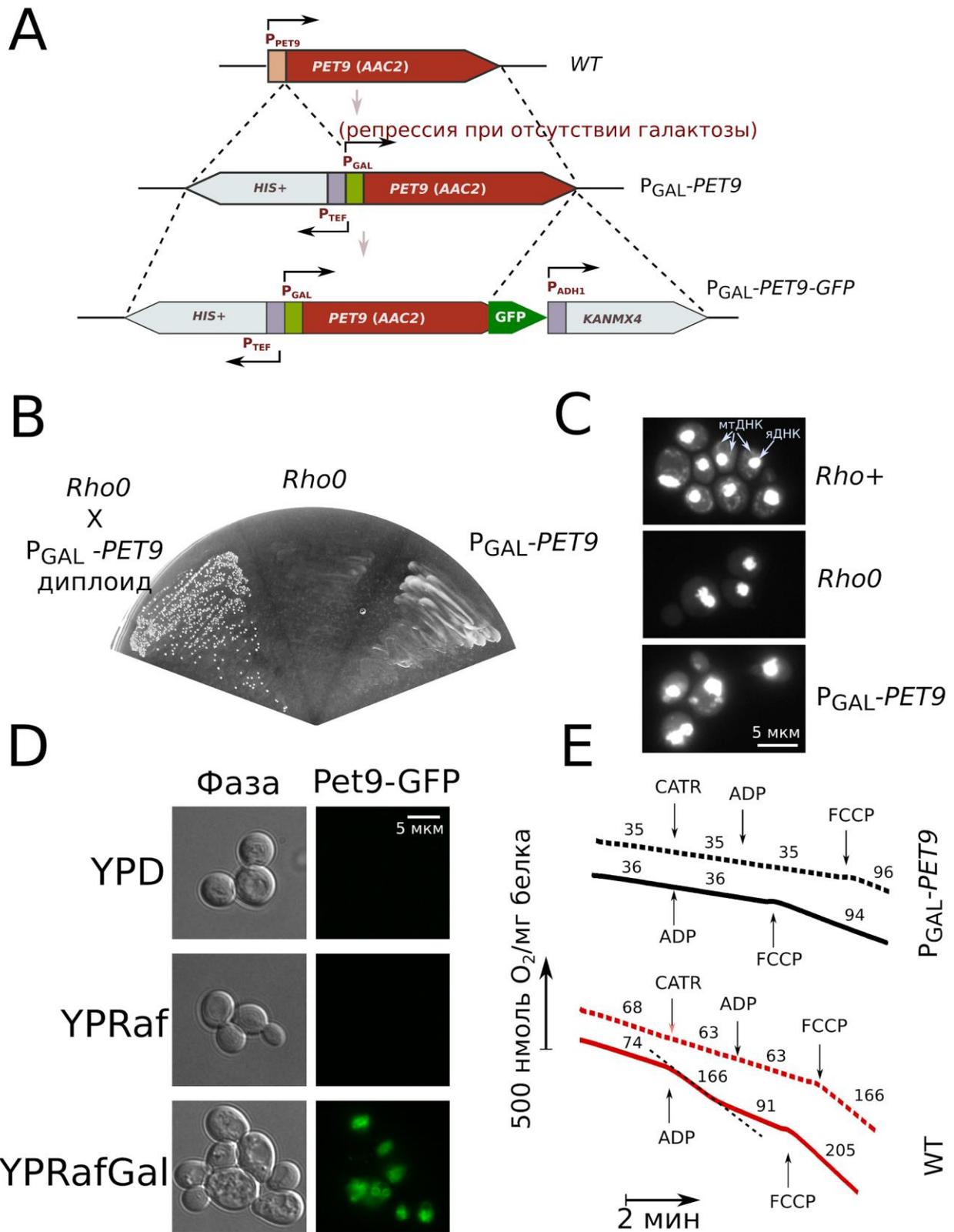


Рисунок 16. Репрессия *PET9* ингибирует аденин нуклеотидный обмен между митохондриями и цитоплазмой. (А) Схема замещения промотора гена *PET9* на регулируемый галактозный промотор, а также вставки последовательности *GFP* с С-конца гена. *HIS⁺* и *KANMX4* - селективные маркеры. (В) Диплоиды, полученные после скрещивания клонов штамма *P_{GAL}-PET9* с *Rho0* (слева) обретают способность расти на глицерине, в отличие от исходных клонов (в центре, справа). Это свидетельствует о том, что клетки штамма *P_{GAL}-PET9* содержат нативную мтДНК и функциональную

дыхательную цепь и не растут на глицерине по причине репрессии белка Pet9p. (C) Окраска митохондриальной (мтДНК) и ядерной (ядДНК) ДНК в клетках с помощью DAPI. Клетки $P_{GAL}-PET9$ сохраняют мтДНК в условиях репрессии *PET9*, клетки *Rho0* и *Rho+* использовали в качестве отрицательного и положительного контроля. (D) Локализация и накопление Pet9-GFP в клетках штамма $P_{GAL}-PET9-GFP$ в условиях репрессии галактозного промотора (глюкоза — D, раффиноза — Raf) и экспрессии (раффиноза и галактоза — RafGal). (E) Скорость поглощения кислорода митохондриями, изолированных из клеток штамма $P_{GAL}-PET9$ и клеток дикого типа (*W303-1A*). Добавки к митохондриям: САТR (карбоксиатрактилозид 1 мкМ), ADP (150 мкМ), FCCP (200 нМ). Цифры над кривыми соответствуют нмоль O_2 /мин \times мг белка.

Получив штамм $P_{GAL}-PET9 PDR5-GFP$, мы исследовали содержание Pdr5-GFP в клетках в условиях репрессии *PET9* под действием как липофильного катиона $C_{12}TPP$, так и анионного разобщителя РСР (пентахлорфенола). В качестве положительного контроля мы использовали клотримазол. Несмотря на то, что базовое количество АВС-транспортера в клетках $P_{GAL}-PET9 PDR5-GFP$ было незначительно выше, чем в контроле, в клетках обоих штаммов мы наблюдали эффект увеличения внутриклеточной концентрации Pdr5-GFP после добавления любого из трех исследованных нами веществ (Рисунок 17).

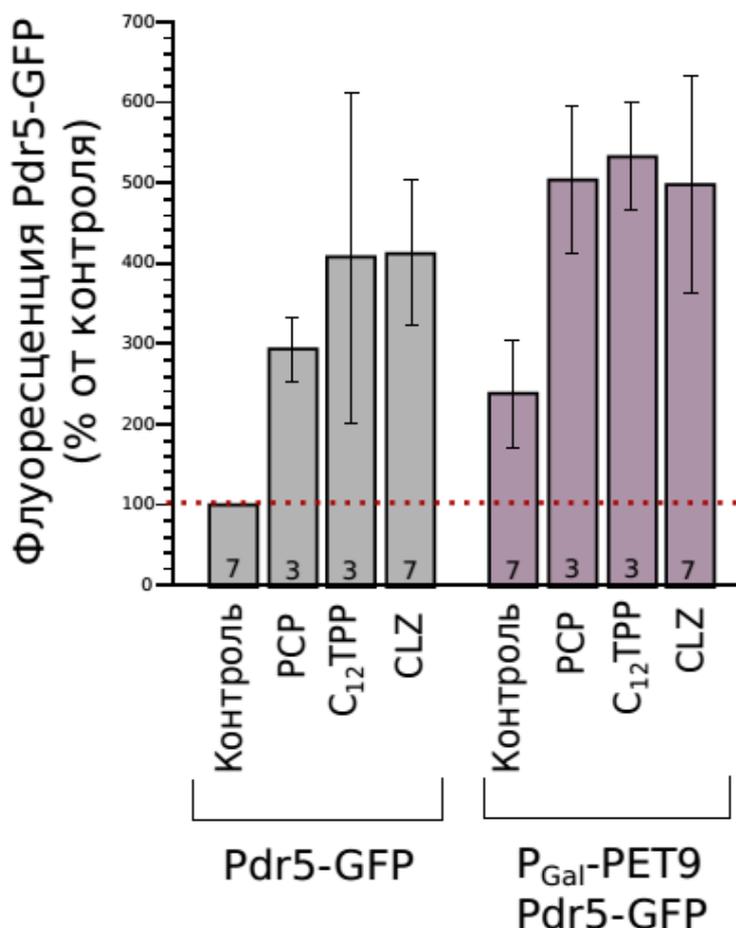


Рисунок 17. Содержание Pdr5-GFP в клетках штамма дрожжей, в которых репрессирован ген основного митохондриального АТФ/АДФ-переносчика *PET9* увеличивается после инкубации с C₁₂TPP (2,5 мкМ) и PCP (20 мкМ). Азольный антимикотик клотримазол (CLZ, 5 мкМ) использовали в качестве положительного контроля активации МЛЮ. Время инкубации 1 час. Клетки растили в среде YPD (репрессия галактозного промотора). Столбики демонстрируют среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов.

Мы полагаем, что в штамме со сниженным уровнем экспрессии гена *PET9* обмен АТФ/АДФ между матриксом митохондрий и цитоплазмой не осуществляется (Рисунок 16Е) или незначителен. Если это так, то снижение скорости окислительного фосфорилирования за счет действия C₁₂TPP как ингибитора дыхания или разобщителя не должен приводить к снижению фосфорильного потенциала в цитоплазме клеток мутантного штамма. Такие образом, полученные нами данные позволяют заключить, что активация МЛЮ под действием C₁₂TPP не связана непосредственно с вызванной им дисфункции митохондрий и снижением концентрации АТФ в цитоплазме.

1.5 Деполяризация митохондрий не приводит к дополнительной активации ABC-переносчиков под действием липофильных катионов

Так как липофильные катионы являются положительно заряженными молекулами, они накапливаются отрицательно заряженных органеллах — митохондриях [74]. Мы предположили, что накопление липофильных катионов в митохондриях может препятствовать детекции клеткой этих соединений в цитоплазме транскрипционными факторами Pdr1/Pdr3. Чтобы проверить эту гипотезу мы сравнили уровень активации МЛУ в клетках, выросших на разных питательных средах. В присутствии высокой концентрации глюкозы дрожжевые клетки в значительной степени подавляют функционирование митохондрий, в то время как наличие слабо сбраживаемого источника углерода галактозы или несбраживаемого субстрата — глицерина вынуждает клетку полагаться на окислительное фосфорилирование [142]. Поэтому, клетки дрожжей, выращенные на среде, в которой в качестве единственного источника углерода была галактоза, раффиноза или глицерин демонстрируют увеличенную скорость клеточного дыхания, а их митохондрии обладают более высоким трансмембранным потенциалом, чем клетки, выращенные на глюкозе. Мы оценили эффект C_{12} TRP на накопление белка Pdr5-GFP в клетках, выращенных на богатых средах, содержащих в качестве источника углерода глюкозу, галактозу и глицерин. C_{12} TRP индуцировал увеличение содержания Pdr5-GFP в клетках, выращенных на сбраживаемых субстратах, однако мы не наблюдали значимого эффекта в клетках, выращенных на глицерине (Рисунок 18А).

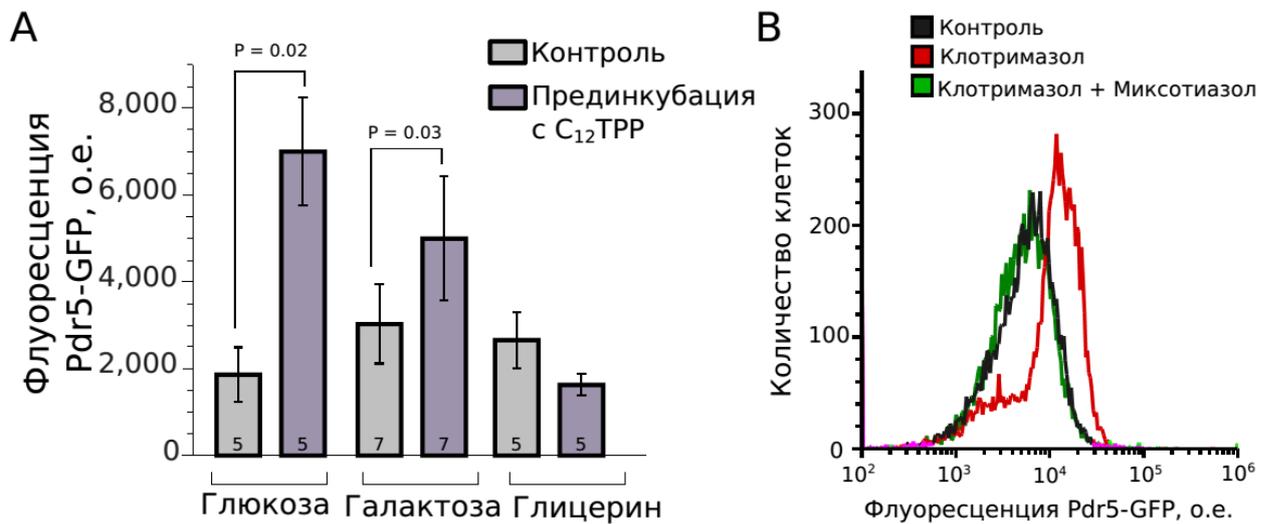


Рисунок 18. Снижение количества внутриклеточного АТФ препятствует активации МЛУ под действием ксенобиотиков при росте на глицерине. (А) Эффект от используемого источника углерода на C₁₂TRP-индуцированное (2,5 мкМ, 1 час) накопление Pdr5-GFP. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов. Значения P value для сравнения с диким типом были рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни и поправкой на множественность Бонферрони. (В) Клотримазол (20 мкМ, время инкубации 1 час) стимулирует увеличение количества Pdr5-GFP в клетках, выращенных на среде с глицерином. Нарушение работы дыхательной цепи с помощью миксотиазола (0,5 мкМ) полностью ингибирует этот эффект. На рисунке представлен результат типичного эксперимента (n=3).

При росте на глицерине разобщающий [79,140] либо ингибиторный [88] эффект C₁₂TRP на митохондрию мог бы приводить к существенному снижению уровня внутриклеточного АТФ и тем самым препятствовать синтезу Pdr5-GFP. Согласно этому предположению, в наших экспериментах миксотиазол (ингибитор III комплекса дыхательной цепи) препятствовал накоплению Pdr5-GFP, вызываемому азольным антимикотиком клотримазолом на среде с глицерином (Рисунок 18В).

Может ли деполяризация митохондрий увеличить индуцируемую C₁₂TRP активацию PDR-переносчиков в нашей модели? Это могло бы быть возможным при условии, что установление равновесия концентраций липофильного катиона между клеткой и окружающей ее средой происходит относительно медленно, а между матриксом митохондрий и цитоплазмой — быстро. Тогда внутриклеточное распределение катиона, вероятно, влияет на его детекцию клеточными системами. Если это так, то ингибирование

дыхательной цепи путем деполяризации митохондрии должно предотвращать накопление липофильных катионов в матриксе митохондрий и тем самым увеличивать уровень активации МЛУ. Ингибирование дыхательной цепи миксотиазолом приводило к увеличению концентрации флуоресцентного липофильного катиона $C_{12}R1$ в цитоплазме. Для клеток, выращенных на глюкозе, мы использовали смесь миксотиазола и ингибитора АТФ-синтазы олигомицина А, чтобы предотвратить энергизацию митохондрий за счет гидролиза АТФ митохондриальной АТФ-синтазой. Мы использовали концентрации ингибиторов, которые существенно подавляют рост контрольного лабораторного штамма в присутствии несбраживаемого субстрата [143]. В качестве положительного контроля для индукции МЛУ мы использовали азольный антимикотик клотримазол. Мы обнаружили, что смесь миксотиазола и олигомицина А, действительно, увеличивала цитоплазматический сигнал $C_{12}R1$ в клетках (Рисунок 19А). Однако деполяризация митохондрий не влияла на $C_{12}TRP$ -индуцируемое накопление Pdr5-GFP в клетках ни на глюкозе (Рисунок 19В), ни на галактозе (Рисунок 19С).

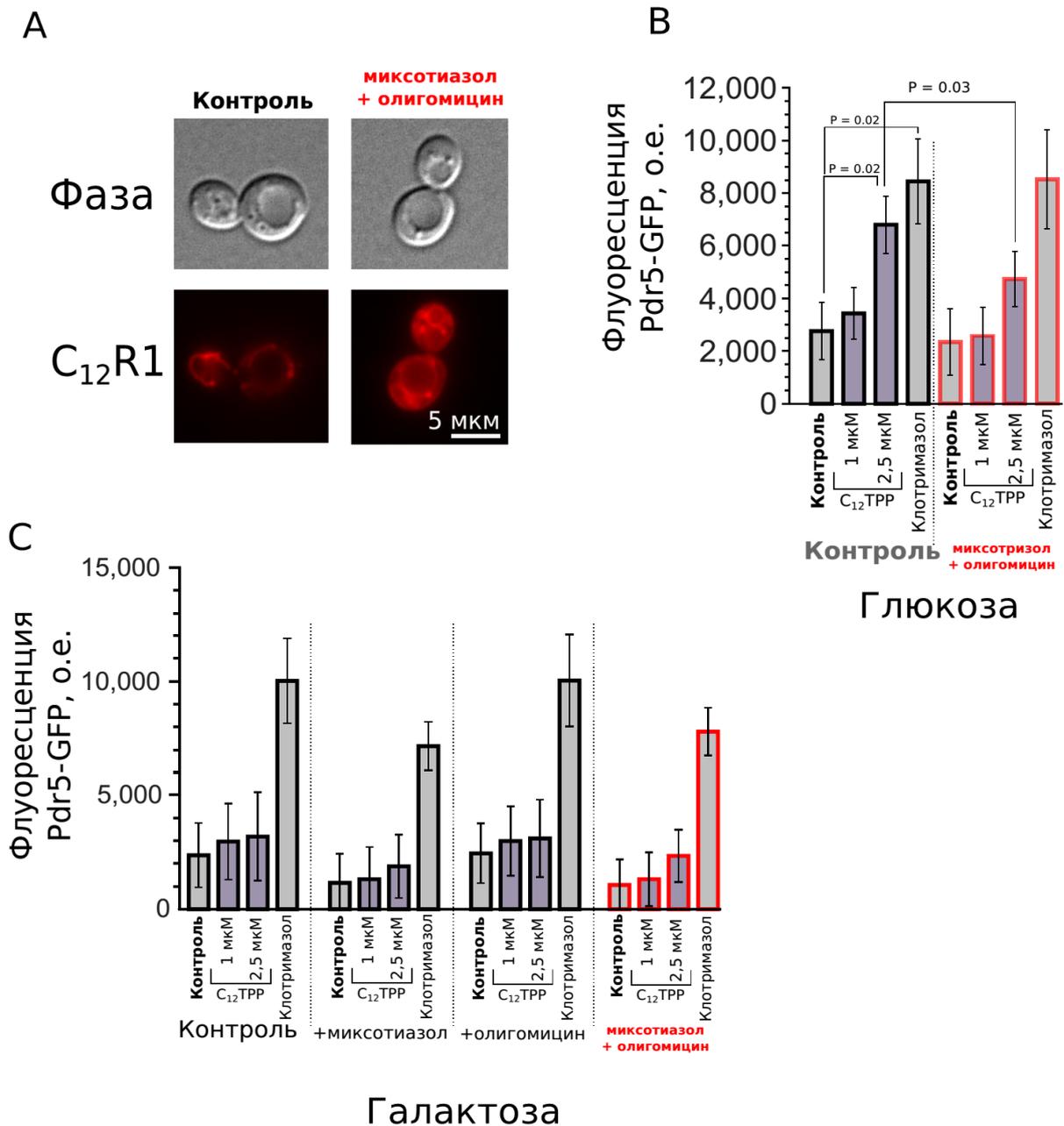


Рисунок 19. Деполяризация митохондрий не влияет на $C_{12}TPP$ -индуцированное накопление Pdr5-GFP. (А) Добавление миксотиазола (7 μ М) и олигомицина А (5 μ г/мл) увеличивает накопление (диффузию) липофильного катиона $C_{12}R1$ (200нМ) в цитоплазме клеток дикого типа. Красный цвет — псевдо окрашивание. (В,С) Количественный анализ данных проточной цитометрии по измерению количества Pdr5-GFP в клетках (среднее \pm стандартное отклонение) с миксотиазолом и/или олигомицином А в YPD (С, n = 5) и в YPGal (D, n = 6). Клотримазол добавляли в концентрации 20 μ М, время инкубации 1 час. Значения P value для сравнения с диким типом были рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни и поправкой на множественность Бонферрони.

Мы предположили, что добавление к клеткам 2,5 μ М $C_{12}TPP$ вызывает максимально возможную активацию экспрессии Pdr5-GFP, поэтому мы

протестировали более низкие концентрации этого вещества. Однако, мы не увидели значимого увеличения количества Pdr5-GFP в клетках после добавления 1 мкМ C_{12} TRP (Рисунок 19В,С).

Поскольку олигомицин является ингибитором не только АТФ-синтазы, но и Pdr5p [144], его взаимодействие с данным белком может вызывать компенсаторную активацию генов МЛУ-транспортеров. Поэтому, мы оценили динамику накопления Pdr5-GFP, опосредованную C_{12} TRP, при добавлении азид натрия (NaN_3). Азид натрия является ингибитором как дыхания, так и АТФ-азы. В соответствии с предыдущими результатами, C_{12} TRP не активировал МЛУ в присутствии NaN_3 (Рисунок 20).

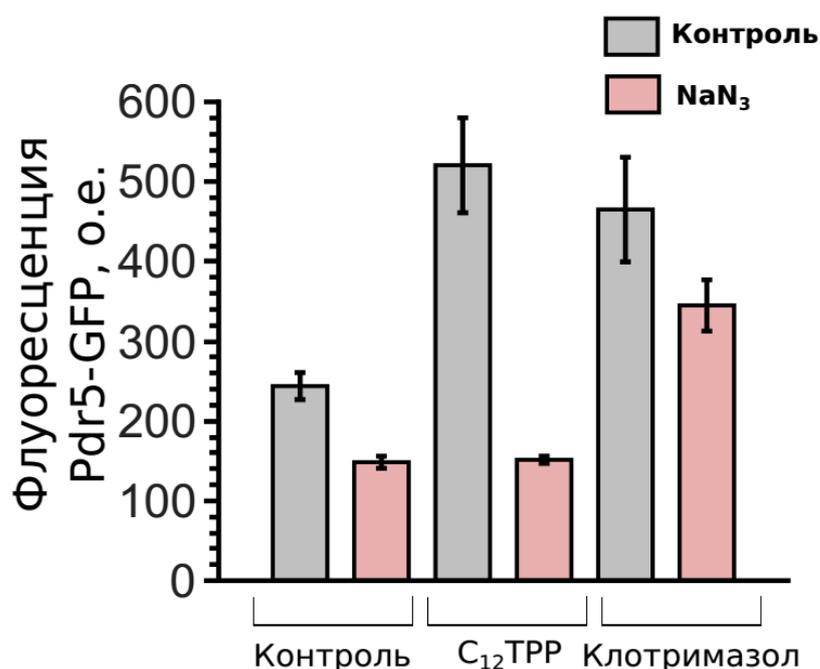


Рисунок 20. NaN_3 (10 мМ) ингибирует накопление Pdr5-GFP индуцированное C_{12} TRP (2,5 мкМ, время инкубации 1 час). Клотримазол (20 мкМ) был использован как контроль, чтобы показать, что NaN_3 не препятствует синтезу белка. Столбцы показывают среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 3$).

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что деполяризация митохондрий не влияет на активацию МЛУ под действием липофильных катионов. Впрочем, поскольку в своих экспериментах мы исследовали только две концентрации C_{12} TRP, нельзя исключить существования C_{12} TRP-индуцируемой активации МЛУ в условиях

деполяризации митохондрий в достаточно узком диапазоне концентраций $C_{12}TPP$.

1.6 Роль ретроградной митохондриальной сигнализации и транскрипционный факторов Pdr1p, Pdr3p в активации МЛУ под действием $C_{12}TPP$.

Известно, что дисфункция митохондрий активирует в клетках Rtg-зависимый сигнальный путь, который, в том числе, стимулирует экспрессию *PDR5* [62]. Механизмы трансдукции сигнала, а также набор регулируемых этой сигнальной системой генов хорошо изучен. Однако до сих пор остается неясным, какой фактор “считывается” белком Rtg2, инициирующим этот каскад. Считается, что это может быть как трансмембранный потенциал [145], так и концентрация АТФ в цитоплазме [146]. Независимо от того, какой механизм имеет место, активация этого сигнального пути могла бы быть причиной активации генов АВС-переносчиков. Поэтому, мы исследовали роль ретроградной митохондриальной сигнализации в $C_{12}TPP$ -зависимой активации МЛУ. Для этого мы оценили накопление Нильского красного клетками с делецией генов белков Rtg-каскада. Однако, концентрация Нильского красного в клетках исследованных штаммов не отличалась от контроля (Рисунок 21В). Кроме того ингибирование данного сигнального пути путем делеции гена *RTG2* в штамме, содержащем Pdr5-GFP, не предотвратило накопление АВС-транспортера в клетках после инкубации их с $C_{12}TPP$ (Рисунок 21А). Данные этих экспериментов указывают на то, что ретроградная сигнализация, осуществляемая Rtg белками, не принимает участие в активации АВС-переносчиков под действием $C_{12}TPP$.

Сигнальный каскад, основанный на Rtg белках не единственный способ передачи сигнала от неработающих митохондрий к ядру [147]. Недавно в нашей лаборатории было показано, что митохондриальная супероксиддисмутаза *Sod2p* и цитоплазматический сенсор на перекись водорода *Yap1* формируют еще один сигнальный каскад, передающий

информацию от митохондрий к ядру в условиях стресса, вызванного высокой концентрацией этанола [90]. Чтобы проверить возможную роль чувствительного к окислительному стрессу транскрипционного фактора Yap1p в C_{12} TRP-зависимой активации МЛУ, мы получили штамм $\Delta yap1 Pdr5-GFP$. Мы также учли возможность пересечения сигнальных путей между Yap1p и Rtg-сигнальными путями [90] и получили штамм $\Delta yap1 \Delta rtg2 Pdr5-GFP$. Мы обнаружили, что C_{12} TRP способен стимулировать накопление Pdr5-GFP в клетках всех, протестированных нами штаммов с нарушениями митохондриальной сигнализации (Рисунок 21А). Прединкубация с C_{12} TRP также стимулировала снижение количества Нильского красного в клетках штаммов $\Delta yap1$ и $\Delta yap1 \Delta rtg2$ (Рисунок 21В). На основании этих экспериментов мы сделали вывод о том, что белок Yap1p, по всей видимости, не играет роли в активации МЛУ-переносчиков под действием C_{12} TRP.

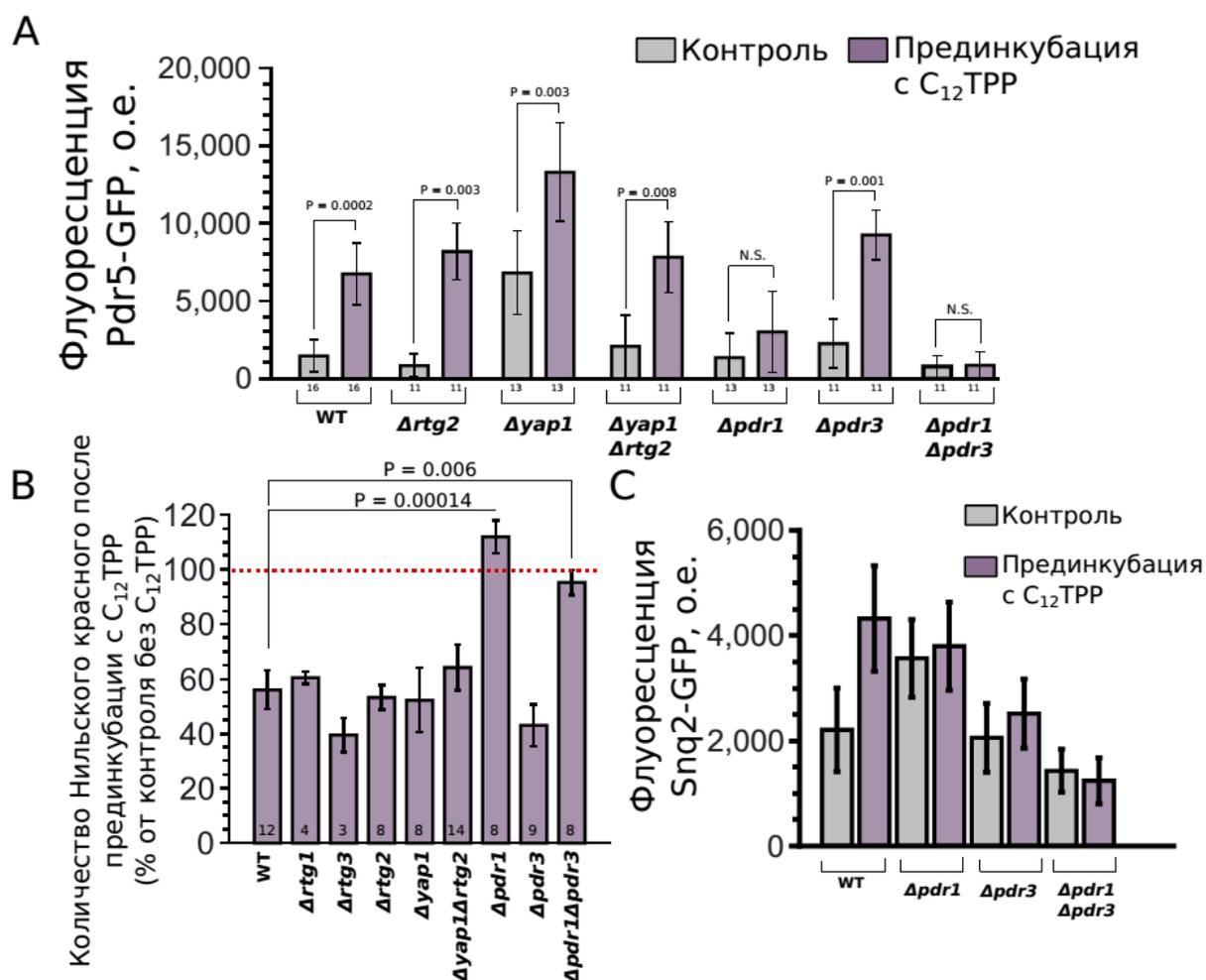


Рисунок 21. Роль PDR-генов и ретроградной сигнализации в C₁₂TPP-зависимой активации МЛУ. (А) Количество Pdr5-GFP в клетках штаммов дрожжей с нарушением ретроградной сигнализации увеличивается после инкубации с C₁₂TPP (2,5 мкМ, 1 час). (В) Прединкубация с C₁₂TPP (2,5 мкМ, 1 час) снижает количество Нильского красного в клетках штаммов с делециями белков ретроградной сигнализации. (С) C₁₂TPP не влияет количество Snq2-GFP в клетках штамма с делецией гена *PDR1*, n = 8. (А–С) Клетки росли в среде YPD (репрессия галактозного промотора). Столбики демонстрируют среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов. Значения P value для сравнения с диким типом были рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни и поправкой на множественность Бонферрони.

На следующем этапе исследований мы изучили вклад транскрипционных факторов Pdr1p и Pdr3p в C₁₂TPP-зависимую активацию МЛУ. Мы обнаружили, что делеция гена *PDR1*, но не *PDR3* ингибировала накопление в клетках Pdr5-GFP после инкубации с C₁₂TPP (Рисунок 21А). В клетках штаммов Δ pdr1 и Δ pdr1 Δ pdr3 также не происходило накопление

белка Snq2-GFP (Рисунок 21С). Более того, в наших экспериментах C_{12} ТРР стимулировал снижение количества Нильского красного в клетках штамма *Δpdr3*, но не оказывал подобного эффекта в клетках штамма *Δpdr1* (Рисунок 21В). Известно, что активация Rtg- сигнального пути приводит к активации *PDR3*-зависимой экспрессии *PDR5* и не зависит от активности транскрипционного фактора *PDR1* [64]. Таким образом, на основании полученных нами данных, можно утверждать, что C_{12} ТРР индуцирует экспрессию *PDR5* независимо от Rtg-сигнального пути. Более того, наши данные указывают на ключевую роль транскрипционного фактора Pdr1p в механизме активации МЛЮ под действием C_{12} ТРР. Однако то, какая система выполняет роль сенсора, позволяющего клетке обнаружить этот липофильный катион остается неизвестным. Возможно, что сам по себе транскрипционный фактор Pdr1p способен связывать C_{12} ТРР и в результате связывания активировать экспрессию генов мишеней.

1.7 Поиск генов, функция которых необходима для C_{12} ТРР-зависимой активации МЛЮ.

На основе специально разработанной системы скрининга авторами другой лаборатории был составлен список генов, делеция которых при добавлении ксенобиотиков (не липофильных катионов) изменяла уровень активации АВС-переносчиков Pdr5 и Yor1 [55]. Предполагается, что продукты данных генов, вовлечены в дополнительные пути активации системы МЛЮ и/или взаимодействуют с транскрипционными факторами Pdr1/3. Мы воспользовались доступным нам набором штаммов из делеционной коллекции Invitrogen [133] и проверили, влияет ли делеция генов, опубликованных в вышеупомянутой работе, на C_{12} ТРР-индуцированную активацию системы МЛЮ. Кроме того, у нас была возможность оценить эффект делеции гена *MDM39 (GET1)*, продукт которого регулирует встраивание белков в мембрану эндоплазматического ретикулума, и кодирующего белок семейства Hsp70, гена *SSZ1* на активацию системы МЛЮ

под действием $C_{12}TPP$. Делеция данных генов в совокупности с делециями *PDR1* и *PDR3* повышала чувствительность клеток к азольным антимикотикам по сравнению с клетками штамма $\Delta pdr1\Delta pdr3$ [55]. Используя концентрацию Нильского красного к клеткам в качестве показателя активности МЛУ-транспортеров мы обнаружили, что делеция генов *MDM39*, *SPT8* и *ERG3* предотвращает активацию системы МЛУ липофильным катионом $C_{12}TPP$ (Рисунок 22А).

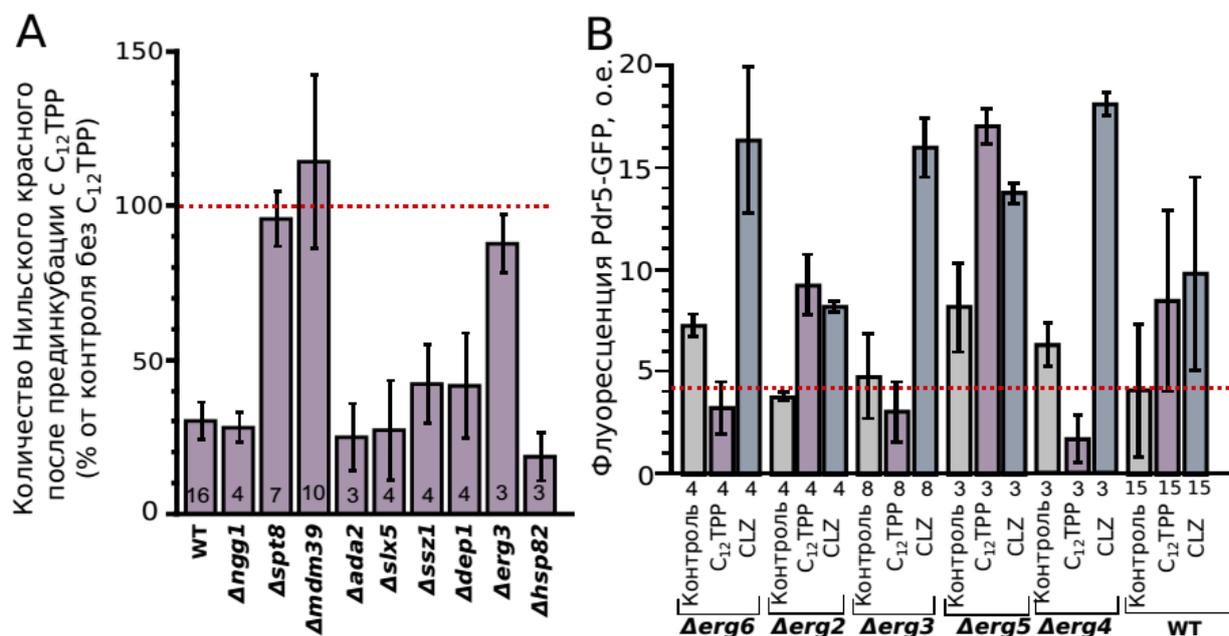


Рисунок 22. Роль потенциальных генов-регуляторов в $C_{12}TPP$ -зависимой активации МЛУ. (А) Количество Нильского красного в клетках после прединкубации с $C_{12}TPP$ (2,5 мкМ, 1 час). (В) Содержание Pdr5-GFP в клетках после инкубации 1 час $C_{12}TPP$ (2,5 мкМ) и клотримазолом (CLZ, 5 мкМ). Столбики демонстрируют среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов.

Причиной, по которой прединкубация с $C_{12}TPP$ не привела к активации МЛУ в данных штаммах могло быть (1) нарушение механизма детекции липофильного катиона в клетке или (2) нарушение экспрессии генов, необходимых для множественного лекарственного ответа. Вероятно, последнее произошло в штамме $\Delta spt8$, так как Spt8p является субъединицей SAGA-комплекса и вовлечен в регуляцию транскрипции [148]. В случае с геном *MDM39* известно, что его продукт является субъединицей GET комплекса и участвует во вставке белков в мембрану эндоплазматического

ретикулума [149]. Мы предполагаем, что в данном случае отсутствие белка Mdm39 может приводить к нарушению процессинга основных АВС-переносчиков и, таким образом, препятствовать их накоплению в цитоплазматической мембране в ответ попадание ксенобиотика в клетку. Ген *ERG3*, в свою очередь, участвует в биосинтезе эргостерина, компонента клеточной мембраны дрожжей [150]. Так как в наших экспериментах делеция гена *ERG3* не препятствовала накоплению Нильского красного в клетках после прединкубации с C_{12} ТРР, мы оценили вклад делеций генов, кодирующих ферменты конечных реакций биосинтеза эргостерина в C_{12} ТРР-индуцируемой активации МЛУ. Для этого мы получили ряд штаммов дрожжей, содержащие делеции соответствующих генов и синтезирующих белок Pdr5-GFP. В наших экспериментах делеция генов *ERG6*, *ERG3* и *ERG4* препятствовала накоплению Pdr5-GFP в клетках под воздействием C_{12} ТРР (Рисунок 22В). В тоже время добавление клотримазола — азольного антимикотика, ингибирующего путь синтеза эргостерола, приводило к увеличению интегральной флуоресценции Pdr5-GFP во всех протестированных штаммах (Рисунок 22В). Это позволило нам предположить, что механизм активации МЛУ в ответ на добавление липофильного катиона отличается от механизма активации МЛУ азольными антимикотиками.

В наших экспериментах в *S. cerevisiae* делеции генов *ERG6*, *ERG5* и *ERG4* приводила к увеличению интегральной флуоресценции Pdr5-GFP в клетках, по сравнению с клетками дикого типа (Рисунок 22В). Возможно ли, что активация МЛУ, в данном случае, связана с накоплением определенных интермедиатов синтеза эргостерина в клетке? В поисках ответа на данный вопрос, мы постарались ингибировать путь синтеза эргостерина на как можно более раннем этапе. Так как делеции генов, кодирующих ферменты ранних стадий синтеза эргостерина являются летальными для клеток, мы сконструировали штамм, в котором ген *ERG9* поставлен под регулируемый промотор P_{GAL} . Мы обнаружили, что ингибирование биосинтеза эргостерина

на этапе синтеза сквалена с помощью репрессии белка Erg9p приводит к существенному накоплению Pdr5-GFP в клетке (Рисунок 23А). Нарушение транспорта стерина также вызывало подобные изменения: мы обнаружили увеличение содержания Pdr5-GFP в штамме, в котором нокаутированы все четыре гена семейства *LAM*, отвечающие за транспорт стерина между плазматической мембраной и эндоплазматическим ретикуломом (Рисунок 23В).

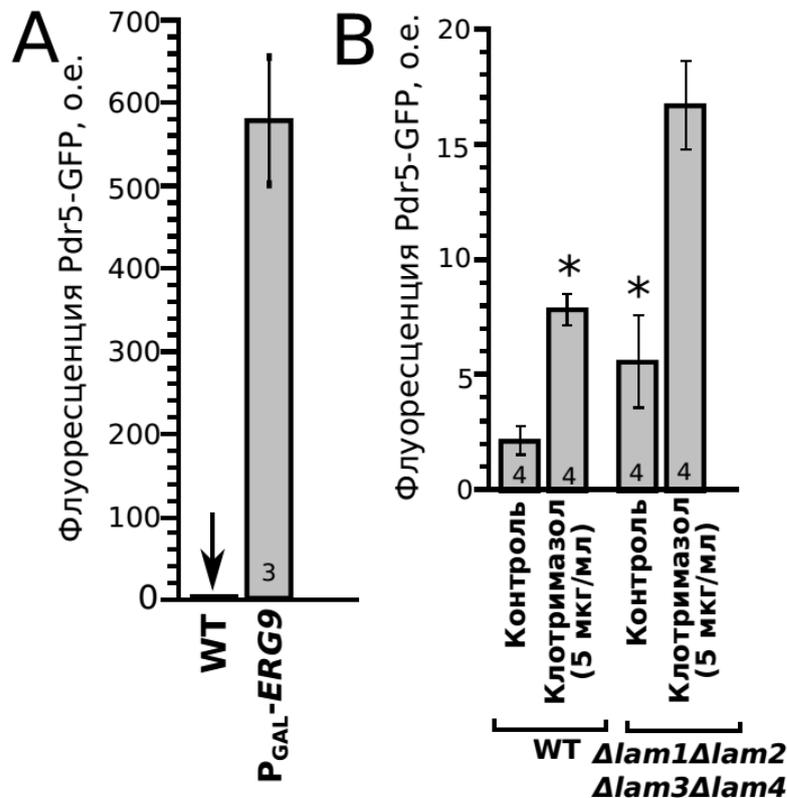


Рисунок 23. Роль метаболизма и транспорта эргостерина в активации МЛУ. (А) Увеличение количества Pdr5-GFP в клетках штамма с нарушением синтеза эргостерина за счет репрессии белка Erg9, среднее значение ± стандартная ошибка среднего, n=3. (В) Увеличение количества Pdr5-GFP в клетках штамма с нарушением транспорта эргостерина за счет делеции генов *LAM*. *P value = 0,057, сравнение с диким типом, рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни и поправкой на множественность Бонферрони

Так как накопление Pdr5-GFP в клетках происходит не во всех вариантах нарушения биосинтеза эргостерина, возможно, индукция системы МЛУ осуществляется за счет накопления конкретного интермедиата метаболизма, который наравне с чужеродными соединениями способен индуцировать гены

АВС-переносчиков. При этом делеция некоторых генов, например, гена стерин С-5 десатуразы *Erg3p*, препятствует накоплению этого интермедиата.

2. Редокс-регуляция множественной лекарственной устойчивости в клетках дрожжей

У дрожжей активация МЛУ-переносчиков в значительной степени зависит от фактора транскрипции *Pdr1p*. Однако до сих пор остается неясным, существуют ли альтернативные способы регуляции АВС-переносчиков, не связанные с функцией этого транскрипционного фактора. Многие антимикотики, помимо воздействия на свою основную мишень, вызывают окислительный стресс и активацию компенсаторного ответа клетки на этот стресс [110]. Липофильные катионы в высокой концентрации также могут вызывать окислительный стресс в клетках дрожжей *S.cerevisiae* [89]. Взаимная регуляция механизмов защиты от ксенобиотиков и окислительного стресса остается неясной. Мы предположили, что окислительный стресс может быть альтернативным механизмом, который активирует основные АВС- или MFS- транспортеры независимо от основного пути, реализуемого через связывание ксенобиотика с *Pdr1p/Pdr3p*. Чтобы проверить вклад этих путей в механизм МЛУ, мы изучили активацию основных переносчиков с широкой субстратной специфичностью в клетках дрожжей *C. glabrata*. Мы исследовали изменения лекарственной резистентности клеток дрожжей *C.glabrata* в ответ на антиоксиданты и прооксиданты, добавленные в среду инкубации. Выбор этого вида дрожжей в качестве исследования был обусловлен двумя факторами: (1) *C.glabrata*, в отличие от *S.cerevisiae* входит в список наиболее распространенных возбудителей грибковых инфекций у человека и потому исследования на этом объекте имеют повышенную прикладную значимость. (2) При этом, клетки *C.glabrata* значительно более устойчивы к перекиси водорода [126]. Эту особенность дрожжей *C.glabrata* связывают с тем, что они, будучи факультативно-патогенным микроорганизмом, часто сталкиваются с

окислительным стрессом, который является естественным механизмом защиты многоклеточных организмов от микробной инфекции. В качестве прооксиданта в наших исследованиях мы взяли перекись водорода, в качестве антиоксиданта — альфа-токоферол. Кроме того, мы сравнивали активацию МЛУ в клетках *C.glabrata*, обработанных липофильным катионом (C_{12} TPP) и обработанных липофильным катионом, конъюгированным с антиоксидантом (SkQ1, пластохинонил-децилтрифенилфосфоний). Эти два соединения часто используют как контрольную и опытную группу соединений, чтобы различить антиоксидантное SkQ1 — митохондриально-адресованного антиоксиданта — и побочные действия, не связанные с наличием в составе липофильного катиона редокс-группы.

2.1 Липофильные катионы - субстраты и конкурентные ингибиторы основных ABC-переносчиков дрожжей *C.glabrata*

Мы сравнили действие липофильных катионов C_{12} TPP и SkQ1, обладающего антиоксидантными свойствами, в качестве субстратов и конкурентных ингибиторов МЛУ-переносчиков в клетках условно-патогенных дрожжей *C.glabrata*. Геном этих дрожжей содержит только одну копию гена транскрипционного фактора *PDR1*, который гомологичен генам транскрипционных факторов *PDR1* и *PDR3* в *S.cerevisiae* [151], а ген PDR-переносчика *CDR1* является гомологом гена основного PDR-переносчика *S.cerevisiae* — *PDR5*. Мы измерили относительную скорость роста клеток дрожжей в суспензии после добавления к ним липофильных катионов в различных концентрациях. В наших экспериментах делеция генов *PDR1* и *CDR1* увеличивали чувствительность клеток к липофильным катионам (Рисунок 24).

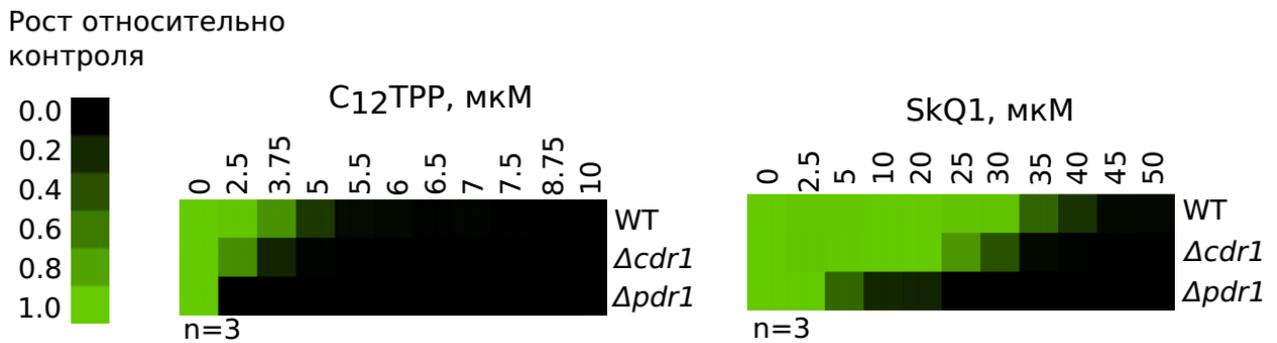


Рисунок 24. Липофильные катионы C₁₂TPP и SkQ1 являются субстратами PDR-транспортеров в клетках дрожжей *C.glabrata*. Рост клеток штаммов $\Delta cdr1$ и $\Delta pdr1$ *C.glabrata* прекращается при более низких концентрациях C₁₂TPP и SkQ1 по сравнению с диким типом. Цветовая карта отражает рост дрожжевых клеток в 96-луночной планке (время икубации 24 часа) относительно контроля.

В связи с тем, что липофильные катионы являются субстратами дрожжей *S.cerevisiae*, а делеция генов *PDR1* и *CDR1* увеличивает токсичность этих соединений в случае клеток *C.glabrata*, мы заключили, что в клетках *C.glabrata* липофильные катионы являются субстратами МЛЮ-переносчиков, экспрессия генов которых регулируется *PDR1*. Интересно, что эффект от делеции *PDR1* был более выражен, чем в случае делеции гена *CDR1*. Это косвенно указывает на то, что липофильные катионы не являются эксклюзивными субстратами Cdr1p, а в клетках *C.glabrata* есть и другие гены, которые регулируются *PDR1* и вносят вклад в защиту от C₁₂TPP.

Чтобы проверить, будет ли прединкубация клеток *C.glabrata* с липофильными катионами препятствовать накоплению других субстратов, мы использовали разработанный нами на клетках *S.cerevisiae* подход для оценки активности МЛЮ-переносчиков по уровню накопления в клетках Нильского красного. Как и в случае *S.cerevisiae*, клетки штамма с делецией транскрипционного фактора *PDR1* сами по себе накапливают больше Нильского красного, по сравнению с контролем (Рисунок 25).

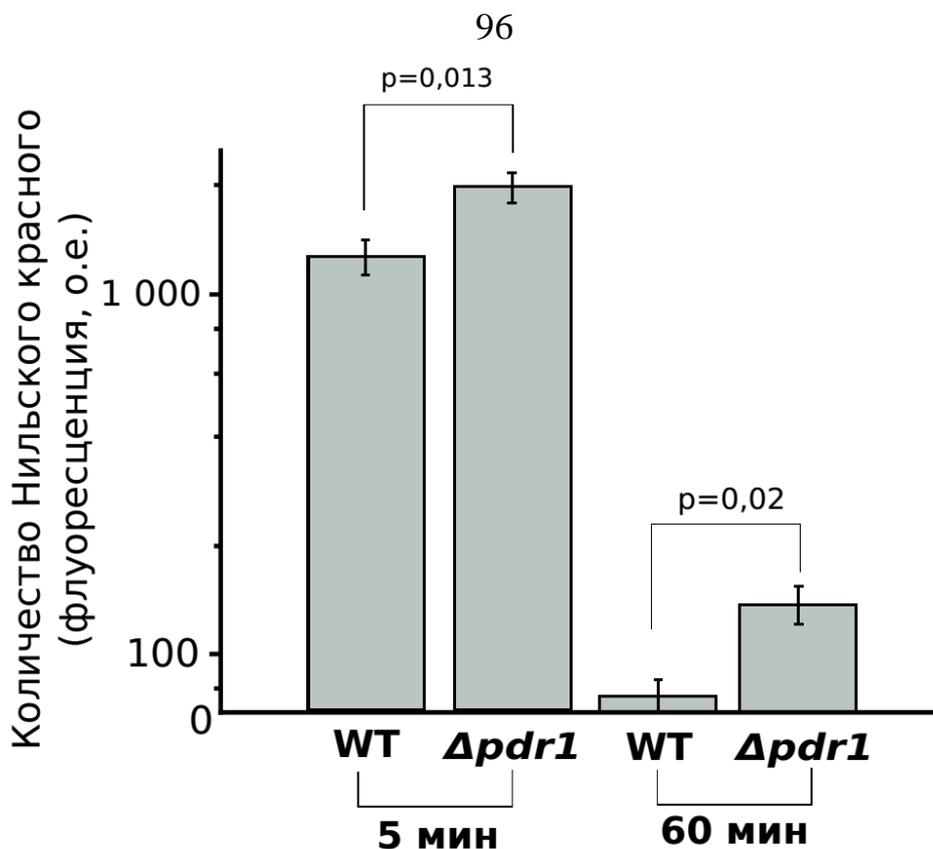


Рисунок 25. Содержание Нильского красного (7 мкМ) в клетках штамма $\Delta pdr1$ выше по сравнению с контролем (WT - дикий тип) как после 5 минут, так и после 60 минут инкубации. Столбцы показывают среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n = 6). Значения P value для сравнения с диким типом были рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни.

С одной стороны, разницу в накоплении красителя можно объяснить неспособностью клеток штамма $\Delta pdr1$ эффективно откачивать Нильский красный из-за низкой активности МЛЮ-переносчиков. Этот результат указывает на то, что Нильский красный как и липофильные катионы является субстратом МЛЮ-переносчиков в клетках *C.glabrata*. С другой стороны, нельзя не заметить, что спустя час концентрация Нильского красного существенно снижается даже в клетках штамма $\Delta pdr1$. Это свидетельствует о том, что в клетках *C.glabrata* есть механизмы, обеспечивающие снижение Нильского красного в цитоплазме, независимо от *PDR1*.

Используя внутриклеточную концентрацию Нильского красного через 5 минут инкубации в качестве индикатора активности АВС-транспортеров, мы определили состояния ингибирования и активирования МЛЮ-транспортеров после прединкубации клеток *C.glabrata* с липофильными

катионами. Также как и в системе с клетками *S.cerevisiae* для изучения липофильных катионов в качестве конкурентных ингибиторов мы добавляли вещества одновременно с Нильским красным, а для оценки индукции МЛУ по средствам липофильных катионов Нильский красный добавляли после часа инкубации клеток с ксенобиотиками (Рисунок 15В). Высокие концентрации липофильных катионов увеличивали накопление Нильского красного в клетках (Рисунок 26В, С). В отсутствие ксенобиотиков, помимо основного пика окрашенных клеток, мы также наблюдали небольшую популяцию клеток с относительно низким содержанием Нильского красного, которая накапливала Нильский красный при добавлении $C_{12}TPP$ (Рисунок 26А). Преинкубация клеток с $C_{12}TPP$ и SkQ1 в течении часа препятствовала накоплению Нильского красного (Рисунок 26В, D, E). В данных экспериментах в качестве контроля мы использовали азольный антимикотик миконазол (2,5 мкМ).

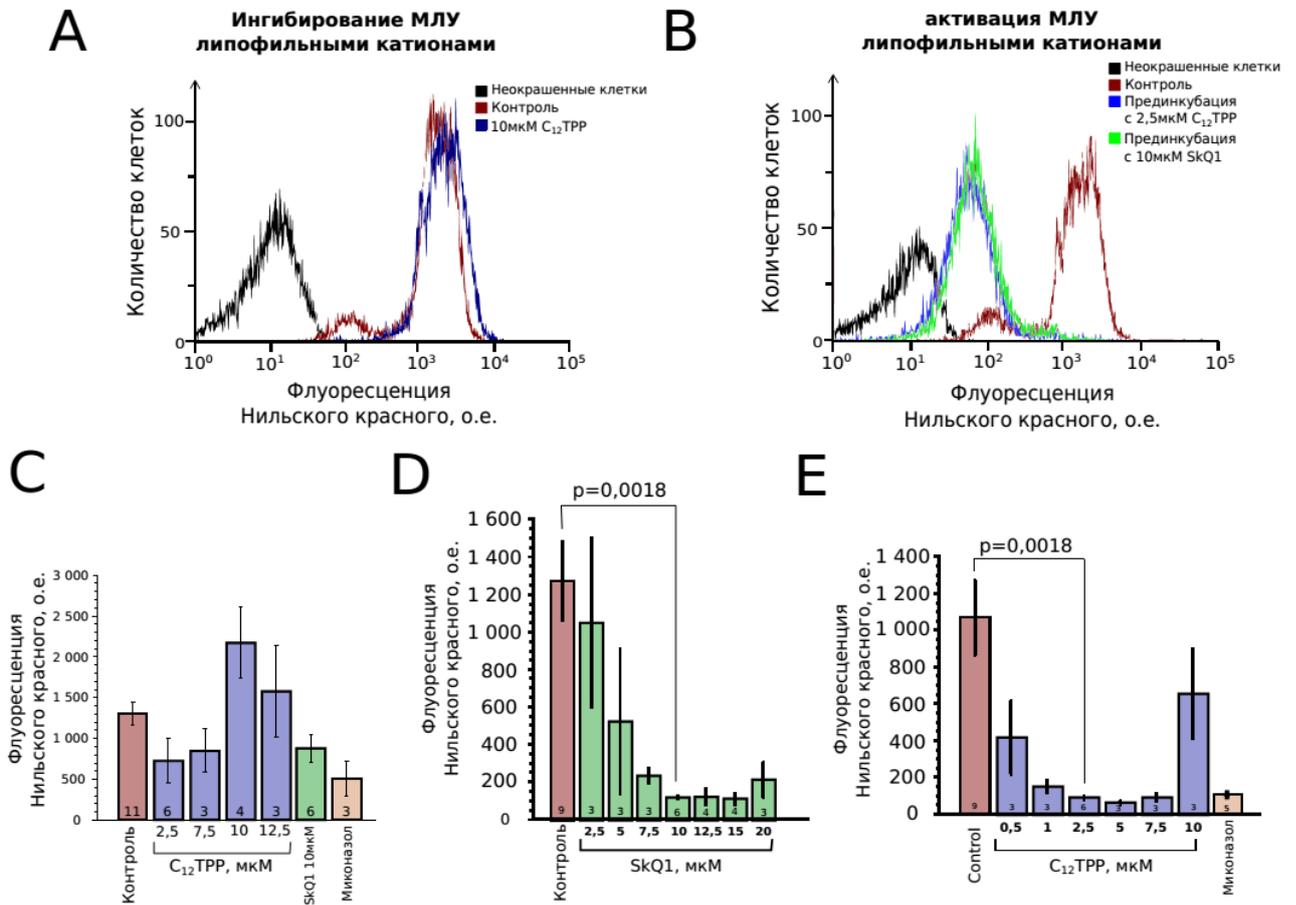


Рисунок 26. Липофильные катионы сначала снижают, а потом увеличивают количество субстрата МЛУ-переносчиков Нильского красного в клетках *C. glabrata* в зависимости от времени инкубации. (А, В) Репрезентативные картинки опытов проточной цитофлуорометрии: (А) одновременное добавление C₁₂TPP (10 мкМ) и Нильского красного (7 мкМ) увеличивает накопление красителя в клетках по сравнению с контролем (В) прединкубация клеток (1 час) с C₁₂TPP (2,5 мкМ) или SkQ1 (10 мкМ) снижает количество Нильского красного в клетках (С) Количественный анализ данных проточной цитофлуорометрии по ингибированию МЛУ-переносчиков различными концентрациями C₁₂TPP, SkQ1 (10 мкМ) и миконазолом (2,5 мкМ); (D, E) Количественный анализ данных проточной цитофлуорометрии по активации МЛУ различными концентрациями C₁₂TPP, SkQ1 и миконазолом (2,5 мкМ). Столбцы отражают среднее количество Нильского красного ± стандартное отклонение. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов. Значения P value для сравнения с диким типом были рассчитаны согласно критерию Манна-Уитни.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что оба изученных липофильных катиона являются сначала способствующими, а потом препятствующими накоплению Нильского красного в клетках. В совокупности с нашими данными об увеличенной токсичности липофильных катионов для

штаммов, с делецией *CDR1* или *PDR1* (Рисунок 24), мы предполагаем, что липофильные катионы являются конкурентными ингибиторами МЛЮ-переносчиков в клетках *C.glabrata*, однако с течением времени вызывают компенсаторный ответ — транскрипционную или посттранскрипционную активацию АВС-переносчиков с широкой субстратной специфичностью. Как и в случае *S.cerevisiae* вклад активирующего и ингибирующего эффектов зависит от времени инкубации клеток с ксенобиотиками.

2.2 Антиоксиданты препятствуют активации МЛЮ в клетках *C.glabrata* с делецией гена *CDR1*

Чтобы определить, какой из АВС-транспортеров вносит основной вклад в откачивание Нильского красного при активации МЛЮ под действием липофильных катионов, мы оценили концентрацию данного красителя в клетках штаммов с делециями основных переносчиков с широкой субстратной специфичностью $\Delta cdr1$, $\Delta cdr2$, $\Delta snq2$ и в клетках штамма $\Delta pdr1$. Часовая прединкубация с липофильными катионами вызывала активацию МЛЮ и снижение количества Нильского красного в клетках всех исследуемых нами штаммов (Рисунок 27В). Однако, мы обратили внимание, что в штамме $\Delta cdr1$ добавление к клеткам SkQ1 индуцирует МЛЮ значительно слабее в сравнении с $C_{12}TPP$ (Рисунок 27А, В). Более того, оба соединения снижали количество Нильского красного в клетках штамма $\Delta pdr1$ (Рисунок 27В). Эти результаты дали нам основание предположить наличие в клетках *C.glabrata* механизма активации МЛЮ, который не зависит от транскрипционного фактора Pdr1p и АВС-переносчика Cdr1p.

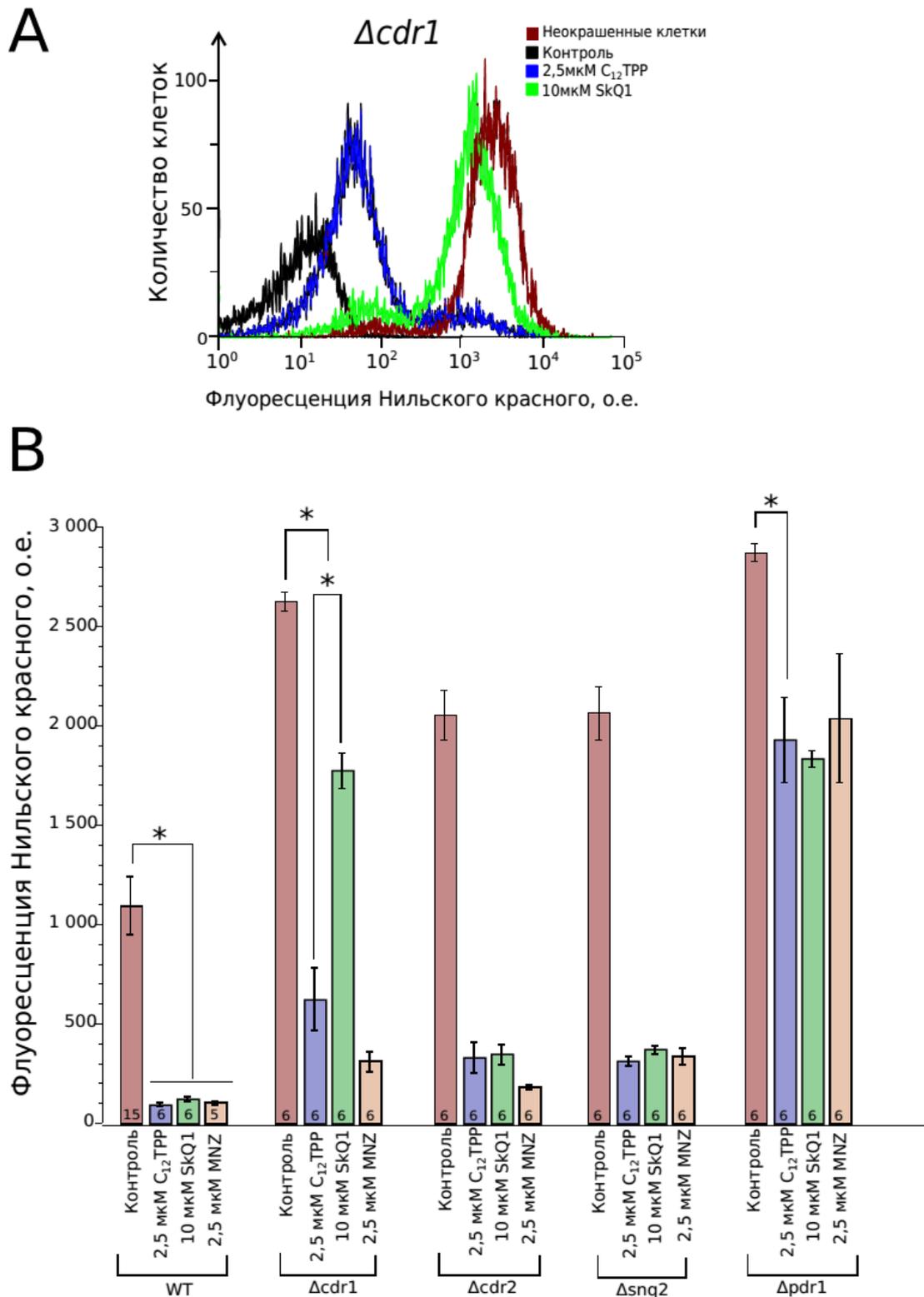


Рисунок 27. Антиоксидант SkQ1 снижает уровень активации МЛУ в клетках штамма *Δcdr1* *C.glabrata*. (A) Столбчатая диаграмма отражает средние значения флуоресценции Нильского красного, полученные методом проточной цитометрии на клетках штамма *Δcdr1* после прединкубации с C₁₂TPP и SkQ1. (B) Активация МЛУ в клетках дикого типа (WT) и в клетках штаммов *Δcdr1*, *Δcdr2*, *Δsnq2* и *Δpdr1* под действием C₁₂TPP и SkQ1. Количество независимых повторов для каждой пробы указано в основании столбцов. *P value < 0.006 согласно непарному статистическому критерию Манна-Уитни.

C_{12} TPP часто используют в качестве контроля в экспериментах с SkQ1 для разделения антиоксидантных и неспецифических эффектов этого соединения [152]. Чтобы проверить, объясняется ли снижение эффективности активации МЛУ наличием редокс-группы в составе молекулы SkQ1, мы оценили количество Нильского красного в клетках штамма $\Delta cdr1$ после 1 часа инкубации с C_{12} TPP в присутствии и отсутствии антиоксиданта альфа-токоферола. Добавление к клеткам альфа-токоферола частично препятствовало активации МЛУ под действием C_{12} TPP в штамме $\Delta cdr1$ (Рисунок 28В, С), но не в диком типе (Рисунок 28А, С).

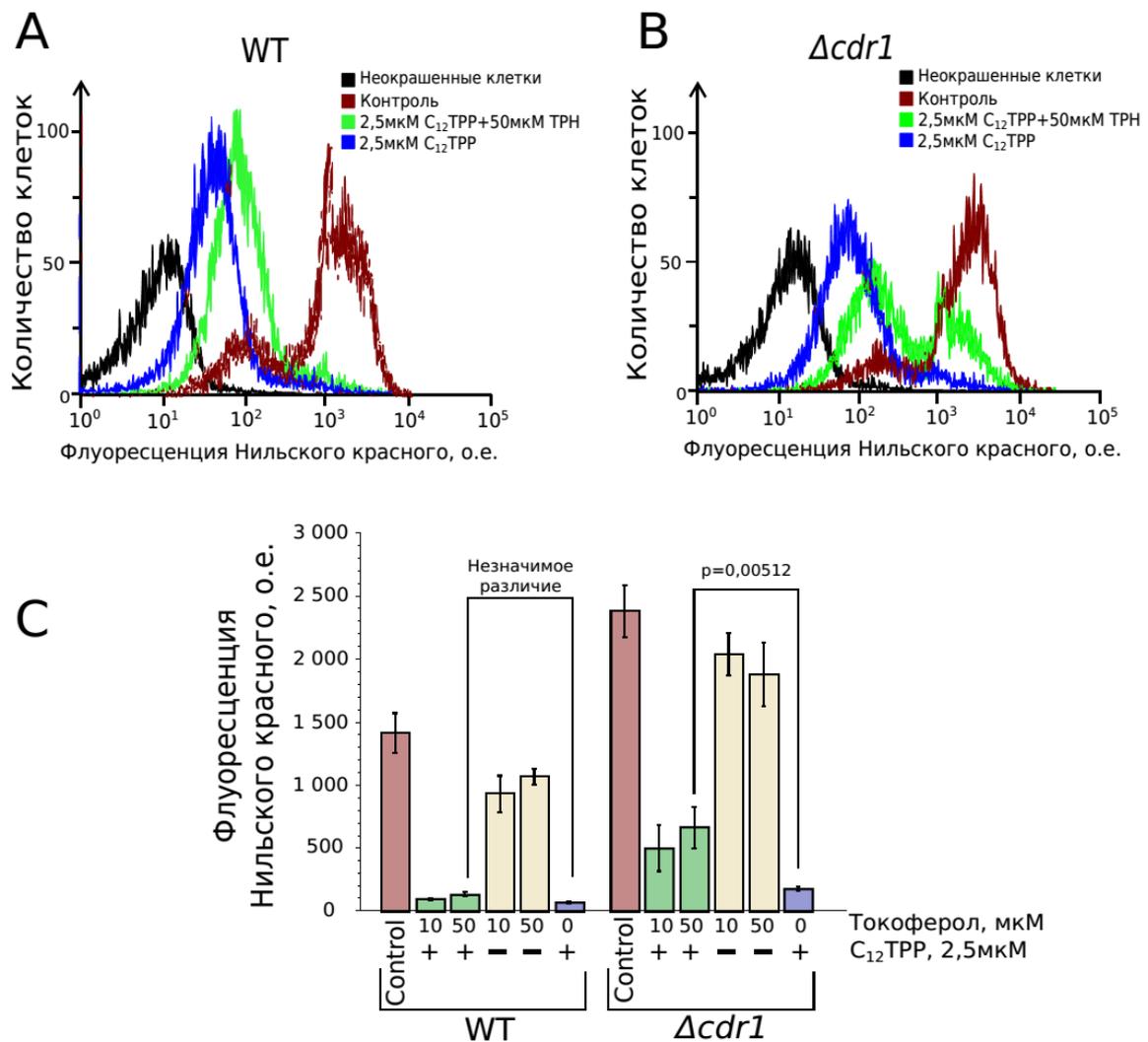


Рисунок 28. Антиоксидант токоферол снижает уровень активации МЛУ в клетках штамма $\Delta cdr1$ *S. glabrata*. (А, В) Гистограмма опыта проточной цитофлуориметрии с клетками дикого типа (А) и клетками штамма $\Delta cdr1$ (В) по прединкубации с C_{12} TPP в присутствии альфа-токоферола и без него. (С) Количественный анализ данных проточной цитофлуориметрии для опытов, соответствующим А и В (n=6). Р value рассчитано согласно непарному статистическому критерию Манна-Уитни.

Таким образом, в наших экспериментах два различных антиоксиданта: пластохинон в составе липофильного катиона и альфа-токоферол ингибировали активацию МЛУ в клетках *C.glabrata*, но в обоих случаях эффект проявлялся только в штамме с делецией гена основного PDR-переносчика *CDR1*.

2.3 Перекись водорода активирует МЛУ в клетках *C.glabrata* независимо от Pdr1p

Поскольку антиоксидант альфа-токоферол ингибировал C_{12} TRP-индуцируемую активацию МЛУ в клетках штамма $\Delta cdr1$ мы предположили, что прооксиданты также могут влиять на уровень активации МЛУ. Чтобы проверить данное предположение, с помощью Нильского красного мы исследовали как прединкубация клеток с перекисью водорода может изменять уровень активности МЛУ в штамме дикого типа и штаммах $\Delta cdr1$ и $\Delta pdr1$. В наших экспериментах, час инкубации клеток с перекисью водорода приводил к увеличению уровня активации МЛУ в клетках всех тестируемых штаммов (Рисунок 29А). При этом концентрации перекиси свыше 2 мМ действовали с одинаковой эффективностью, очевидно, обеспечивая максимально возможный эффект. Более того, 2 мМ перекиси водорода увеличивали эффект активации МЛУ, обеспечиваемый C_{12} TRP (Рисунок 29В).

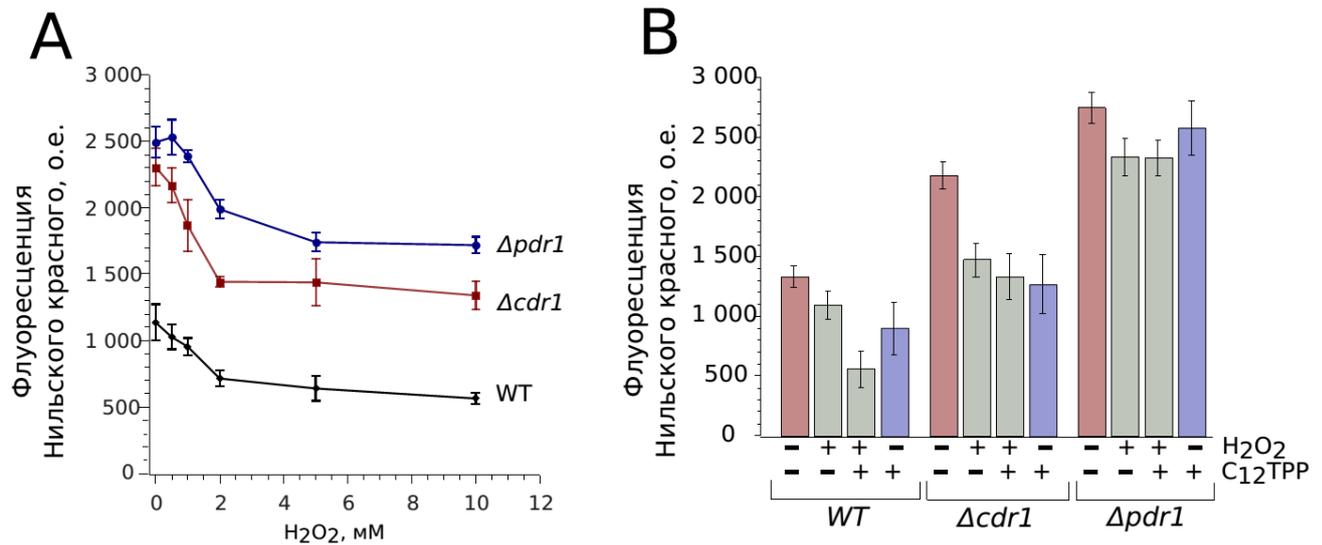


Рисунок 29. Перекись водорода активирует систему МЛЮ. (А) Накопление Нильского красного в клетках дрожжей, проинкубированных 1 час с различными концентрациями перекиси водорода (среднее \pm стандартная ошибка среднего, $n=6$). (В) Перекись водорода (2 мМ) увеличивает активацию МЛЮ, вызванную добавлением 0,5 мкМ $C_{12}TPP$ (среднее \pm стандартная ошибка среднего, $n=6$).

Чтобы подтвердить, что снижение концентрации Нильского красного в клетках *C. glabrata* обусловлено активацией генов МЛЮ-переносчиков, мы измерили в них относительное количество мРНК генов основных переносчиков с широкой субстратной специфичностью. Гены ABC-переносчиков *CDR1*, *CDR2* и *SNQ2* были выбраны в качестве мишеней транскрипционного фактора Pdr1p, а ген MFS-переносчика *FLR1* - в качестве мишени транскрипционного фактора Yap1p, чувствительного к перекиси водорода [120]. Мы обнаружили, что липофильные катионы $C_{12}TPP$ и SkQ1 индуцируют экспрессию генов *CDR1*, *CDR2* и *FLR1* (Рисунок 30), в то время как делеция гена *PDR1* предотвращает увеличение экспрессии *CDR1* и *CDR2*. Перекись водорода оказалась не способна увеличить экспрессию этих генов, но увеличивала экспрессию гена *FLR1*. Важно отметить, что липофильные катионы индуцировали экспрессию *FLR1* как в клетках штамма *Δpdr1*, так и в клетках дикого типа (Рисунок 30D). Это позволяет предположить, что экспрессия гена *FLR1* осуществляется даже в отсутствие Pdr1p.

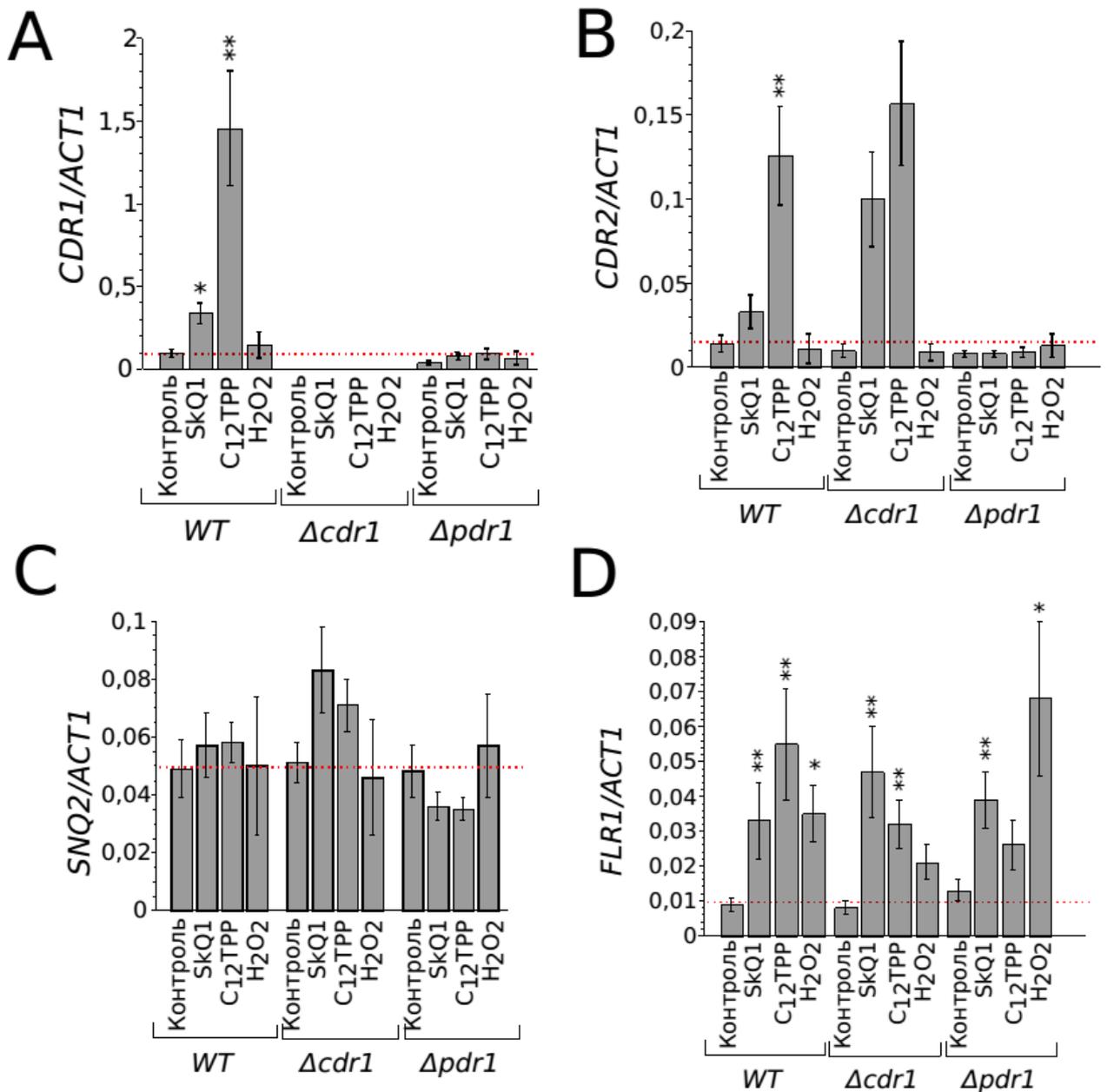


Рисунок 30. Липофильные катионы увеличивают относительное количество мРНК генов основных МЛЮ-переносчиков. Количественный анализ ПЦР в реальном времени для генов (C) *CDR1*; (D) *CDR2*; (E) *SNQ2*; (F) *FLR1*. Все данные по экспрессии мРНК нормировали относительно количества мРНК гена *ACT1*. За 1 принято эквивалентное соотношение мРНК гена мишени к мРНК *ACT1*. Концентрация $C_{12}TPP$ 5 мкМ, SkQ1 12,5 мкМ, H_2O_2 10 mM (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, $n=4-8$). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ согласно непарному критерию Манна-Уитни.

2.4 Исследование влияния липофильных катионов как ингибиторов и активаторов МЛУ-переносчиков на цитостатический эффект азольных антимикотиков.

Поскольку липофильные катионы являются как активаторами, так и ингибиторами МЛУ-переносчиков, они также могут увеличивать, либо снижать минимальные ингибирующие концентрации (МИК) других ксенобиотиков. Мы исследовали выживаемость клеток при совместном добавлении к ним C_{12} TPP либо SkQ1 и азольного антимикотика миконазола. Мы обнаружили, что C_{12} TPP, в отличие от SkQ1, ингибирует цитостатический эффект антимикотика как в клетках дикого типа, так и в штамме $\Delta cdr1$ (Рисунок 31А). Более того, в нетоксичных концентрациях SkQ1 увеличивал токсичность миконазола (Рисунок 31В).

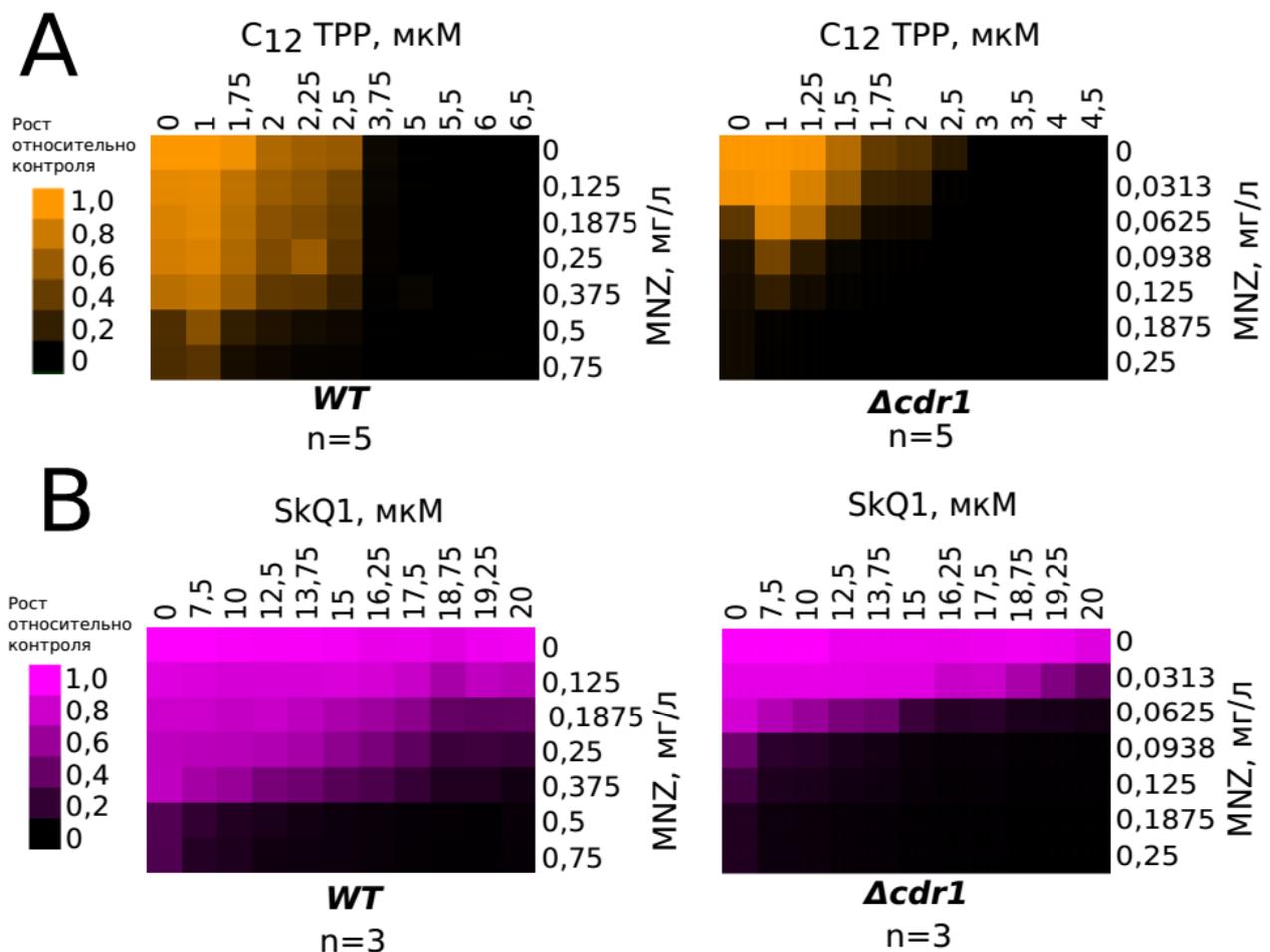


Рисунок 31. SkQ1 ингибирует активацию МЛУ, вызванную добавлением миконазола, и увеличивает его цитостатический эффект. Относительный рост клеток при совместной инкубации (А) C_{12} TPP с миконазолом (MNZ) и (В) SkQ1 с миконазолом (MNZ).

С помощью проточной цитометрии мы исследовали эффект совместного добавления к клеткам SkQ1 и миконазола на уровень активации МЛЮ (Рисунок 32). Мы обнаружили, что подобная прединкубация препятствует накоплению Нильского красного как в клетках дикого типа, так и в клетках штамма $\Delta cdr1$. Это значит, что в клетках данных штаммов SkQ1 препятствует активации МЛЮ под действием миконазола. В то же время, в клетках штамма $\Delta pdr1$ наблюдаемый эффект был менее выражен.

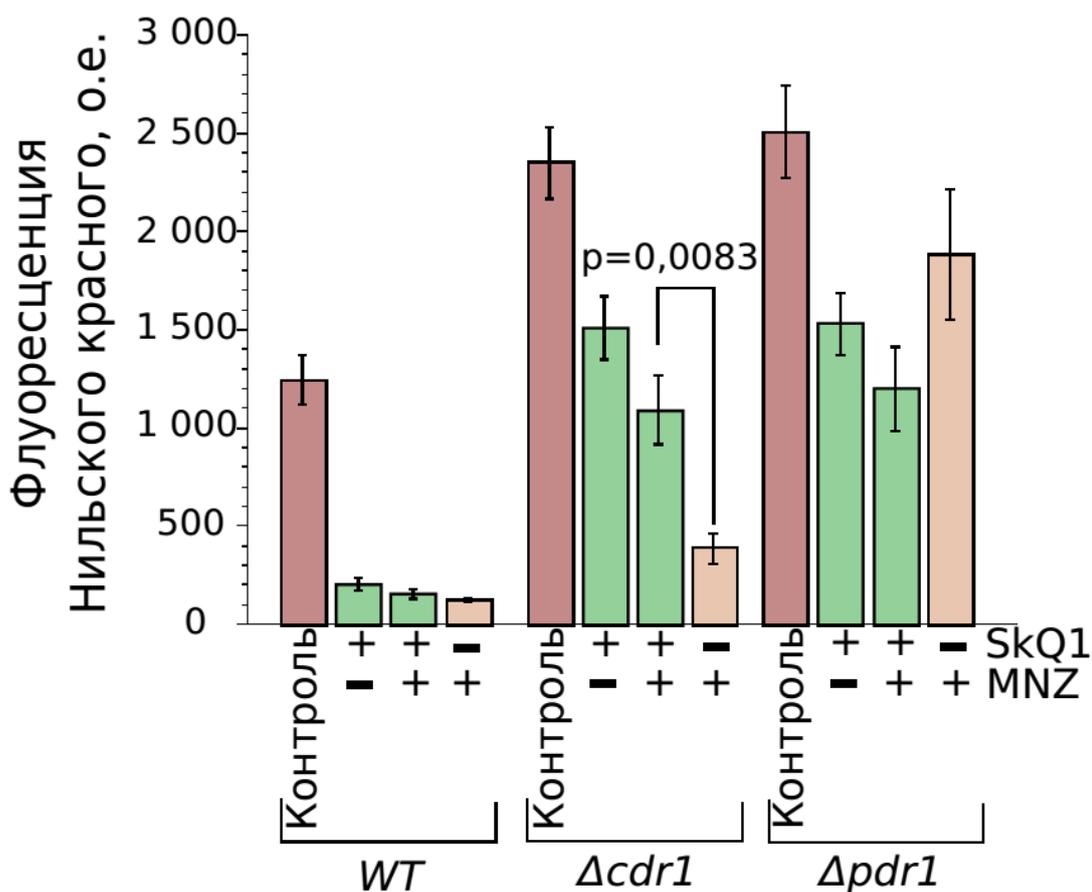


Рисунок 32. Активация МЛЮ в клетках дикого типа и клетках с делециями PDR генов. Клетки *C. glabrata* инкубировали с SkQ1 (10 мкМ) и/или с миконазолом (MNZ, 2,5 мкМ) (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, $n=6$). P value указано согласно непарному критерию Манна-Уитни.

Данные результаты указывают на то, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1, в отличие от $C_{12}TPP$, не способен к увеличению устойчивости дрожжевых клеток к азольным антимикотикам. Более того, добавление SkQ1 ингибировало стимулируемую миконазолом активацию МЛЮ в клетках штамма $\Delta cdr1$ (Рисунок 32).

Мы предположили, что именно антиоксидантные свойства SkQ1 обеспечивают данному соединению возможность предотвращать активацию МЛУ в клетках дрожжей. Следуя этой идее, мы исследовали эффекты другого антиоксиданта - альфа-токоферола на возможность ингибировать активацию МЛУ-переносчиков. Однако при совместной инкубации с миконазолом альфа-токоферол, в отличие от SkQ1, не оказывал влияния на токсичность антимикотика (Рисунок 33А). Альфа-токоферол также не предотвращал выкачивание Нильского красного из клеток штамма дикого типа и *Δcdr1*, а значит не препятствовал активации МЛУ-переносчиков под действием миконазола (Рисунок 33В).

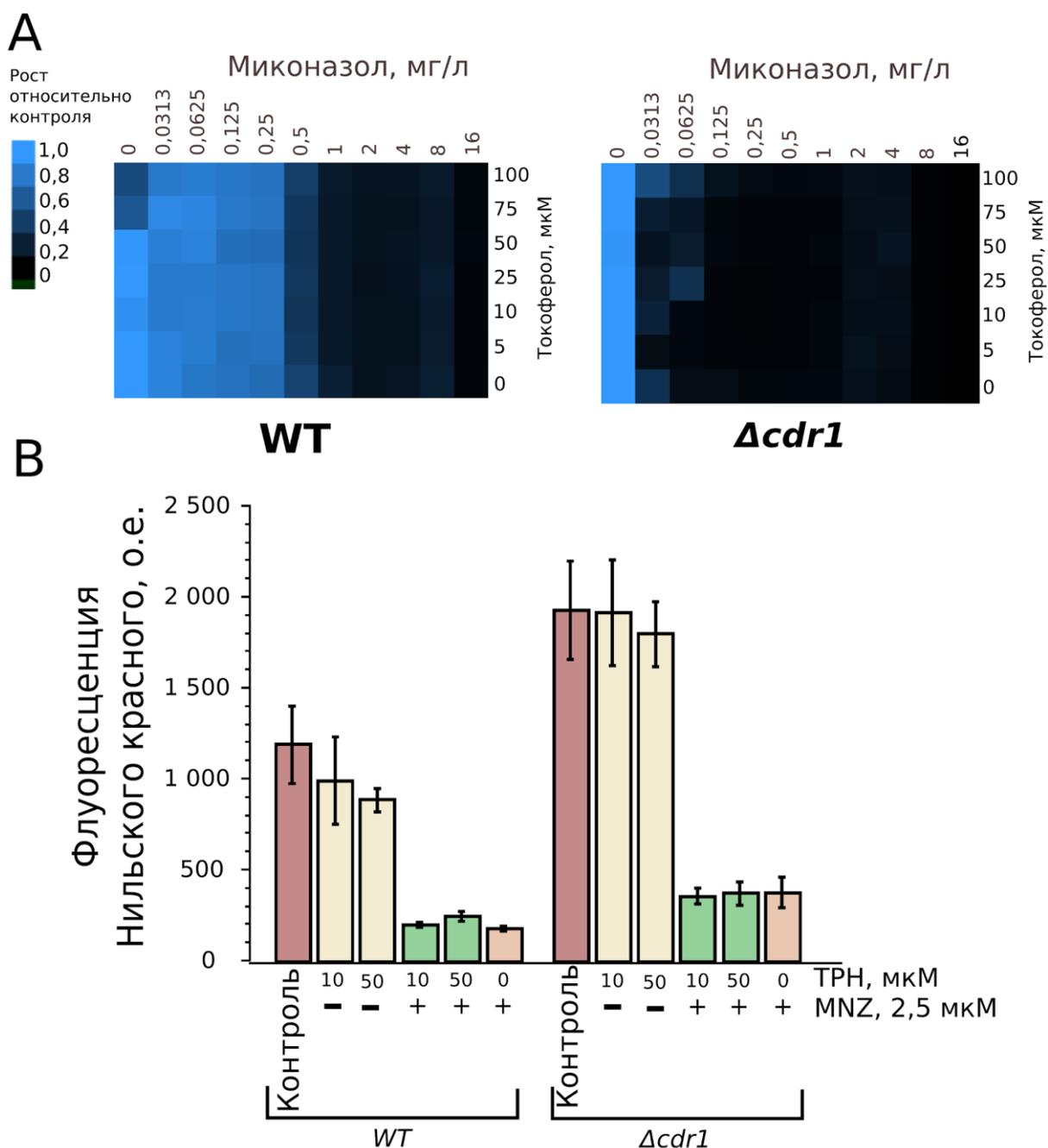


Рисунок 33. (А) альфа-токоферол (ТФН) не влияет на цитостатический эффект миконазола (MNZ) (В) Активация МЛЮ в *C.glabrata* клетках дикого типа (WT) и в клетках с делецией *CDR1*, обработанных альфа-токоферолом (ТФН) и/или миконазолом (MNZ). Значения столбцов соответствуют среднему значению флуоресценции Нильского красного \pm стандартная ошибка среднего, $n=5$.

С чем может быть связано различие в действиях антиоксидантов на механизм активации МЛЮ и устойчивость клеток к миконазолу? SkQ1 — митохондриально-направленное соединение, в то время как токоферол локализуется в цитоплазме. В этом случае препятствование активации МЛЮ за счет SkQ1 может косвенно указывать на роль митохондрии в активации

механизма МЛУ за счет редокс-регуляции. Однако наши данные не позволяют исключить и другие интерпретации: например, разную антиоксидантную активность SkQ1 и альфа-токоферола.

Регуляция активности МЛУ-переносчиков в штамме с делецией *CDR1* перекисью водорода и антиоксидантами, позволяет предположить наличие дополнительной петли отрицательной обратной связи, которая активируется в клетках в ответ на окислительный стресс и приводит к дополнительной активации МЛУ-переносчиков. В этом случае, эффективное откачивание ксенобиотика клетках дикого типа не позволяет нам детектировать данный путь регуляции в контроле. Однако наличие этого второго пути показывает вырожденность и, следовательно, высокую надежность систем регуляции генов, высокая экспрессия которых придает клетке множественную лекарственную устойчивость.

3. Исследование роли белков митохондриальной динамики в активация МЛУ.

Некоторые опубликованные работы косвенно указывают на взаимосвязь между процессами слияния и деления митохондрий и возникновением МЛУ у дрожжей. Так, с одной стороны, было показано, что нарушение гена митохондриальной GTP-азы *FZO1* (митофузин дрожжей) приводит к активации МЛУ [62]. С другой стороны, активация транскрипционных факторов Pdr1/3p предотвращает потерю мтДНК в штаммах дрожжей с нарушением механизма слияния митохондрий [128]. Данный эффект можно было бы объяснить тем, что ABC-переносчики с широкой субстратной специфичностью выбрасывают из клетки какое-либо вещество, регулирующее процессы слияния или деления митохондрий. Возможно и альтернативное объяснение: повышенная активность ABC-переносчиков сопряжено с избыточными затратами энергии клеткой [37]. Это, в свою очередь, может оказывать существенное влияние на соотношение активности процессов слияния и деления митохондрий.

Мы предположили, что изменение уровня экспрессии генов основных АВС-переносчиков дрожжей повлияет на структуру митохондриальной сети. С помощью митохондриально-направленных красителей (TMR, Mitotracker Green) мы визуализировали митохондрии и исследовали их морфологию в клетках штаммов *S.cerevisiae* с репрессией/сверхэкспрессией основных АВС-транспортеров. Мы показали, что ни репрессия, ни повышенная экспрессия генов *PDR5*, *YOR1*, *SNQ2* не приводит к значительным изменениям структуры митохондриальной сети. Соотношение клеток с той или иной степенью слияния митохондриального ретикулума в популяции клеток этих штаммов значимо не отличалось от контроля (*W303*) (Рисунок 34). Кроме этого, мы показали, что делеция генов *PDR1* и *PDR3* не влияет на структуру митохондриального ретикулума.

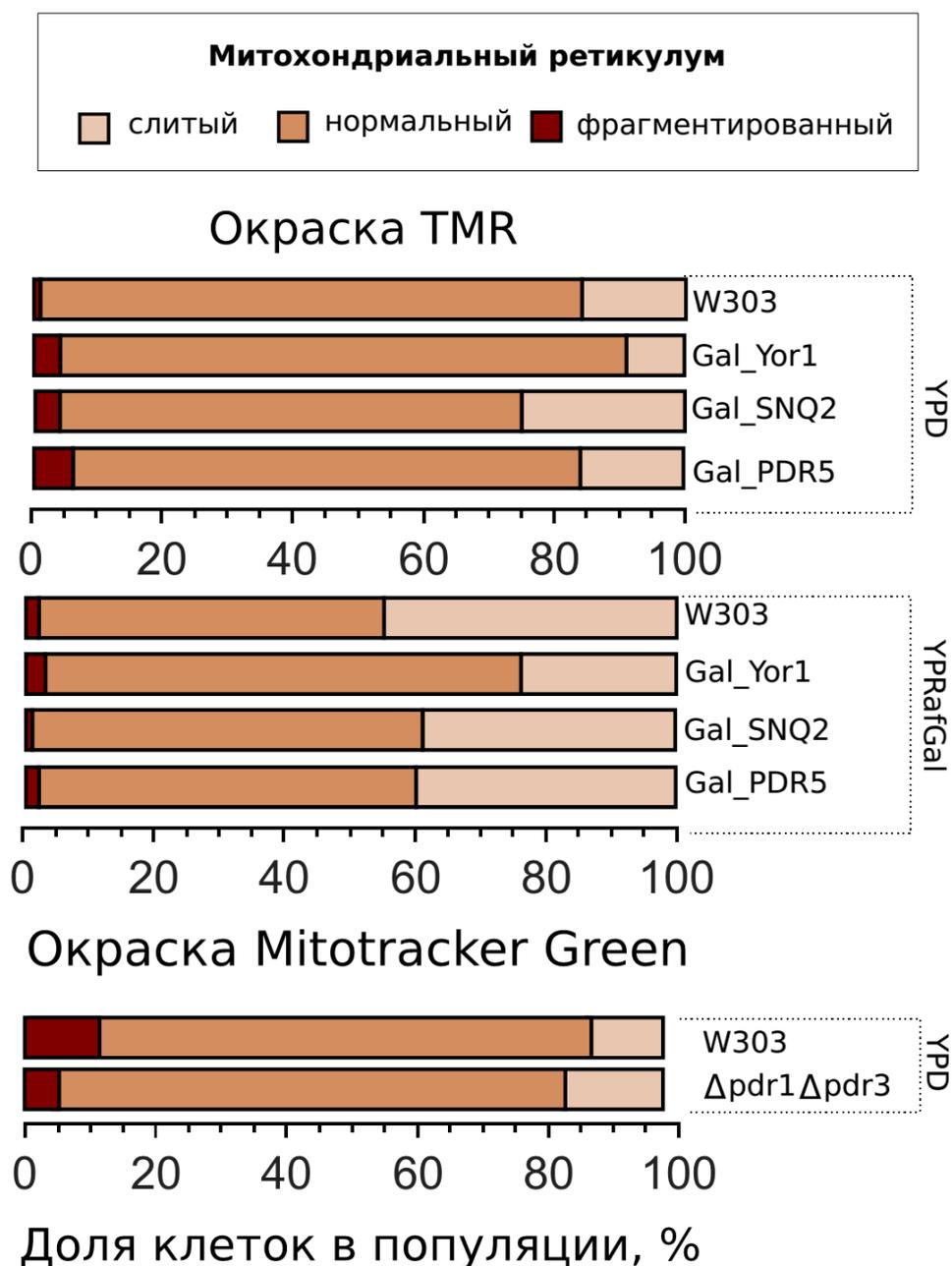


Рисунок 34. Морфология митохондрий в клетках с репрессией (среда YPD) и сверхэкспрессией (среда YPRafGal) основных ABC-переносчиков не отличается от контроля (*W303*). На гистограмме представлено распределение клеток в популяции по морфологии митохондриального ретикулума (см материалы и методы). В каждом образце было проанализировано 100-200 клеток.

Чтобы оценить чувствительность, разработанного нами подхода по оценке морфологии митохондриального ретикулума к уже известным воздействиям на митохондриальную динамику, мы исследовали изменения структуры митохондриальной сети в клетках, обработанных *mdivi-1* —

ингибитором белка Dnm1p, обеспечивающего деление митохондрий [153]. Чтобы визуализировать митохондрии без добавления красителей мы создали штамм, в котором белок с локализацией в митохондриальном матриксе изоцитратдегидрогеназа Idh1 соединен с GFP. Недавно было показано, что mdivi-1 плохо ингибирует Drp1p, гомолог Dnm1p млекопитающих. Более того, оказалось, что mdivi-1 оказывает воздействие на комплекс I дыхательной цепи, блокируя его работу [154]. Однако, в том же исследовании было показано, что mdivi-1 эффективно ингибирует гидролиз GTP дрожжевым белком Dnm1p. Таким образом, учитывая, что пекарские дрожжи не имеют протон-транслоцирующего комплекса I дыхательной цепи, mdivi-1 все еще может применяться в дрожжах в качестве ингибитора процесса слияния митохондрий. Мы обнаружили, что добавление mdivi-1 приводит к появлению большого количества клеток со слитыми митохондриями (Рисунок 35). В то же время, добавление разобщителя FCCP частично препятствовало действию mdivi-1.

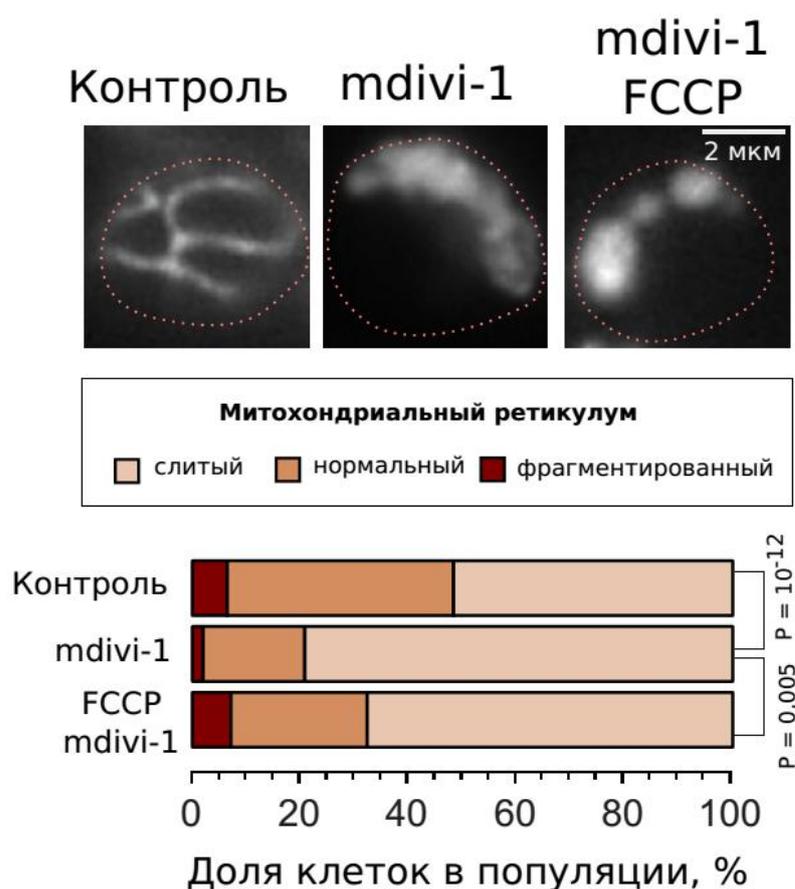


Рисунок 35. *m-divi* индуцирует слияние митохондрий. Клетки штамма *Idh1-GFP* растили на среде YPRaf и инкубировали с *m-divi* (60 мкМ) или с *m-divi* + FCCP (5 мкМ) 1 час. К контрольному образцу клеток добавляли соответствующее количество растворителя (0,5% этанола+0,6% DMSO). В каждом образце было проанализировано более 200 клеток. P value рассчитывали с помощью хи-квадрата Пирсона.

Таким образом, нам удалось разработать эффективный подход по количественной оценке морфологии митохондриального ретикулума в популяции клеток. Однако, наши эксперименты со штаммами, с репрессированными генами ABC-переносчиков не подтвердили данные работы Mutlu и соавторов, на основании которой было сделано предположение о том, что активность ABC-переносчиков может косвенно влиять на митохондриальную динамику. Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии прямой зависимости между структурой митохондриальной сети в клетке и активностью ABC-переносчиков с широкой субстратной специфичностью.

Обсуждение

В данной работе мы исследовали принципы регуляции множественной лекарственной устойчивости на примере клеток дрожжей, подвергнутых воздействию липофильных катионов. Мы обнаружили, что в зависимости от времени инкубации липофильные катионы могут играть роль как индукторов, так и конкурентных ингибиторов ABC-переносчиков. При этом, активация системы МЛУ происходит за счет стимуляции экспрессии генов основных ABC-переносчиков на уровне транскрипции. Ключевую роль в этом процессе играет транскрипционный фактор Pdr1p, в то время как Pdr3p, по-видимому, не является необходимым. В тоже время, делеция генов, кодирующих белки ретроградной сигнализации (Rtg и Yap1p) и репрессия гена основного АТФ/АДР-антипортера *PET9* не предотвращали активацию системы МЛУ под действием липофильных катионов. Эти данные позволяют предположить, что митохондриальная сигнализация, по-видимому, не играет существенной роли в активации МЛУ, вызванной липофильными катионами.

В наших экспериментах, деполяризация митохондрий, препятствующая накоплению липофильных катионов в митохондрии, также не предотвращала C_{12} ТРР-индуцируемой активации МЛУ. Очевидно, что большинство токсичных веществ, попадая в клетку активируют систему внутриклеточной защиты, запуская механизм МЛУ. Однако, логично предположить, что подобная способность к активации системы МЛУ существует лишь в определенном диапазоне концентраций. Так, избыток токсина может приводить к истощению энергетических ресурсов клетки и, тем самым, предотвращать активацию МЛУ на уровне транскрипции или трансляции. В тоже время, небольшого количества токсина может оказаться недостаточно для его детекции белками-активаторами МЛУ. Исходя из данной логики, мы предполагали существование относительного узкого диапазона концентраций, в котором липофильный катион C_{12} ТРР будет накапливаться в митохондриях и не будет приводить к активации системы МЛУ. Несмотря на то, что поставленные нами эксперименты не исключают полностью эту

возможность, мы показали, что деполяризация митохондрий снижает эффективность накопления липофильных катионов в митохондриях, но не приводит к увеличению содержания Pdr5-GFP в клетках в присутствии относительно низких концентраций C_{12} TRP (1 мкМ). При этом, в тех же условиях деполяризации митохондрий за счет добавления ингибитора дыхательной цепи миксотиазола и ингибитора АТФ-синтазы олигомицина А азольный антимикотик клотримазол активирует МЛУ.

В данной работе мы показали необходимость наличия в клетках функционального гена транскрипционного фактора Pdr1p для активации МЛУ под действием C_{12} TRP. Каким образом C_{12} TRP взаимодействует с Pdr1p? Одним из механизмов индукции Pdr1p является его непосредственное связывание с ксенобиотиком в цитоплазме клетки [1]. Можно предположить, что связывание митохондриально-направленных липофильных катионов с Pdr1p конкурирует с их накоплением в митохондрии. Так, в случае, если сродство C_{12} TRP к Pdr1p достаточно высоко, то C_{12} TRP будет активировать МЛУ даже в присутствии сильно поляризованных митохондрий. Однако, в наших экспериментах, низкая концентрация C_{12} TRP не приводила к накоплению Pdr5-GFP в клетках, следовательно, данное предположение мало вероятно. В тоже время, попадая в клетку ксенобиотики-субстраты МЛУ-переносчиков могут косвенно влиять на активность Pdr1p, конкурентно ингибируя переносчики и, тем самым, препятствуя откачиванию из клетки эндогенных субстратов: например, вторичных метаболитов или интермедиатов биосинтетических путей. Накопление в клетке этих эндогенных субстратов, в свою очередь, будет способствовать их связыванию с Pdr1p и приводить к активации МЛУ. Так, например, есть указания на то, что ABC-переносчики Pdr5 и Snq2 в норме могут экспортировать метаболит, обеспечивающий дрожжевым клеткам в суспензии чувство кворума [155,156]. В случае осуществления клеткой данного механизма регуляции системы МЛУ, локализация C_{12} TRP внутри

клетки уже не будет играть существенной роли для активации экспрессии генов ABC-переносчиков.

Еще одним возможным механизмом активации МЛУ в ответ на добавление липофильных катионов могла бы быть детекция уровня доступной в клетке энергии. Так, например, эффективность связывания белка митохондриального сигнального каскада Rtg2p с белком Mks1p регулируется внутриклеточным АТР [146]. В этом случае, активация работы ABC-переносчиков с помощью митохондриальной ретроградной сигнализации также могла бы регулироваться содержанием АТР в клетке. Однако, в наших экспериментах, делеции гена *RTG2* и других генов белков — участников ретроградной сигнализации не препятствовали C_{12} ТРР-индуцируемой активации МЛУ. Более того, даже предотвращение обмена адениновых нуклеотидов между матриксом митохондрий и цитоплазмой за счет репрессии гена основного АТР/АДР-антипортера *PET9* не предотвращало активации системы МЛУ под действием липофильных катионов.

В тоже время, добавление к клеткам *C.glabrata* перекиси водорода приводило к активации Yap1p-зависимого MFS-переносчика *FLR1*. При этом добавление перекиси водорода дополнительно повышало уровень активации МЛУ, индуцированного C_{12} ТРР. Антиоксидант SkQ1, в свою очередь, напротив, снижал уровень активации МЛУ и способствовал увеличению цитостатического эффекта миконазола на фоне делеции гена основного ABC-переносчика *CDR1*. Каким образом ген ABC-транспортера *CDR1* может способствовать детекции ксенобиотика или активации МЛУ? Мы предполагаем, что в штамме дикого типа основная петля отрицательной обратной связи, включающая в себя Cdr1p, препятствует накоплению ксенобиотика в клетке и, тем самым, делает вклад других регуляторных механизмов не существенным (Рисунок 36). Однако в клетках с делецией гена *CDR1* роль альтернативных механизмов становится более выраженной.

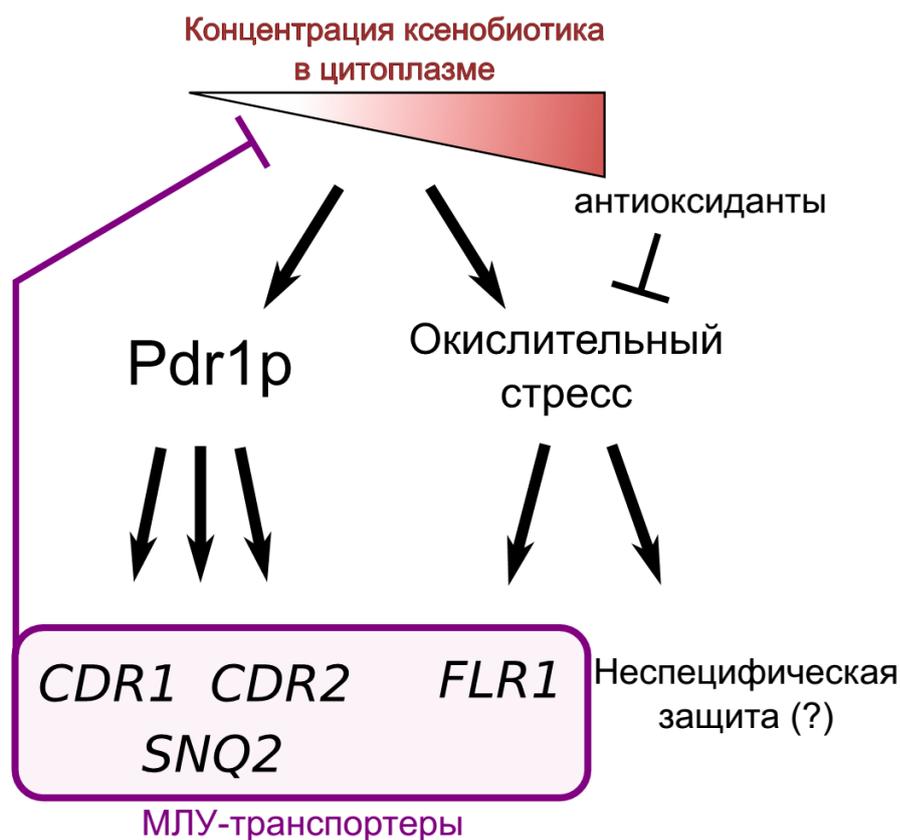


Рисунок 36. Предполагаемая схема активации системы МЛУ в дрожжах *C. glabrata*. Увеличение концентрации ксенобиотика в цитоплазме клеток стимулирует экспрессию генов основных АВС-переносчиков и препятствует его последующему накоплению. Совместно система детекции и откачивания чужеродного соединения формируют петлю отрицательной обратной связи. Делеция гена основного АВС-переносчика *CDR1* проявляет дополнительную петлю регуляции МЛУ, активирующуюся в клетках в ответ на эндогенный окислительный стресс.

Мы предполагаем, что накопление ксенобиотика в клетке сверх определенного порога концентрации необходимо для активации дополнительного редокс-регулируемого пути возникновения МЛУ. Действительно, мы наблюдали активацию экспрессии гена МФС-транспортера *FLR1* под воздействием C_{12} TPP и SkQ1 в клетках штамма $\Delta pdr1$. Мы ожидали, что антиоксидантные свойства SkQ1 могут снизить уровень экспрессии гена *FLR1*. Тем не менее, мы не обнаружили значимых различий в уровне экспрессии *FLR1* между клетками, обработанными SkQ1 и C_{12} TPP. На первый взгляд эти данные не согласуются с результатами экспериментов по накоплению Нильского красного и выживаемости клеток при совместном

добавлении ксенобиотиков. Данное противоречие можно устранить, предположив существование других генов-мишеней, регулируемых окислительным стрессом. В наших экспериментах добавление митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 предотвращало активацию МЛУ в клетках *C. glabrata* с делецией гена *CDR1* и повышало их чувствительность к азольному антимикотику миконазолу. Наши данные показывают, что это может быть результатом окислительного стресса, вызванного ксенобиотиками. Адаптивный ответ на этот вторичный стресс обеспечивает альтернативный путь активации МЛУ и делает механизмы активации лекарственной устойчивости у дрожжей избыточными.

Выводы

1. Липофильные катионы являются одновременно конкурентными ингибиторами и индукторами множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) в клетках дрожжей *S.cerevisiae* и *C.glabrata*. Ингибирующий и активирующий эффекты разнесены во времени.

2. Додецил-трифенилфосфоний (C_{12} TPP) вызывает транскрипционный ответ, опосредованный Pdr1 и приводящий к активации системы МЛУ дрожжей *S.cerevisiae* независимо от функционирования Rtg-сигнального пути и транскрипционного фактора Pdr3.

3. Репрессия гена *PET9* (*AAC2*) блокирует обмен адениновых нуклеотидов между матриксом митохондрий и цитоплазмой, но не препятствует активации системы МЛУ под действием C_{12} TPP в клетках дрожжей *S.cerevisiae*.

4. В отличие от липофильных катионов, перекись водорода активирует МЛУ независимо от наличия гена транскрипционного фактора *PDR1*. Липофильные катионы и перекись водорода активируют экспрессию гена Yap1p-зависимого MFS-переносчика *FLR1* в клетках дрожжей *C. glabrata*.

5. Низкомолекулярные антиоксиданты препятствуют активации МЛУ в клетках дрожжей *C. glabrata* при условии делеции гена ключевого неспецифического ABC-переносчика *CDR1*. Наличие редокс-регуляции МЛУ у *C.glabrata* предполагает вырожденность путей активации системы МЛУ и, следовательно, устойчивость механизмов регуляции к внешним воздействиям.

6. Нарушения биосинтеза и транспорта эргостерина в клетках дрожжей *S.cerevisiae* приводят к избыточному накоплению в них Pdr5-GFP и изменяют чувствительность системы активации МЛУ к липофильным катионам.

Благодарности

Я бы хотела выразить огромную благодарность своему научному руководителю Дмитрию Алексеевичу Кнорре за содействие и чуткое руководство при совместной работе над моим проектом, за помощь в обсуждении идей, планировании экспериментов и работе над текстом диссертации. Кроме того, я бы хотела поблагодарить Святослава Сергеевича Соколова за помощь в освоении методик и организационных моментов. А также всех сотрудников и студентов лаборатории за создание теплой атмосферы дружного рабочего коллектива.

Список литературы

1. Thakur JK, Arthanari H, Yang F, Pan S-J, Fan X, Breger J, et al. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. *Nature*. 2008;452: 604–609.
2. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*. 2002;359: 1135–1144.
3. Segal BH, Almyroudis NG, Battiwalla M, Herbrecht R, Perfect JR, Walsh TJ, et al. Prevention and early treatment of invasive fungal infection in patients with cancer and neutropenia and in stem cell transplant recipients in the era of newer broad-spectrum antifungal agents and diagnostic adjuncts. *Clin Infect Dis*. 2007;44: 402–409.
4. Ship JA, Vissink A, Challacombe SJ. Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103 Suppl: S6.e1–14.
5. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22: 291–321, Table of Contents.
6. Law CJ, Maloney PC, Wang D-N. Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62: 289–305.
7. Decottignies A, Goffeau A. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet*. 1997;15: 137–145.
8. Klein C, Kuchler K, Valachovic M. ABC proteins in yeast and fungal pathogens. *Essays Biochem*. 2011;50: 101–119.
9. Rawal MK, Khan MF, Kapoor K, Goyal N, Sen S, Saxena AK, et al. Insight into pleiotropic drug resistance ATP-binding cassette pump drug transport through mutagenesis of Cdr1p transmembrane domains. *J Biol Chem*. 2013;288: 24480–24493.
10. Prasad R, Rawal MK. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Front Pharmacol*. 2014;5: 202.
11. Dean M. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Research*. 2001. pp. 1156–1166. doi:10.1101/gr-1649r
12. Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, et al. Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci*. 2008;13: 151–159.
13. Lamping E, Baret PV, Holmes AR, Monk BC, Goffeau A, Cannon RD. Fungal PDR transporters: Phylogeny, topology, motifs and function. *Fungal Genet Biol*. 2010;47: 127–142.
14. Pagant S, Halliday JJ, Kougentakis C, Miller EA. Intragenic suppressing mutations correct the folding and intracellular traffic of misfolded mutants of

- Yor1p, a eukaryotic drug transporter. *J Biol Chem.* 2010;285: 36304–36314.
15. Prasad R, Goffeau A. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol.* 2012;66: 39–63.
 16. Balzi E, Goffeau A. Yeast multidrug resistance: the PDR network. *J Bioenerg Biomembr.* 1995;27: 71–76.
 17. Wolfger H, Mammun YM, Kuchler K. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol.* 2001;152: 375–389.
 18. Katzmann DJ, Hallstrom TC, Voet M, Wysock W, Golin J, Volckaert G, et al. Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (YOR1) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1995;15: 6875–6883.
 19. Cui Z, Hirata D, Tsuchiya E, Osada H, Miyakawa T. The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. *J Biol Chem.* 1996;271: 14712–14716.
 20. Cui Z, Hirata D, Tsuchiya E, Osada H. The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (Yrs1/Yor1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic *Journal of Biological.* 1996. Available: <http://www.jbc.org/content/271/25/14712.short>
 21. Golin J, Ambudkar SV, Gottesman MM, Habib AD, Sczepanski J, Ziccardi W, et al. Studies with novel Pdr5p substrates demonstrate a strong size dependence for xenobiotic efflux. *J Biol Chem.* 2003;278: 5963–5969.
 22. Kolaczowski M, Kolaczowska A, Luczynski J, Witek S, Goffeau A. In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb Drug Resist.* 1998;4: 143–158.
 23. Decottignies A, Grant AM, Nichols JW, de Wet H, McIntosh DB, Goffeau A. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *J Biol Chem.* 1998;273: 12612–12622.
 24. Kolaczowski M, van der Rest M, Cybularz-Kolaczowska A, Soumillion JP, Konings WN, Goffeau A. Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *J Biol Chem.* 1996;271: 31543–31548.
 25. Tsujimoto Y, Shimizu Y, Otake K, Nakamura T, Okada R, Miyazaki T, et al. Multidrug resistance transporters Snq2p and Pdr5p mediate caffeine efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015;79: 1103–1110.
 26. Reid RJ, Kauh EA, Bjornsti MA. Camptothecin sensitivity is mediated by the pleiotropic drug resistance network in yeast. *J Biol Chem.* 1997;272: 12091–12099.

27. Ogawa A, Hashida-Okado T, Endo M, Yoshioka H, Tsuruo T, Takesako K, et al. Role of ABC transporters in aureobasidin A resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42: 755–761.
28. Grigoras I, Lazard M, Plateau P, Blanquet S. Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ABC-transporter Yor1p overexpressed in plasma membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2008. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273607003343>
29. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* 2009;9: 1029–1050.
30. Shapiro AB, Ling V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem.* 1997;250: 130–137.
31. Chiba P, Burghofer S, Richter E, Tell B, Moser A, Ecker G. Synthesis, pharmacologic activity, and structure-activity relationships of a series of propafenone-related modulators of multidrug resistance. *J Med Chem.* 1995;38: 2789–2793.
32. Seelig A. A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein. *Eur J Biochem.* 1998;251: 252–261.
33. Golin J, Ambudkar SV, May L. The yeast Pdr5p multidrug transporter: how does it recognize so many substrates? *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;356: 1–5.
34. Ernst R, Kueppers P, Stindt J, Kuchler K, Schmitt L. Multidrug efflux pumps: substrate selection in ATP-binding cassette multidrug efflux pumps--first come, first served? *FEBS J.* 2010;277: 540–549.
35. Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11: 918–926.
36. Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ. Structure of ABC transporters. *Essays Biochem.* 2011;50: 43–61.
37. Krasowska A, Łukaszewicz M, Bartosiewicz D, Sigler K. Cell ATP level of *Saccharomyces cerevisiae* sensitively responds to culture growth and drug-inflicted variations in membrane integrity and PDR pump activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395: 51–55.
38. Hull RM, Cruz C, Jack CV, Houseley J. Environmental change drives accelerated adaptation through stimulated copy number variation. *PLoS Biol.* 2017;15: e2001333.
39. Delaveau T, Delahodde A, Carvajal E, Subik J, Jacq C. PDR3, a new yeast regulatory gene, is homologous to PDR1 and controls the multidrug resistance phenomenon. *Mol Gen Genet.* 1994;244: 501–511.
40. Kolaczowska A, Kolaczowski M, Delahodde A, Goffeau A. Functional dissection of Pdr1p, a regulator of multidrug resistance in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*. 2002;267: 96–106.
41. Mamnun YM, Pandjaitan R, Mahé Y, Delahodde A, Kuchler K. The yeast zinc finger regulators Pdr1p and Pdr3p control pleiotropic drug resistance (PDR) as homo- and heterodimers in vivo. *Mol Microbiol*. 2002;46: 1429–1440.
 42. Delahodde A, Pandjaitan R, Corral-Debrinski M, Jacq C. Pse1/Kap121-dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1. *Mol Microbiol*. 2001;39: 304–312.
 43. Gulshan K, Moye-Rowley WS. Multidrug resistance in fungi. *Eukaryot Cell*. 2007;6: 1933–1942.
 44. Fardeau V, Lelandais G, Oldfield A, Salin H, Lemoine S, Garcia M, et al. The central role of PDR1 in the foundation of yeast drug resistance. *J Biol Chem*. 2007;282: 5063–5074.
 45. Delahodde A, Delaveau T, Jacq C. Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance. *Mol Cell Biol*. 1995;15: 4043–4051.
 46. Goffeau A. Drug resistance: the fight against fungi. *Nature*. 2008. pp. 541–542.
 47. DeRisi J, van den Hazel B, Marc P, Balzi E, Brown P, Jacq C, et al. Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett*. 2000;470: 156–160.
 48. Rogers B, Decottignies A, Kolaczowski M, Carvajal E, Balzi E, Goffeau A. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001;3: 207–214.
 49. Katzmann DJ, Hallstrom TC, Mahé Y, Moye-Rowley WS. 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.
 50. Eisenman HC, Craig EA. Activation of pleiotropic drug resistance by the J-protein and Hsp70-related proteins, Zuo1 and Ssz1. *Molecular Microbiology*. 2004. pp. 335–344. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04134.x
 51. Shahi P, Gulshan K, Moye-Rowley WS. Negative transcriptional regulation of multidrug resistance gene expression by an Hsp70 protein. *J Biol Chem*. 2007;282: 26822–26831.
 52. Teixeira MC, Sá-Correia I. *Saccharomyces cerevisiae* resistance to chlorinated phenoxyacetic acid herbicides involves Pdr1p-mediated transcriptional activation of TPO1 and PDR5 genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292: 530–537.
 53. Lucau-Danila A, Lelandais G, Kozovska Z, Tanty V, Delaveau T, Devaux F, et al. Early expression of yeast genes affected by chemical stress. *Mol Cell Biol*. 2005;25: 1860–1868.
 54. Alenquer M, Tenreiro S, Sá-Correia I. Adaptive response to the antimalarial drug artesunate in yeast involves Pdr1p/Pdr3p-mediated transcriptional activation of the resistance determinants TPO1 and PDR5. *FEMS Yeast Res*. 2006;6: 1130–

1139.

55. Yibmantasiri P, Bircham PW, Maass DR, Bellows DS, Atkinson PH. Networks of genes modulating the pleiotropic drug response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biosyst*. 2014;10: 128–137.
56. Fardel O, Lecureur V, Daval S, Corlu A. Up-regulation of P-glycoprotein expression in rat liver cells by acute doxorubicin treatment. *European journal of*. 1997. Available: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00186.x>
57. Vu BG, Thomas GH, Moye-Rowley WS. Evidence that Ergosterol Biosynthesis Modulates Activity of the Pdr1 Transcription Factor in *Candida glabrata*. *MBio*. 2019;10. doi:10.1128/mBio.00934-19
58. Leppert G, McDevitt R, Falco SC, Van Dyk TK, Ficke MB, Golin J. Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics*. 1990;125: 13–20.
59. Sanglard D, Ischer F, Bille J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45: 1174–1183.
60. Bouchara JP, Zouhair R, Le Boudouil S, Renier G, Filmon R, Chabasse D, et al. In-vivo selection of an azole-resistant petite mutant of *Candida glabrata*. *J Med Microbiol*. 2000;49: 977–984.
61. Devaux F, Carvajal E, Moye-Rowley S, Jacq C. Genome-wide studies on the nuclear PDR3-controlled response to mitochondrial dysfunction in yeast. *FEBS Lett*. 2002;515: 25–28.
62. Hallstrom TC, Moye-Rowley WS. Multiple signals from dysfunctional mitochondria activate the pleiotropic drug resistance pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2000;275: 37347–37356.
63. Traven A, Wong JMS, Xu D, Sopta M. Interorganellar communication Altered nuclear gene expression profiles in a yeast mitochondrial DNA mutant. *Journal of Biological*. 2001. Available: <http://www.jbc.org/content/276/6/4020.short>
64. Panwar SL, Moye-Rowley WS. Long chain base tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* is induced by retrograde signals from the mitochondria. *J Biol Chem*. 2006;281: 6376–6384.
65. Zhang X, Kolaczowska A, Devaux F, Panwar SL, Hallstrom TC, Jacq C, et al. Transcriptional regulation by Lge1p requires a function independent of its role in histone H2B ubiquitination. *J Biol Chem*. 2005;280: 2759–2770.
66. Shahi P, Moye-Rowley WS. Coordinate control of lipid composition and drug transport activities is required for normal multidrug resistance in fungi. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1794: 852–859.
67. Gulshan K, Schmidt JA, Shahi P, Moye-Rowley WS. Evidence for the bifunctional nature of mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase: role in

- Pdr3-dependent retrograde regulation of PDR5 expression. *Mol Cell Biol.* 2008;28: 5851–5864.
68. Le Saux A, Roux P, Trézéguet V, Fiore C, Schwimmer C, Dianoux AC, et al. Conformational changes of the yeast mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier studied through its intrinsic fluorescence. 1. Tryptophanyl residues of the carrier can be mutated without impairing protein activity. *Biochemistry.* 1996;35: 16116–16124.
 69. Chang W, Liu J, Zhang M, Shi H, Zheng S, Jin X, et al. Efflux pump-mediated resistance to antifungal compounds can be prevented by conjugation with triphenylphosphonium cation. *Nat Commun.* 2018;9: 5102.
 70. Knorre DA, Besedina E, Karavaeva IE, Smirnova EA, Markova OV, Severin FF. Alkylrhodamines enhance the toxicity of clotrimazole and benzalkonium chloride by interfering with yeast pleiotropic ABC-transporters. *FEMS Yeast Res.* 2016;16. doi:10.1093/femsyr/fow030
 71. Murphy MP. Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1777: 1028–1031.
 72. Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, et al. Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem.* 2001;276: 4588–4596.
 73. Skulachev VP. Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441: 275–279.
 74. Zielonka J, Joseph J, Sikora A, Hardy M, Ouari O, Vasquez-Vivar J, et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem Rev.* 2017;117: 10043–10120.
 75. Davis S, Weiss MJ, Wong JR, Lampidis TJ, Chen LB. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *J Biol Chem.* 1985;260: 13844–13850.
 76. Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta.* 1986;850: 436–448.
 77. Nicholls DG. Fluorescence Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Changes in Cultured Cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1782: 121–135.
 78. Modica-Napolitano JS, Aprille JR. Basis for the selective cytotoxicity of rhodamine 123. *Cancer Res.* 1987;47: 4361–4365.
 79. Severin FF, Severina II, Antonenko YN, Rokitskaya TI, Cherepanov DA, Mokhova EN, et al. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 663–668.

80. Kalinovich AV, Mattsson CL, Youssef MR, Petrovic N, Ost M, Skulachev VP, et al. Mitochondria-targeted dodecyltriphenylphosphonium (C12TPP) combats high-fat-diet-induced obesity in mice. *Int J Obes* . 2016;40: 1864–1874.
81. Skulachev VP, Antonenko YN, Cherepanov DA, Chernyak BV, Izyumov DS, Khailova LS, et al. Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs). *Biochim Biophys Acta*. 2010;1797: 878–889.
82. Antonenko YN, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Chernyak BV, Chertkov VA, Domnina LV, et al. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: Synthesis and in vitro studies. *Biochemistry (Moscow)*. 2008. pp. 1273–1287. doi:10.1134/s0006297908120018
83. Roginsky VA, Tashlitsky VN, Skulachev VP. Chain-breaking antioxidant activity of reduced forms of mitochondria-targeted quinones, a novel type of geroprotectors. *Aging* . 2009;1: 481–489.
84. Gros P, Talbot F, Tang-Wai D, Bibi E, Kaback HR. Lipophilic cations: a group of model substrates for the multidrug-resistance transporter. *Biochemistry*. 1992;31: 1992–1998.
85. Fetisova EK, Avetisyan AV, Izyumov DS, Korotetskaya MV, Chernyak BV, Skulachev VP. Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 selectively protects MDR (Pgp 170)-negative cells against oxidative stress. *FEBS Lett*. 2010;584: 562–566.
86. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 1433–1437.
87. Knorre DA, Markova OV, Smirnova EA, Karavaeva IE, Sokolov SS, Severin FF. Dodecyltriphenylphosphonium inhibits multiple drug resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450: 1481–1484.
88. Trnka J, Elkalaf M, Anděl M. Lipophilic triphenylphosphonium cations inhibit mitochondrial electron transport chain and induce mitochondrial proton leak. *PLoS One*. 2015;10: e0121837.
89. Ojovan SM, Knorre DA, Markova OV, Smirnova EA, Bakeeva LE, Severin FF. Accumulation of dodecyltriphenylphosphonium in mitochondria induces their swelling and ROS-dependent growth inhibition in yeast. *J Bioenerg Biomembr*. 2011;43: 175–180.
90. Zyrina AN, Smirnova EA, Markova OV, Severin FF, Knorre DA. Mitochondrial Superoxide Dismutase and Yap1p Act as a Signaling Module Contributing to Ethanol Tolerance of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83. doi:10.1128/AEM.02759-16

91. Schnell N, Krems B, Entian KD. The PAR1 (YAP1/SNQ3) gene of *Saccharomyces cerevisiae*, a c-jun homologue, is involved in oxygen metabolism. *Curr Genet*. 1992;21: 269–273.
92. Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, et al. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem*. 1999;274: 16040–16046.
93. Pereira MD, Eleutherio EC, Panek AD. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol*. 2001;1: 11.
94. Berry DB, Guan Q, Hose J, Haroon S, Gebbia M, Heisler LE, et al. Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. *PLoS Genet*. 2011;7: e1002353.
95. McDaniel EA, Stuecker TN, Veluvolu M, Gasch AP, Lewis JA. Independent Mechanisms for Acquired Salt Tolerance versus Growth Resumption Induced by Mild Ethanol Pretreatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *mSphere*. 2018;3. doi:10.1128/mSphere.00574-18
96. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2000;11: 4241–4257.
97. Świącilo A. Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast--new insight into an old phenomenon. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21: 187–200.
98. Kitagaki H, Araki Y, Funato K, Shimoi H. Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett*. 2007;581: 2935–2942.
99. Pérez-Gallardo RV, Briones LS, Díaz-Pérez AL, Gutiérrez S, Rodríguez-Zavala JS, Campos-García J. Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res*. 2013;13: 804–819.
100. Moraitis C, Curran BPG. Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2004;21: 313–323.
101. Pyatrikas DV, Fedoseeva IV, Varakina NN, Rusaleva TM, Stepanov AV, Fedyaeva AV, et al. Relation between cell death progression, reactive oxygen species production and mitochondrial membrane potential in fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells under heat-shock conditions. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362: fnv082.
102. Rowe LA, Degtyareva N, Doetsch PW. DNA damage-induced reactive oxygen species (ROS) stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med*. 2008;45: 1167–1177.
103. Cadet J, Douki T, Ravanat J-L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med*. 2010;49: 9–21.

104. Carroll L, Pattison DI, Davies JB, Anderson RF, Lopez-Alarcon C, Davies MJ. Superoxide radicals react with peptide-derived tryptophan radicals with very high rate constants to give hydroperoxides as major products. *Free Radic Biol Med.* 2018;118: 126–136.
105. Berry DB, Gasch AP. Stress-activated genomic expression changes serve a preparative role for impending stress in yeast. *Mol Biol Cell.* 2008;19: 4580–4587.
106. Semchyshyn HM. Hormetic concentrations of hydrogen peroxide but not ethanol induce cross-adaptation to different stresses in budding yeast. *Int J Microbiol.* 2014;2014: 485792.
107. Knorre DA, Smirnova EA, Markova OV, Sorokin MI, Severin FF. Prooxidants prevent yeast cell death induced by genotoxic stress. *Cell Biol Int.* 2011;35: 431–435.
108. Vermitsky J-P, Edlind TD. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48: 3773–3781.
109. Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokozawa S, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Endogenous Reactive Oxygen Species Is an Important Mediator of Miconazole Antifungal Effect. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46: 3113–3117.
110. Belenky P, Camacho D, Collins JJ. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway. *Cell Rep.* 2013;3: 350–358.
111. Delattin N, Cammue BPA, Thevissen K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Med Chem.* 2014;6: 77–90.
112. Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58: 6627–6638.
113. Shekhova E, Kniemeyer O, Brakhage AA. Induction of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production by Itraconazole, Terbinafine, and Amphotericin B as a Mode of Action against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61. doi:10.1128/AAC.00978-17
114. Wuyts J, Van Dijck P, Holtappels M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? *PLoS Pathog.* 2018;14: e1007301.
115. Jun H, Kieselbach T, Jönsson LJ. Comparative proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae*: a global overview of in vivo targets of the yeast activator protein 1. *BMC Genomics.* 2012;13: 230.
116. Gerashchenko MV, Lobanov AV, Gladyshev VN. Genome-wide ribosome profiling reveals complex translational regulation in response to oxidative stress.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109: 17394–17399.

117. Wendler F, Bergler H, Prutej K, Jungwirth H, Zisser G, Kuchler K, et al. Diazaborine resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals a link between YAP1 and the pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR3. *J Biol Chem.* 1997;272: 27091–27098.
118. 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.
119. Alarco AM, Balan I, Talibi D, Mainville N, Raymond M. AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J Biol Chem.* 1997;272: 19304–19313.
120. Chen K-H, Miyazaki T, Tsai H-F, Bennett JE. The bZip transcription factor Cgap1p is involved in multidrug resistance and required for activation of multidrug transporter gene CgFLR1 in *Candida glabrata*. *Gene.* 2007;386: 63–72.
121. Blatzer M, Jukic E, Posch W, Schöpf B, Binder U, Steger M, et al. Amphotericin B Resistance in *Aspergillus terreus* Is Overpowered by Coapplication of Pro-oxidants. *Antioxid Redox Signal.* 2015;23: 1424–1438.
122. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;62: e1–50.
123. Robbins N, Caplan T, Cowen LE. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71: 753–775.
124. James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature.* 2006;443: 818–822.
125. Demuyser L, Van Dijck P. Can *Saccharomyces cerevisiae* keep up as a model system in fungal azole susceptibility research? *Drug Resist Updat.* 2019;42: 22–34.
126. Cuéllar-Cruz M, Briones-Martin-del-Campo M, Cañas-Villamar I, Montalvo-Arredondo J, Riego-Ruiz L, Castaño I, et al. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryot Cell.* 2008;7: 814–825.
127. Lelandais G, Tanty V, Geneix C, Etchebest C, Jacq C, Devaux F. Genome adaptation to chemical stress: clues from comparative transcriptomics in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida glabrata*. *Genome Biol.* 2008;9: R164.
128. Mutlu N, Garipler G, Akdoğan E, Dunn CD. Activation of the pleiotropic drug

- resistance pathway can promote mitochondrial DNA retention by fusion-defective mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3*. 2014;4: 1247–1258.
129. Gerhold JM, Cansiz-Arda Ş, Löhmus M, Engberg O, Reyes A, van Rennes H, et al. Corrigendum: Human Mitochondrial DNA-Protein Complexes Attach to a Cholesterol-Rich Membrane Structure. *Sci Rep*. 2015;5: 17119.
130. Desmond E, Gribaldo S. Phylogenomics of sterol synthesis: insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature. *Genome Biol Evol*. 2009;1: 364–381.
131. Weete JD, Abril M, Blackwell M. Phylogenetic distribution of fungal sterols. *PLoS One*. 2010;5: e10899.
132. Hoppins S, Collins SR, Cassidy-Stone A, Hummel E, Devay RM, Lackner LL, et al. A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol*. 2011;195: 323–340.
133. Huh W-K, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*. 2003. pp. 686–691. doi:10.1038/nature02026
134. Karavaeva IE, Golyshev SA, Smirnova EA, Sokolov SS, Severin FF, Knorre DA. Mitochondrial depolarization in yeast zygotes inhibits clonal expansion of selfish mtDNA. *J Cell Sci*. 2017;130: 1274–1284.
135. Sokolov SS, Vorobeva MA, Smirnova AI, Smirnova EA, Trushina NI, Galkina KV, et al. LAM Genes Contribute to Environmental Stress Tolerance but Sensibilize Yeast Cells to Azoles. *Front Microbiol*. 2020;11: 38.
136. Ueno K, Matsumoto Y, Uno J, Sasamoto K, Sekimizu K, Kinjo Y, et al. Intestinal resident yeast *Candida glabrata* requires Cyb2p-mediated lactate assimilation to adapt in mouse intestine. *PLoS One*. 2011;6: e24759.
137. Hu F, Liu J, Du G, Hua Z, Zhou J, Chen J. Key cytomembrane ABC transporters of *Saccharomyces cerevisiae* fail to improve the tolerance to D-limonene. *Biotechnol Lett*. 2012;34: 1505–1509.
138. Shedlovskiy D, Shcherbik N, Pestov DG. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA Biology*. 2017. pp. 1722–1726. doi:10.1080/15476286.2017.1345417
139. Ivnitski-Steele I, Holmes AR, Lamping E, Monk BC, Cannon RD, Sklar LA. Identification of Nile red as a fluorescent substrate of the *Candida albicans* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Cdr2p and the major facilitator superfamily transporter Mdr1p. *Anal Biochem*. 2009;394: 87–91.
140. Knorre DA, Krivonosova TN, Markova OV, Severin FF. Amiodarone inhibits multiple drug resistance in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*. 2009;191: 675–679.
141. Osorio H, Carvalho E, del Valle M, Günther Sillero MA, Moradas-Ferreira P,

- Sillero A. H₂O₂, but not menadione, provokes a decrease in the ATP and an increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. An experimental and theoretical approach. *Eur J Biochem.* 2003;270: 1578–1589.
142. Deken RHDE, de Deken RH. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Journal of General Microbiology.* 1966. pp. 149–156.
doi:10.1099/00221287-44-2-149
143. Starovoytova AN, Sorokin MI, Sokolov SS, Severin FF, Knorre DA. Mitochondrial signaling in *Saccharomyces cerevisiae* pseudohyphae formation induced by butanol. *FEMS Yeast Res.* 2013;13: 367–374.
144. Ernst R, Kueppers P, Klein CM, Schwarzmuller T, Kuchler K, Schmitt L. A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105: 5069–5074.
145. Miceli MV, Jiang JC, Tiwari A, Rodriguez-Quiñones JF, Jazwinski SM. Loss of mitochondrial membrane potential triggers the retrograde response extending yeast replicative lifespan. *Front Genet.* 2011;2: 102.
146. Zhang F, Pracheil T, Thornton J, Liu Z. Adenosine Triphosphate (ATP) Is a Candidate Signaling Molecule in the Mitochondria-to-Nucleus Retrograde Response Pathway. *Genes .* 2013;4: 86–100.
147. Knorre DA, Sokolov SS, Zyrina AN, Severin FF. How do yeast sense mitochondrial dysfunction? *Microb Cell.* 2016;3: 532–539.
148. Sterner DE, Belotserkovskaya R. SALSA, a variant of yeast SAGA, contains truncated Spt7, which correlates with activated transcription. *Proceedings of the.* 2002. Available: <https://www.pnas.org/content/99/18/11622.short>
149. Schuldiner M, Metz J, Schmid V, Denic V, Rakwalska M, Schmitt HD, et al. The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell.* 2008;134: 634–645.
150. Lees ND, Skaggs B, Kirsch DR, Bard M. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*—A review. *Lipids.* 1995;30: 221–226.
151. Moye-Rowley WS. Multiple interfaces control activity of the *Candida glabrata* Pdr1 transcription factor mediating azole drug resistance. *Curr Genet.* 2019;65: 103–108.
152. Zakharova VV, Pletjushkina OY, Galkin II, Zinovkin RA, Chernyak BV, Krysko DV, et al. Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863: 968–977.
153. Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell.*

2008;14: 193–204.

154. Bordt EA, Clerc P, Roelofs BA, Saladino AJ, Tretter L, Adam-Vizi V, et al. The Putative Drp1 Inhibitor mdivi-1 Is a Reversible Mitochondrial Complex I Inhibitor that Modulates Reactive Oxygen Species. *Dev Cell*. 2017;40: 583–594.e6.
155. 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.
156. Prunuske AJ, Waltner JK, Kuhn P, Gu B, Craig EA. Role for the molecular chaperones Zuo1 and Ssz1 in quorum sensing via activation of the transcription factor Pdr1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109: 472–477.