

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy

Katedra fyziologie živočichů a vývojové biologie



Využití stresorů pro funkční analýzu genů v kvasince *Schizosaccharomyces pombe*

Bakalářská práce

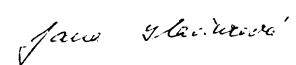
Jana Staňurová

Školitel: RNDr. František Půta, CSc.

Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s pomocí citované literatury.

Květen 2007



Jana Staňurová

Obsah

Obsah.....	2
Seznam zkratk	3
Klíčová slova.....	3
Abstrakt	4
Abstract	4
Úvod	5
Látky ovlivňující buněčnou stěnu	7
Látky ovlivňující cytoplazmatickou membránu.....	7
Mikrotubulární jedy.....	8
Jedy aktinového cytoskeletu.....	10
Stresory endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu.....	12
Inhibitory translace.....	12
Poškození DNA.....	13
Teplotní stres	16
Nutriční stres	17
Osmotický stres	17
Oxidativní stres	18
Těžké kovy	19
Závěr.....	21
Seznam literatury.....	22

Seznam zkratek

SDS – sodium dodecyl sulfát

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát

GTP – guanosin trifosfát

GDP – guanosin difosfát

ATP – adenosin trifosfát

ADP – adenosin difosfát

AMP – adenosin monofosfát

mRNA – messenger RNA

tRNA – transferová RNA

EDTA – ethylen diamin tetraoctová kyselina

EGTA – ethylen glykol tetraoctová kyselina

BAPTA – 1,2-bis(o-aminofenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina

Klíčová slova

Schizosaccharomyces pombe, stres, stresory, inhibitory, poškození buněčných struktur

Abstrakt

Stresory jsou důležitými nástroji pro funkční analýzu genů. Pomocí jejich aplikace lze studovat mnoho procesů probíhajících v buňce. Použitelných stresorů je bezpočet ve smyslu derivátů se stejnými či podobnými fyziologickými účinky jako původní chemikálie. Tato práce se zabývá jejich utříděním do několika skupin, a to podle cílových struktur či procesů, které v buňce ovlivňují. Práce popisuje tyto skupiny a mechanismus působení některých jejich zástupců. Základní rozdělení odlišuje cílené a nespecifické stresory. Nespecifické stresory mají pleiotropní účinky, důsledkem jejich vlivu je stresový stav vyvolaný celkovým působením na buňku. Pro ostatní stresory nejčastěji platí, že působí specificky na jednu buněčnou strukturu, nebo se omezují maximálně na jeden proces. V práci jsou stresory tříděny již do přesnějších skupin. Specifické stresory jsou zařazeny podle cílové struktury, stresory nespecifické na základě jejich obecných účinků.

Abstract

Stressors are important tools in gene functional analysis. With the use of stressors it is possible to study many processes taking place in the cell. There is a vast amount of stressors in terms of derivatives with the same or similar physiological effects as the parent chemical. In this essay I address their classification into several groups, concerning the target structures or processes that are affected in the cell. Here I describe these groups and the mechanism of action of their selected members. The basic classification distinguishes targeted and nonspecific stressors. The nonspecific stressors perform pleiotropic effects, the stress status is due to their impact. As for the other stressors, they, in most cases, only influence one cell structure or are restricted to one process at most. In this work the stressors are already sorted to more specific groups. The targeted stressors are categorised according to their target structure, the nonspecific ones pursuant to their general effects.

Úvod

Tato práce se zabývá utříděním stresorů používaných pro studium kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* do několika skupin, a to podle cílové struktury či procesu, a stručným popisem mechanismu jejich působení. V první části se zaměřuje na jedy ovlivňující vždy nějakou specifickou buněčnou strukturu, případně proces. Při objasnění mechanismů účinku se v každé skupině stresorů omezuje pro jednoduchost pouze na vybrané zástupce každé skupiny. V případě cílených inhibitorů je jejich působení ne vždy dokonale charakterizováno a ujasněno, proto je v některých případech nespolehlivé je jednoznačně třídit do konkrétních podskupin. Jejich zařazení do obecných skupin však platí. Ve druhé části práce jsou popsány obecnější stresory, které mají na buňku nespolečné dopady. Nejedná se o cílené inhibitory, ale o stresové stavy vyvolané celkovým působením daného stresoru na buňku. Takové stavy vyžadují komplexní systémovou odpověď, jejich účinky nelze vztáhnout na konkrétní proces.

Za použití stresorů lze charakterizovat různé geny zapojené do tvorby buněčných struktur či jejich regulace. Pomocí srovnávací analýzy divokého kmene s kmenem mutantním, jenž vykazuje pod vlivem nějakého stresoru odlišný fenotyp než kmen rodičovský, je možné usuzovat na důležitost a funkci genu, respektive jeho produktu, na proces, kterého se účastní, a aktivitu, kterou při tomto procesu zastává. Jsou konstruovány kmeny s cílenou mutací v konkrétním genu, nebo s jeho delecí, které jsou následně vystaveny stresovým testům. V případě, že se objeví fenotyp odlišný od rodičovského kmene, je namístě potvrzení účinku dané mutace supresí fenotypu pomocí exprese nepoškozené alely příslušného genu. Alternativou je provedení náhodné mutagenese. Mutantní kmeny jsou opět vystaveny působení stresorů pro nalezení jiného než rodičovského fenotypu. Konkrétní gen je pak identifikován expresí genů z genové knihovny. Těmito způsoby lze odhalit geny, které jsou zodpovědné za rezistenci, či senzitivitu buněk vůči nějakým stresovým podmínkám.

Stresové testy je možné použít pro provedení klastrovací analýzy a dále je lze pro tento účel kombinovat s daty získanými jinými metodami. Změna fenotypu oproti divokému kmeni je zpravidla doprovázena změnou genové exprese v kmeni mutantním, kdy podobné fenotypy mají často podobné změny v hladinách genové exprese. Výstupem takové analýzy je utřídění genů i stresorů s různými cílovými strukturami jejich působení do skupin, a to buď podle

spektra diferenciálně exprimovaných genů, nebo dle zjištěných mutantních fenotypů. Každý takový celek pak může poukazovat na nějakou signální dráhu, která se účastní odpovědi na stresory v dané kategorii. Srovnávací analýzou hladin genové exprese v kmeni s mutovaným genem neznámé funkce s již existujícími daty je pak možné takový gen zařadit do některé ze skupin, a tím usuzovat na jeho funkci.

Látky ovlivňující buněčnou stěnu

Buněčná stěna uděluje buňce tvar, pomáhá udržovat osmotickou integritu a slouží jako lešení pro četné extracelulární proteiny. U kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* se buněčná stěna převážně skládá ze tří polysacharidů, a to β -1,3-glukanů, α -1,3-glukanů a galaktomannoproteinů. β -1,3-glukany a α -1,3-glukany přispívají především k rigiditě této struktury, zatímco galaktomannany jsou flexibilnější součástí buněčné stěny. β -1,3-glukan je převládajícím stavebním prvkem, jeho obsah ve stěně dosahuje asi 45%. Při tvorbě buněčné stěny je zřejmě prvním polymerem, který je syntetizován (Osumi *et al.*, 1989). Buněčná stěna je cílem působení calcofluoru, Congo červeně, nikkomycinů, polyoxinů, echinocandinů, papulacandinů a benanomycinů (*syn* pradimycinů).

Benanomyciny ovlivňují zejména galaktomannoproteiny. Nikkomyciny a polyoxiny se u *Schizosaccharomyces pombe* uplatňují jen ve velmi omezené míře, neboť jejich účinky směřují převážně na syntézu chitinu, který však v buněčné stěně této kvasinky obsažen není. Působení calcofluoru, fluorescenčního barviva, má také největší dopad na chitin, neboť se vmezeřuje mezi nascentní chitinové řetězce a zabraňuje tvorbě mikrofibril (Elorza *et al.*, 1983). Calcofluor se však částečně také váže na vznikající vlákna β -1,3-glukanů. Používá se v rozmezí koncentrací 40-200 $\mu\text{g/ml}$ (Bimbó *et al.*, 2005) i více. Jiné fluorescenční barvivo Congo červeně má téměř stejný mechanismus účinku jako calcofluor. Echinocandiny a jejich deriváty caspofungin, micafungin a anidulafungin nekompetitivně inhibují β -1,3-glukan syntázu. Účinky papulacandinů jsou podobné působení echinocandinů.

Látky ovlivňující cytoplazmatickou membránu

Cytoplazmatická membrána odděluje vnitřní prostor buňky od okolního prostředí, pomáhá svými specifickými vlastnostmi zajišťovat iontovou homeostázu uvnitř buňky a je místem ukotvení transportérů, iontových kanálů a jiných molekul. Má lipidickou a proteinovou složku. Je to velmi dynamická struktura, která se mění v závislosti na prostředí, v němž se buňka nachází. Její složení a schopnost jeho změny jsou velmi důležité například při vystavení buňky vysokým či naopak nízkým teplotám, kdy se může (a musí) rychle

přizpůsobit, aby byla i nadále dokonale funkční. Cytoplazmatická membrána je dosti citlivá vůči působení detergentů. Mezi chemikálie nejčastěji používané k vyvolání stresu narušením buněčné membrány patří SDS, Triton X-100, CHAPS či Tween a jim příbuzné látky.

Detergenty se podle svých vlastností dělí na iontové, neiontové a zwitteriontové. K iontovým detergentům patří SDS; Triton X-100 a Tween jsou detergenty neiontové povahy a CHAPS je zwitteriontový detergent. Vlivem SDS dochází k solubilizaci membrány a uvolnění proteinové složky z ní (Tukmachev *et al.*, 1979), neboť jsou rušeny nepolární interakce, které drží membránu pohromadě. Působením SDS uvolněné proteiny denaturují. Jestliže je v zájmu zachovat nativní konformaci proteinů, je vhodné použití neiontových či zwitteriontových detergentů, případně jejich kombinace. Pokud dojde k rozrušení cytoplazmatické membrány *in vivo*, poruší se vnitrobuněčná iontová homeostáza. V případě příliš rozsáhlého narušení biologické membrány může dojít až lyzi buňky. Pro poškození buněčné membrány *Schizosaccharomyces pombe* se používá ponejvíce SDS v rozmezí koncentrací od 0,003% do 0,01% (Bimbó *et al.*, 2005) i více.

Mikrotubulární jedy

Mikrotubuly jsou součástí buněčného cytoskeletu a hrají významnou úlohu při jaderném dělení a migraci, organizaci cytoplazmy, transportu váčků a pohybu organel. Mikrotubuly jsou polarizovaná vlákna, která vznikají polymerací α - a β -tubulinových heterodimerů. Obě globulární podjednotky mají původně navázanou molekulu GTP, která je v případě α -tubulinu stabilní, v případě β -tubulinu dochází po připojení heterodimeru ke vznikajícímu protofilamentu k hydrolýze GTP na GDP. Třináct protofilament se posléze spojuje vedle sebe a vytváří dutý mikrotubulus. Zda dojde k další polymeraci, nebo depolymeraci vznikajících mikrotubulů, záleží na poměru koncentrací vázaného a volného tubulinu. Pokud nově vzniklá vlákna nejsou stabilizována GTP-čepičkou a dostatečně vysokou koncentrací volného tubulinu s navázaným GTP, dochází spontánně k jejich depolymeraci a rozpadu. Aby mohly být odpadlé α - a β -tubulinové heterodimery opětovně využity pro polymeraci nových mikrotubulů, musí být GDP vázané na β -tubulinu vyměněno za GTP. Pro buňku je možnost

rapidní změny mikrotubulů esenciální. Mikrotubulární jedy se dělí do tří podskupin podle mechanismu účinku.

Obecně působení všech mikrotubulárních jedů, ať již prvním, druhým či třetím mechanismem, má za následek ztrátu schopnosti buňky tvořit nové mikrotubuly. To vede k inhibici esenciálních buněčných procesů – zastavení buněčného dělení, tudíž i buněčného cyklu, transportu a jiných. Při příliš dlouhém vystavení buňky vlivu mikrotubulárních jedů nebo jejich příliš vysoké koncentraci může dojít až ke smrti buňky.

První skupinou jsou chemikálie, které zabraňují polymeraci heterodimerů α - a β -tubulinu. Do této skupiny patří například kolchicin, kolcemid, benomyl a jeho deriváty carbendazim, nocodazol (taktéž oncodazol), mebendazol a thiabendazol. Tyto látky se váží na volné heterodimery α - a β -tubulinu a posouvají rovnováhu mezi vázanými a volnými podjednotkami výrazně směrem k volným podjednotkám, čímž zabraňují polymeraci (Davidse a Flach, 1977), nebo kompetitivně zabraňují navázání GTP na tubulin (Winder *et al.*, 2000), čímž opět blokují možnost polymerace. Z těchto jedů se nejvíce používá kolchicin, a to v koncentraci přibližně 40 μ M (Winder *et al.*, 2000), nocodazol v koncentraci 12,5 μ M (Winder *et al.*, 2000) a carbendazim v rozmezí koncentrací 5-10 μ g/ml (Bimbó *et al.*, 2005) i více.

Do druhé skupiny patří jedy, které působí depolymeraci již existujících mikrotubulů. Podle některých autorů spadá do této skupiny i kolchicin, benomyl a jeho deriváty (Jacobs *et al.* 1988), avšak v jiných studiích byla schopnost destabilizace mikrotubulů prokázána pouze u nocodazolu (Winder *et al.*, 2000). Některé publikace uvádějí, že kolchicin nepůsobí depolymeraci ani ve vysokých koncentracích (Farrell a Wilson, 1984). Podobně se neshodují názory na působení carbendazimu a obecně i ostatních látek odvozených od benomyly. Jisté alespoň nocodazol však porušuje rozdělení na první a druhou skupinu, neboť jak rozrušuje již vytvořené mikrotubuly, tak i zabraňuje jejich vzniku. Mechanismus působení nocodazolu na existující mikrotubuly spočívá ve zvýšené míře hydrolyzy GTP v nich obsaženého (Mejillano *et al.*, 1996). Do této skupiny patří také vinblastin, vincristin, vindesin, vinorelbin a vinpocetin, které též zapřičiňují rozpad mikrotubulů.

Třetí skupinu tvoří látky, které oproti předchozím popsaným skupinám stabilizují existující mikrotubuly a zabraňují jejich depolymeraci. Jedná se například o taxany, kam patří paclitaxel (*syn* taxol) či docetaxel. Tyto jedy stabilizují tubulin s navázaným GDP obsažený

v mikrotubulech, což znemožňuje jejich rozpad. V buňce se hromadí doslova zamrzlé mikrotubuly. V důsledku vede toto působení k vyčerpání podjednotek volného α - a β -tubulinu a tedy neschopnosti tvorby nových mikrotubulů.

Jedy aktinového cytoskeletu

Mikrofilamenta jsou podstatnou součástí cytoskeletu. Udržují tvar buňky a vnitřní uspořádání cytoplazmy, hrají významnou úlohu při buněčném dělení. Vznikají polymerací podjednotek volného globulárního aktinu, G-aktinu, z malých nukleačních center. Po navázání G-aktinu do vznikajícího řetězce F-aktinu dochází postupně k hydrolyze ATP, což oslabuje vazebné interakce sousedních podjednotek a mírně destabilizuje mikrofilamenta. Podobně jako mikrotubuly, i řetězce aktinu jsou polarizované. Na (+) konci rostou obecně mnohem rychleji než na (-) konci, a to maximálně přibližně desetinásobně. Jestliže je míra depolymerace na (-) konci vyrovnaná s rychlostí polymerace na (+) konci mikrofilamenta, dochází k tzv. treadmilling efektu, kdy se vlákno zdánlivě posouvá beze změny své délky. Mikrofilamenta jsou opět velmi dynamická, jejich růst i rozpad může být velice rychlý. Rozhodnutí o dalším osudu vytvořeného řetězce je znovu závislé na poměru koncentrací vázaného a volného aktinu. Podjednotky, které odpadly z mikrofilament, mohou být a jsou opakovaně použity k tvorbě nových řetězců. Pro tento účel však musí být nejprve ADP nahrazeno molekulou ATP. Aktinové jedy se také dělí do tří podskupin podle svého odlišného mechanismu působení.

Aktinové jedy jsou mnohem méně charakterizované než jedy mikrotubulární, proto je nesnadné je jednoznačně třídit. Latrunculiny patrně stírají rozdíly mezi prvními dvěma skupinami, ačkoliv jejich působení, které by potvrzovalo jejich příslušnost do první skupiny, nebylo *in vivo* uspokojivě dokázáno. Na výzkumu dopadů latrunculínů na buňku a buněčný aktinový cytoskelet se stále ještě pracuje. V případě cytochalasinů je problém ještě poněkud složitější, neboť jsou některými autory řazeny i do první a druhé skupiny. Jistá je pouze jejich příslušnost do skupiny třetí; otázka, zda patří také do první, respektive druhé skupiny, zůstává alespoň prozatím sporná. Ať již je molekulární mechanismus jejich vlivu jakýkoliv, jedy

aktinového cytoskeletu zastavují buněčné dělení, tedy i buněčný cyklus, a stejně jako jedy mikrotubulární mohou v důsledku způsobit buněčnou smrt.

První skupinu tvoří látky, které zabraňují vzniku nových mikrofilament vazbou na volný G-aktin, čímž inhibují možnost jeho polymerace. Do této skupiny patří zřejmě latrunculiny, ač jejich působení tímto mechanismem bylo popsáno pouze *in vitro*. *In vitro* se latrunculiny váží na monomerní aktin ve stechiometrickém poměru 1:1 (Coue *et al.*, 1987) a inhibují jeho polymeraci. Tento vliv latrunculínů však *in vivo* zatím prokázán nebyl. Také cytochalasiny váží aktinové monomery a dimery (Goddette a Frieden, 1986), ale jejich účinek *in vivo* v tomto směru taktéž nebyl potvrzen.

Do druhé skupiny patří jedy, které destabilizují vytvořená mikrofilamenta a působí jejich rozpad. Patří sem jistě latrunculiny, které zapříčiňují depolymeraci již existujících mikrofilament (Spector *et al.*, 1989), a zřejmě některé cytochalasiny. V názorech na dopad cytochalasinů se literatura neshoduje. Podle některých autorů cytochalasiny destabilizující působení na mikrofilamenta vykazují (Dancker a Low, 1979, Hartwig a Stossel, 1979), podle jiných studií tomu tak není a cytochalasiny se výhradně váží na (+) konce mikrofilament, stabilizují je a tak blokují (MacLean-Fletscher a Pollard, 1980). Tato problematika ještě nebyla uspokojivě vyjasněna. Z této skupiny se tedy používá latrunculin A, a to v koncentracích 0,2-0,5 μM (Bimbó *et al.*, 2005) i více.

Třetí skupinou jsou chemikálie, které stabilizují mikrofilamenta a zabraňují jejich rozpadu (Coluccio a Tilney, 1984). Do této skupiny patří phalloidin a některé cytochalasiny. Tyto jedy se váží na aktinové řetězce. Cytochalasiny obsazují (+) konce vláken a zabraňují jak jejich polymeraci, tak i depolymeraci. Phalloidin se váže na mikrofilamenta mnohem silnější vazbou než na volný G-aktin a vychyluje rovnováhu mezi vázaným a volným aktinem výrazně směrem k vázanému aktinu (Dancker *et al.*, 1975). Phalloidin je velmi efektivní inhibitor depolymerace aktinu.

Stresory endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu

Endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát jsou komplexní buněčné struktury, které zajišťují funkci sekretorické dráhy. Nedá se dobře najít jejich přímý inhibitor, avšak brefeldin A je negativně ovlivňuje. Interferuje s anterográdním transportem z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu, což vede k akumulaci proteinů v endoplazmatickém retikulu. Jeho cílovou molekulou je totiž GTP výměnný faktor, který se účastní stavby obalu transportních váčků (Jackson a Casanova, 2000, review). Tyto váčky se proto nemohou tvořit a jejich obsah tak zůstává nutně v endoplazmatickém retikulu. Prvním efektem brefeldinu A je tedy vyčerpání COP I obalových jednotek z membrány Golgiho aparátu. Důsledkem této skutečnosti je pak zvýšená přítomnost v-SNARE proteinů na membráně Golgiho aparátu. To vede ke spontánní fúzi cisteren Golgiho aparátu se sousedícím endoplazmatickým retikulem (Elazar *et al.*, 1994, Scheel *et al.*, 1997).

Na Golgiho aparát, avšak ne na endoplazmatické retikulum, působí nepříznivě zablokování buněčné translace. Vlivem inhibitorů translace cycloheximidu nebo anisomycinu dochází v kvasince *Schizosaccharomyces pombe* k výraznému rozpuštění Golgiho aparátu již po jedné hodině působení (Ayscough a Warren, 1994). Po třech hodinách expozice se ztratí až 90% Golgiho aparátu. Změny jsou ale reverzibilní a po odstranění inhibitorů se Golgiho aparát opět objeví. Jeho funkce se plně obnoví až po nějaké době. Proč dochází k těmto změnám Golgiho aparátu při zablokování translace není jasné.

Inhibitory translace

Translace je základní buněčný proces, při kterém se podle mRNA na ribosomech syntetizují proteiny tak, jak odpovídá genetickému kódu. Jako prekurzory slouží tzv. nabitě tRNA, které podle své specifity nesou jednu aminokyselinu. Iniciace translace spočívá v navázání malé podjednotky ribosomu na patřičnou mRNA a její skenování, dokud nedojde k rozpoznání prvního kodónu AUG. Pak se připojí velká podjednotka ribosomu a naváže se tRNA nesoucí methionin. Následuje elongace, kdy k počáteční aminokyselině přibývají další podle komplementarity kodónů mRNA a antikodónů tRNA. Aminokyselina na tRNA v P-místě je

peptidyl-tranferázovou aktivitou ribosomu připojena peptidovou vazbou k aminokyselině nesené tRNA v A-místě. Dalším krokem je translokace, kdy je již nenabitá tRNA v P-místě přesunuta do E-místa, odkud opouští ribosom, a tRNA v A-místě nesoucí peptid je přesunuta do P-místa. Tím se uvolní A-místo a elongace může pokračovat. Terminaci translace zajišťují stop-kodóny, které, až na výjimky, jež zde vědomě opomenu, nekódují aminokyselinu. Proces translace je cílem inhibitorů tubulosinu, trichothecenů, puromycinu, hygromycinů, emetinu, cycloheximidu či anisomycinu. Inhibice translace je také minoritním vlivem jednoho zástupce skupiny cytochalasinů, cytochalasinu D (Ornelles *et al.*, 1986).

Anisomycin, cycloheximid, emetin a tubulosin svým působením inhibují peptidyl-transferázovou aktivitu ribosomu, takže blokují proces elongace. Puromycin je antibiotikum, které předčasně ukončuje translaci. Část jeho molekuly totiž imituje 3' konec nabité tRNA a tak místo této vstoupí do A-místa a způsobí předčasné uvolnění nedokončeného peptidového řetězce z ribosomu. Hygromyciny působí inhibici translokace, čímž opět blokují proces elongace. Některé z inhibitorů zapříčiňují rozpad polysomů; k těmto jedům patří například verrucarín či nivalenol ze skupiny trichothecenů a puromycin. Jiné inhibitory naopak polysomy stabilizují a jejich rozpad nedovolují, jako je tomu v případě anisomycinu, cycloheximidu či trichoderminu, který také patří do skupiny trichothecenů. Trichotheceny jsou příbuzné látky, avšak jak je patrné z předchozích konstatování o mechanismu jejich účinku, v rámci skupiny se liší. Mechanismus působení různých zástupců trichothecenů je pravděpodobně dán povahou substituentů na uhlíku č. 15, čímž lze vysvětlit odlišné chování například trichoderminu a verrucarínu, které vlastně působí přímo opačně (Cundliffe *et al.*, 1973). Ze všech popsaných chemických látek je nejběžnějším prostředkem pro inhibici translace v kvasince *Schizosaccharomyces pombe* zřejmě cycloheximid. Rozmezí jeho koncentrací se pohybuje mezi 10-20 µg/ml (Bimbó *et al.*, 2005) i více.

Poškození DNA

DNA obsahuje genetickou informaci a instrukce pro vývoj, růst a reprodukci buňky. Je to pravotočivá dvoušroubovice tvořená páry bází a cukr-fosfátovou kostrou. Prekurzory její syntézy jsou deoxyribonukleotid trifosfáty. Purinové báze párují s bázemi pyrimidinovými, a

to adenin s thyminem a guanin s cytosinem, přičemž AT páry tvoří dva vodíkové můstky, zatímco GC páry mají vodíkové můstky tři. Při syntéze nového vlákna DNA jsou sousední nukleotidy spojovány fosfodiesterovými vazbami; fosfátem jsou vždy spojeny C-3 a C-5 sousedních deoxyribóz. Vlákna DNA dvoušroubovice jsou antiparalelní. Úspěšně dokončená replikace DNA je esenciální podmínkou buněčného dělení. Pokud k replikaci z nějakého důvodu nedojde, nebo není dokončena, dochází aktivně k zablokování buněčného cyklu v jednom z kontrolních bodů a dokud není příčina zastavení odstraněna, buňka nemůže dále v cyklu pokračovat. DNA a její syntéza jsou cílem velkého množství stresorů, které se podle svého účinku dělí do několika skupin.

Cílem inhibitoru hydroxyurey je enzym ribonukleotid reduktáza, která je zodpovědná za dostatečnou zásobu všech deoxyribonukleotid trifosfátů (Elledge *et al.*, 1993, review). Tento enzym katalyzuje redukcí příslušných ribonukleotidů. Reakci zajišťuje stabilní tyrosylový radikál nacházející se v jedné z podjednotek, který enzym vytváří pomocí centra obsahujícího ionty železa (Eklund *et al.*, 2001, review). Redukce začíná odstraněním 3' vodíku vázaného na ribóze. Tohoto kroku se účastní cysteinové radikály. Hydroxyurea specificky blokuje aktivitu ribonukleotid reduktázy tím, že stíní tyrosylový radikál, který je potřebný v průběhu reakce (Dubacq *et al.*, 2004). Inhibice funkce ribonukleotid reduktázy má za následek vyčerpání zásob deoxyribonukleotid trifosfátů a zastavení replikačních vidlic. Tím jsou aktivovány kontrolní mechanismy DNA syntézy, které zabrání aktivaci pozdějších replikačních počátků. Hydroxyurea se používá při studiu buněčného cyklu ve *Schizosaccharomyces pombe* nejčastěji 5-10 mM v pevných médiích. Ve vyšších koncentracích v tekutém médiu, 12-15 mM, se používá k synchronizaci rostoucích kultur (Forsburg a Rhind, 2006, review). V těchto koncentracích je blokování buněčného cyklu reverzibilní. Pro ireverzibilní zastavení buněčného cyklu je nutno použít vyšší koncentrace. 20-25 mM. Byla také pozorována zvýšená míra rekombinace při vystavení buněčné kultury působení hydroxyurey (Galli a Schiestl, 1996). Tento efekt však není připisován přímému vlivu hydroxyurey na DNA, ale vedlejšímu účinku inhibice ribonukleotid reduktázy a zástavě buněčného cyklu.

Methyl methansulfonát, ethyl methansulfonát, diethylsulfát a nitrosoguanidin jsou alkylačními činidly, která mají pleiotropní účinky. Všechny však reagují s mnoha molekulami včetně bází v DNA či cysteinovými skupinami proteinů (Dubacq *et al.*, 2004). V nižších koncentracích vede jejich působení k zástavě buněčného cyklu v S-fázi. To je připisováno alkylací bází, které pak brání DNA polymeráze v postupu. Je však také možné, že tyto látky

inhibují aktivitu ribonukleotid reduktázy tím, že reagují s aktivními cysteinovými zbytky tohoto enzymu a buněčnými redukčními činidly jako je glutathion či thioredoxin, které jsou potřebné pro aktivitu ribonukleotid reduktázy (Eklund *et al.*, 2001, review). Toto působení v důsledku také vede k zastavení syntézy DNA. Alkylace bází mohou také, pokud nebrání postupu replikačních vidlic, zapříčinit nesprávné párování bází, a tak způsobit mutace, nebo může taktéž dojít k depurinaci.

Kyselina dusitá je chemikálie, která reaguje s aminoskupinami bází a oxiduje je. Tím mění adenin na hypoxanthin, cytosin na uracil a guanin na xanthin. Ne všechny tyto změny mají nutně za následek nesprávné párování bází – xanthin vzniklý z guaninu stále jako tento páruje s cytosinem. V případě konverze adeninu a cytosinu však k pozměněnému párování dochází. Adenin správně páruje s thyminem, hypoxanthin však vytváří vazebné interakce s cytosinem. Cytosin deaminací změněný na uracil již nepáruje s guaninem, ale s adeninem. Kyselina dusitá je tedy přímým mutagenem.

Podobný mutagenní efekt mají analogy bází, která jsou přírodním bázím natolik podobné, že mohou oklamat DNA polymerázu, která tyto syntetické báze zabuduje do nově vznikajícího řetězce. Jejich působení spočívá ve schopnosti existovat ve dvou tautomerních formách, a tím střídavě párovat se dvěma různými bázemi. Nejpoužívanější z těchto analog je zřejmě 5-bromo-deoxyuridin. Ten se obvykle vyskytuje v keto-formě, kdy mimikuje thymin a páruje tedy s adeninem. Může však přecházet do enol-formy, ve které připomíná cytosin a tedy páruje s guaninem. Jiným analogem bází je 2-aminopurin.

Další skupinou mutagenů jsou látky, které indukují posun čtecího rámce. Tyto chemikálie se interkalují do DNA dvoušroubovice a typicky mimikují přítomnost dalšího páru bází. V případě, že k interkalaci dojde v oblasti DNA, která skutečně kóduje protein, je posunut jeho čtecí rámec. Změna čtecího rámce velmi pravděpodobně způsobí ztrátu funkce kódovaného produktu předčasným ukončením jeho syntézy nebo nesprávným složením. Příkladem interkalačních činidel je akridinová oranž, ethidium bromid či proflavin. Také mitomycin C bývá řazen k interkalačním činidlům, avšak jeho vlivem po interkalaci dojde ke kovalentnímu propojení řetězců DNA, takže již není možné je od sebe oddělit například pro replikaci. Podobně jako mitomycin C působí také dimethylsoralen.

Vystavení buňky ultrafialovému či gamma záření má negativní účinky na DNA. Ultrafialové záření vyvolává tvorbu thyminových dimerů, gamma záření způsobuje dvouřetězcové zlomy molekul DNA. Některé chemikálie mimikují vliv ultrafialového záření. K takovým látkám patří například 4-nitrochinolin-N-oxid, který indukuje tranzice, nejčastěji záměnu guaninu za adenin (Fronza *et al.*, 1992). Bleomycin naopak mimikuje vliv gamma záření a způsobuje taktéž dvouřetězcové zlomy DNA. Takto vyvolaná poškození indukují stres, neboť je nutno je opravit. Při opravách poškozené DNA je zařazení nesprávné báze pravděpodobnější než při syntéze nového řetězce.

Teplotní stres

Vystavení buněk vysokým a nízkým teplotám patří k základním nástrojům při funkční analýze genů. Teplotní stres je poněkud nespecifický – buňka musí reagovat na změnu teploty přizpůsobením složení cytoplazmatické membrány, udržováním proteinů a jiných molekul v aktivní konformaci a zajistit, aby nedošlo k jejich denaturaci při vysoké teplotě. Při teplotním stresu dochází k aktivaci mnoha genů, jsou produkovány stresové proteiny ze skupiny heat shock proteinů a aktivovány různé signální dráhy. Vysoké teploty inhibují glykolýzu (Neves a François, 1992) a stimulují enzymy metabolismu neredukujícího disacharidu trehalózy, který funguje jako nutriční rezerva a stresový metabolit (Hottiger *et al.*, 1994). Bylo zjištěno, že buňky jsou k vysokým teplotám tím tolerantnější, čím více akumulují trehalózy. To vedlo k závěru, že trehalóza ve *Schizosaccharomyces pombe* funguje jako ochranný faktor proti nepříznivým vlivům zvýšené teploty (De Virgilio *et al.*, 1994). Proces akumulace trehalózy nebyl inhibován přidáním cycloheximidu, což značí, že pro tento proces není potřebná proteosyntéza (De Virgilio *et al.*, 1990). Naopak zvýšená koncentrace cyklického AMP působí přesně opačně než zvýšená koncentrace trehalózy (Fernández *et al.*, 1996).

Nutriční stres

Metabolický stres je dalším ze základních stresů často používaných při funkční genetické analýze a je to znovu působení s pleiotrofními účinky na buňku. Omezím se zde na stresový stav vyvolaný nedostatečnou koncentrací některých iontů, především vápenatých. Přejídné zvýšení koncentrace vápenatých iontů v buňce je klíčové v buněčné signalizaci. Vápenaté ionty hrají důležitou úlohu při konjugaci (Iida *et al.*, 1990), udržování iontové homeostázy, cytokinezi, regulaci transkripce, zajištění integrity buněčné stěny a cytoskeletu. Za změny koncentrace vápenatých iontů zodpovídají vápníkové kanály a ATP-dependentní transportéry lokalizované v cytoplazmatické membráně a membránách buněčných organel či váců (Cortés *et al.*, 2004). Zvýšení extracelulární koncentrace vápenatých iontů pozitivně stimuluje proliferaci *Schizosaccharomyces pombe* (Yuan *et al.*, 1999).

Pro odstranění iontů z prostředí lze použít více či méně specifická chelatační činidla. Mezi takto působící chemikálie patří EDTA, která nespecificky vyvazuje dvojmocné a trojmocné kationty, dále EGTA, jejíž aplikací dojde ke specifické chelataci vápenatých iontů, či BAPTA, která má podobné účinky jako EGTA. Pro chelataci vápenatých iontů se nejčastěji používá EGTA, a to v rozmezí koncentrací 5-10 mM (Bimbó *et al.*, 2005) i více. Aplikace EGTA inhibuje proliferaci *Schizosaccharomyces pombe* (Yuan *et al.*, 1999). Tento efekt však lze překlenout přidáním vápenatých iontů. Taktéž působením EDTA dojde k zablokování proliferace *Schizosaccharomyces pombe*, avšak pouze přidání vápenatých iontů k navození opětovné proliferace nestačí (Yuan *et al.*, 1999).

Osmotický stres

Dalším často používaným, avšak opět poněkud nespecifickým stresem, je stres osmotický. Aplikaci nějaké osmoticky aktivní látky dojde k narušení poměru koncentrací iontů uvnitř a vně buňky, což způsobí změnu osmotického tlaku. Buňka se s těmito změnami musí vyrovnávat, a to vede ke stresu. V hypoosmotickém prostředí dochází ke vtoku vody do buňky, v hyperosmotickém prostředí je tomu naopak. Buňka je díky přítomnosti pevné buněčné stěny značně odolná vůči hypoosmotickému stresu, neboť buněčná stěna je schopna

odolávat i velkému turgoru. Pokud však vnitřní tlak na stěnu překročí určitou mez, kterou již tato není s to vyrovnat, buněčná stěna praskne a dojde s lyzi buňky. Při hyperosmotickém stresu se buňka musí potýkat s úbytkem vody. Aby zabránila odtoku vody ven, syntetizuje osmoticky aktivní látky. K takovým látkám patří například polyhydričné alkoholy. Při osmotickém stresu tak nejde o přímé nepříznivé působení aplikovaného osmolytu, ale o stres buňky z příliš velkého, respektive příliš malého obsahu vody v ní. Při hyperosmotickém stresu dochází v kvasince *Schizosaccharomyces pombe* k přechodné zástavě translace (Dunand-Sauthier *et al.*, 2005). Byly také popsány morfologické změny vakuol při osmotickém stresu. Při hypoosmotickém stresu došlo k velmi rychlé fúzi vakuol; naopak při hyperosmotickém stresu vakuoly fragmentovaly (Bone *et al.*, 1998). Z výsledků této studie vyplynulo, že vakuolární fúze a fragmentace jsou zřejmě homeostatické mechanismy, které pomáhají obnovit koncentraci cytoplazmy.

K navození hyperosmotického stresu se používají především chloridy, a to nejčastěji draselný a sodný, či sorbitol. Chlorid draselný se aplikuje v rozmezí koncentrací 0,4-1,2 M a sorbitol v koncentracích 1,2-2,0 M (Bimbó *et al.*, 2005) i více.

Oxidativní stres

Oxidativní stres má na buňku pleiotropní účinky. Dochází k oxidaci nukleových kyselin, proteinů, lipidů i dalších molekul, některá oxidační činidla mohou působit i zvýšenou mírou rekombinace či zastavení transkripce. Mezi oxidační činidla patří kyselina dusitá, menadion, *tert*-butyl hydroperoxid, paraquat, mitomycin C, fenyldrazin, kumen hydroperoxid a peroxid vodíku. Při oxidativním stresu jsou hlavními činiteli přímo peroxid vodíku a dále pak superoxidový radikál a hydroxylový radikál, z nichž posledně jmenovaný je nejreaktivnější a tedy nejvíce škodlivý.

Bylo provedena srovnávací studie schopnosti pěti oxidativních mutagenů, a to paraquatu, mitomycinu C, fenyldrazinu, kumen hydroperoxidu a peroxidu vodíku, generovat intrachromozomální a interchromozomální rekombinace (Brennan *et al.*, 1994). Všechny tyto látky výrazně zvýšily míru intrachromozomální rekombinace. Pouze peroxid vodíku však také

navodil zvýšenou míru interchromozomální rekombinace. Vlivem dimethylsulfoxidu se významně snížila schopnost peroxidu vodíku působit jak intrachromozomální, tak i interchromozomální rekombinace, neboť reaktivitu hydroxylového radikálu dimethylsulfoxid účinně stínil. Buňky se oxidativnímu stresu brání pomocí enzymů superoxid dismutázy, katalázy a glutathion peroxidázy i pomocí neenzymatických molekul glutathionu, thioredoxinu, fytochelatinů a glutaredoxinu.

Těžké kovy

Řada kovů je v nízkých (stopových) koncentracích potřebná pro existenci buňky, neboť se účastní enzymatických reakcí a metabolických procesů. Jedná se o kobalt, měď, železo, mangan, molybden, nikl, selen, vanad či zinek. Některé z těchto kovů fungují jako kofaktory různých enzymů, jiné jako prostetické skupiny mnoha důležitých buněčných molekul. Jejich nedostatek je tedy pro buňku nepříznivý. Ve vyšších koncentracích však tyto kovy mají toxické účinky. K těžkým kovům patří také arsen, chrom, kadmium, olovo či rtuť, které nejsou biogenní, účinky jejich působení jsou pouze toxické. Negativní dopady těžkých kovů na buňku zahrnují rozrušování cytoplazmatické membrány, inhibici mnoha enzymatických reakcí, vyčerpání zásob redukčních činidel, denaturaci proteinů i jiných molekul, poškození DNA, zastavení transkripce a translace a v důsledku všech těchto vlivů i zablokování buněčného dělení.

Negativní účinky přítomnosti těžkých kovů v buňce jsou důsledkem jejich přímého i nepřímého působení na buněčné struktury. Ionty těžkých kovů přímo blokuje aktivitu některých enzymů reakcí s jejich aktivními skupinami, nejčastěji cysteinovými zbytky. Dále mohou zapříčinit ztrátu aktivity enzymů nepřímo, totiž vyčerpáním nebo poškozením důležitých molekul, které mnohé enzymy potřebují. Neméně podstatnou složkou jejich vlivu je schopnost těžkých kovů generovat reaktivní formy kyslíku, které dále poškozují buňku.

Ionty chromu [Cr(VI)] vykazují značný mutagenní a cytotoxický potenciál (Shi *et al.*, 1999, review). Po vstupu do buňky jsou redukovány na chromité ionty. Meziprodukty této reakce jsou nestabilní oxidační stavy chromu a ve Fentonově či Haber-Weissově reakci dávají

vzniknout reaktivním oxidačním produktům, a to peroxidu vodíku, superoxidovému radikálu a hydroxylovému radikálu, které dále poškozují četné molekuly.

Ionty kadmia po vstupu do buňky reagují s reaktivními cysteinovými zbytky, čímž ruší jejich aktivitu. Přítomnost kadmia vyčerpává buněčný glutathion, a to přímou reakcí s ním nebo jeho značnou spotřebou buňky ve snaze škodlivé ionty odstranit. Je možné, že tímto nepřímým mechanismem mohou ionty kadmia blokovat aktivitu ribonukleotid reduktázy (Dubacq *et al.*, 2004), která ke svému správnému fungování redukční činidla potřebuje, jak již bylo popsáno výše. Další možností je reakce kadmia s reaktivními cysteinovými zbytky tohoto enzymu, a tím jeho přímá inhibice (Dubacq *et al.*, 2004). Důsledky obou uvažovaných mechanismů inhibice ribonukleotid reduktázy vedou k zastavení buněčného cyklu, podobně jako při působení hydroxyurey na buňku.

Buňka se těžkým kovům brání jejich redukcí, tvorbou komplexů či jejich vyvázáním a odstraněním ven z buňky nebo do vnitrobuněčného kompartmentu (Nies D. H., 1992). K tomuto účelu jsou vytvářeny speciální peptidy fytochelatiny (Murasugi *et al.*, 1981, Coblenz a Wolf, 1994) a na cystein bohaté proteiny metalothioneiny, které zajišťují chelaci těchto iontů. Transport fytochelatinových komplexů s kovy do vakuoly zajišťují membránové ATP-dependentní pumpy ABC-typu (Ortiz *et al.*, 1995). Na odstranění komplexů ven z buňky se zřejmě také podílejí transportéry, tyto však ještě nebyly přesně charakterizovány.

Závěr

Záměrem této práce bylo utřídění stresorů do několika skupin podle cílových struktur, na které směřuje jejich působení. Klasifikace stresorů není vždy jednoznačná, neboť v některých případech nebyla provedena úplná charakterizace jejich účinků, jako je tomu například u cytoskeletárních jedů. Jejich vlivy by bylo vhodné upřesnit a vyjasnit tím příslušnost takových stresorů do určitých kategorií, nebo jejich zařazení opravit. Práce může sloužit jako příručka pro pokusy podobného charakteru.

Stresory jsou cennými nástroji pro funkční analýzu genů. Jejich pomocí lze studovat všechny buněčné struktury a procesy, které se v buňce odehrávají. Každý buněčný kompartment i proces je cílem nějakého inhibitoru. Stresory mají různé mechanismy působení: mohou rozrušovat již vytvořené struktury reakcí s některou z jejich složek; zabraňovat vzniku těchto struktur inhibicí nějakého enzymu, který je pro tvorbu dané struktury esenciální, nebo zapříčiněním nedostatku stavebního materiálu pro syntézu; inhibovat základní metabolické pochody v buňce reakcí s jejich enzymy; interferovat s mnoha fázemi složitých buněčných procesů nebo svým působením přímo poškozovat buněčné struktury.

Ve spojení s dalšími metodami lze stresových testů využít k přímé identifikaci funkce neznámého genu. Na základě výsledků stresových testů, popřípadě v kombinaci s výstupy jiných metod, je také možné provést klastrovací analýzu, která umožní přiřazení neznámého genu do jedné z již existujících funkčních skupin. Pro potvrzení funkce určitého genu pak lze použít supresi fenotypu pomocí exprese genů z genové knihovny.

Seznam literatury

1. **Ayscough K. and Warren G. (1994)** Inhibition of protein synthesis disrupts the Golgi apparatus in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **10**: 1-11.
2. **Bimbó A., Jia Y., Poh S. L., Karuturi R. K., den Elzen N., Peng X., Zheng L., O'Connell M., Liu E. T., Balasubramanian M. K. and Liu J. (2005)** Systematic deletion analysis of fission yeast protein kinases. *Eukaryot Cell*, **4**: 799-813.
3. **Bone N., Millar J. B., Toda T. and Armstrong J. (1998)** Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. *Curr Biol*, **8**: 135-144 .
4. **Brennan R. J., Swoboda B. E. and Schiestl R. H. (1994)** Oxidative mutagens induce intrachromosomal recombination in yeast. *Mutat Res*, **308**: 159-167.
5. **Brown, S. S. and Spudich J. A. (1981)** Mechanism of action of cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends. *J Cell Biol*, **88**: 487-491.
6. **Coblentz A. and Wolf K. (1994)** The role of glutathione biosynthesis in heavy metal resistance in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol Rev.*, **14**: 303-308.
7. **Coluccio L. M. and Tilney L. G. (1984)** Phalloidin enhances actin assembly by preventing monomer dissociation. *J Cell Biol*. **99**: 529-535.
8. **Cortés J. C., Katoh-Fukui R., Moto K., Ribas J. C. and Ishiguro J. (2004)** *Schizosaccharomyces pombe* Pmr1p is essential for cell wall integrity and is required for polarized cell growth and cytokinesis. *Eukaryot Cell*, **3**: 1124-1135.
9. **Coue M., Brenner S. L., Spector I. and Korn E. D. (1987)** Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.*, **213**: 316-318.
10. **Cundliffe E., Cannon M. and Davies J. (1973)** Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71**: 30-34.
11. **Dancker, P. and Low I. (1979)** Complex influence of cytochalasin B on actin polymerization. *Z. Naturforsch. [C]*, **34**: 555-557.
12. **Dancker, P., Low I., Hasselbach W. and Wieland T. (1975)** Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim Biophys Acta*, **400**: 407-414.
13. **Davidse L. C. and Flach W. (1977)** Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*, **72**: 174-193.

14. **De Virgilio C., Hottiger T., Dominguez J., Boller T. and Wiemken A. (1994)** The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem*, **219**: 179-186.
15. **De Virgilio C., Simmen U., Hottiger T., Boller T. and Wiemken A. (1990)** Heat shock induces enzymes of trehalose metabolism, trehalose accumulation, and thermotolerance in *Schizosaccharomyces pombe*, even in the presence of cycloheximide. *FEBS Lett*, **273**: 107-110.
16. **Dubacq C., Chevalier A. and Mann C. (2004)** The protein kinase Snf1 is required for tolerance to the ribonucleotide reductase inhibitor hydroxyurea. *Mol Cell Biol*, **24**: 2560-2572.
17. **Dunand-Sauthier I., Walker C. A., Narasimhan J., Pearce A. K., Wek R. C. and Humphrey T. C. (2005)** Stress-activated protein kinase pathway functions to support protein synthesis and translational adaptation in response to environmental stress in fission yeast. *Eukaryot Cell*, **4**: 1785-1793.
18. **Eklund, H., Uhlin U., Farnegardh M., Logan D. T. and Nordlund P. (2001)** Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol*, **77**: 177-268. Review.
19. **Elazar Z., Orci L., Ostermann J., Amherdt M., Tanigawa G. and Rothman J. E. (1994)** ADP-ribosylation factor and coatamer couple fusion to vesicle budding. *J Cell Biol*, **124**: 415-424.
20. **Elledge S. J., Zhou Z., Allen J. B. and Navas T. A. (1993)** DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays*, **15**: 333-339. Review.
21. **Elorza M. V., Rico H. and Sentandreu R. (1983)** Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol*, **129**: 1577-1582.
22. **Farrell, K. W. and Wilson, L. (1984)** Tubulin-colchicine complexes differentially poison opposite microtubule ends. *Biochemistry*, **23**: 3741-3748.
23. **Fernández J., Soto T., Vicente-Soler J., Cansado J. and Gacto M. (1996)** Heat-shock response in *Schizosaccharomyces pombe* cells lacking cyclic AMP-dependent phosphorylation. *Curr Genet*, **32**: 112-118.
24. **Forsburg S. L. and Rhind N. (2006)** Basic methods for fission yeast. *Yeast*, **23**: 173-183. Review.
25. **Fronza G., Campomenosi P., Iannone R. and Abbondandolo A. (1992)** The 4-nitroquinoline 1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic Acids Res*, **20**: 1283-1387.
26. **Galli A. and Schiestl R. H. (1996)** Hydroxyurea induces recombination in dividing but not in G1 or G2 cell cycle arrested yeast cells. *Mutat Res*, **354**: 69-75.

27. **Goddette D. W., and Frieden C. (1986)** The kinetics of cytochalasin D binding to monomeric actin. *J Biol Chem*, **261**: 15970-15973.
28. **Hartwig, J. H., and Stossel T. P. (1979)** Cytochalasin B and the structure of actin gels. *J Mol Biol*, **134**: 539-553.
29. **Hottiger T., De Virgilio C., Hall M. N., Boller T. and Wiemken A. (1994)** The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur J Biochem*, **219**: 187-193.
30. **Iida, H., Yagawa Y. and Anraku Y. (1990)** Essential role for induced Ca^{2+} influx followed by $[Ca^{2+}]_i$ rise in maintaining viability of yeast cells late in the mating pheromone response pathway. A study of $[Ca^{2+}]_i$ in single *Saccharomyces cerevisiae* cells with imaging of fura-2. *J Biol Chem*, **265**: 13391-13399.
31. **Jacobs C. W., Adams A. E., Szanislo P. J. and Oringle J. R. (1988)** Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol*, **107**: 1409-1426.
32. **Jackson C. L. and Casanova J. E. (2000)** Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol*, **10**: 60-67. Review.
33. **MacLean-Fletscher S. and Pollard T. D. (1980)** Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell*, **20**: 329-341.
34. **Mejillano, M. R., Shivanna, B. D. and Himes, R. H. (1996)** Studies on the nocodazole-induced GTPase activity of tubulin. *Arch Biochem Biophys*, **336**: 130-138.
35. **Murasugi A., Wada C. and Hayashi Y. (1981)** Purification and unique properties in UV and CD spectra of Cd-binding peptide 1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun*, **103**: 1021-1028.
36. **Neves M. J. and Francois J. (1992)** On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*, **288**: 859-864.
37. **Nies D. H. (1992)** CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, **174**: 8102-8110.
38. **Ornelles D. A., Fey E. G. and Penman S. (1986)** Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol Cell Biol*, **6**: 1650-1662.
39. **Ortiz D. F., Ruscitti T., McCue K. F. and Ow D. W. (1995)** Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem*, **270**: 4721-4728.

40. **Osumi M., Yamada N, Kobori H, Taki A, Naito N., Baba M. and Nagatani T. (1989)** Cell wall formation in regenerating protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe*: study by high resolution, low voltage scanning electron microscopy. *J Electron Microsc*, **38**: 457-468.
41. **Scheel J., Pepperkok R., Lowe M., Griffiths G. and Kreis T. E. (1997)** Dissociation of coatamer from membranes is required for brefeldin A-induced transfer of Golgi enzymes to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **137**: 319-333.
42. **Shi X., Chiu A., Chen C. T., Halliwell B., Castranova V. and Vallyathan V. (1999)** Reduction of chromium (VI) and its relationship to carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, **2**: 87-104. Review.
43. **Spector I., Shochet N. R., Blasberger D. and Kashman Y. (1989)** Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton*, **13**: 127-144.
44. **Tukmachev V. A., Nedospasova L. V., Zaslavskij B. Iu. and Rogozhin S. V. (1979)** Effect of sodium dodecyl sulfate on biological membranes. *Biofizika*, **24**: 55-60.
45. **Winder B. S., Strandgaard C. S. and Miller M. G. (2001)** The role of GTP Binding and microtubule-associated proteins in the inhibition of microtubule assembly by carbendazim. *Toxicol Sci*, **59**: 138-146.
46. **Yuan S., Lu Z. M., Yin L. H. and Lu L. (1999)** Comparative study of dependence of the cell proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* on Ca^{2+} . *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao*, **32**: 39-45.