



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**ΤΙΤΛΟΣ: «Μελέτη της δράσης και των κυτταρικών  
μηχανισμών ανθεκτικότητας αντιμυκητιακών φαρμάκων»**

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ Χ. ΚΑΠΕΤΑΝΑΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Επιβλέπων**

**Γεώργιος Διαλλινάς**

**Καθηγητής Μοριακής Μικροβιολογίας**

**ΜΑΪΟΣ 2017**

Γεώργιος Χ. Καπετανάκης ΑΜ: 2480008

ΠΜΣ Μικροβιακή Βιοτεχνολογία

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας

«Μελέτη της δράσης και των κυτταρικών μηχανισμών ανθεκτικότητας αντιμυκητιακών φαρμάκων»

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Γεώργιος Διαλλινάς, Καθηγητής (Επιβλέπων)
2. Αμαλία Κύρτσου Καραγκούνη, Καθηγήτρια
3. Δημήτριος Χατζηνικολάου, Επίκουρος Καθηγητής

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Μετά από έναν σχεδόν χρόνο σκληρής δουλειάς, ερευνητικών και πνευματικών αναζητήσεων, ήρθε η ώρα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον άνθρωπο που μου απέδειξε ότι οι στίχοι του Καβάφη για την «Ιθάκη» έχουν οντότητα και υπόσταση: *«Κι αν πτωχική την βρεις, η Ιθάκη δεν σε γέλασε. Έτσι σοφός που έγινες, με τόση πείρα, ήδη θα το κατάλαβες οι Ιθάκες τι σημαίνουν»*. Αυτός δεν είναι άλλος, από τον καθηγητή και καθοδηγητή μου στα πρώτα βήματα της επιστημονικής μου πορείας. Αναφέρομαι φυσικά στο Γεώργιο Διαλλινά. Για μένα, ήταν αυτός που μου εμφύσησε ότι, με υπομονή, σκληρή δουλειά και εποικοδομητική συνεργασία ακόμα και με ελάχιστους πόρους, μπορούν να επιτευχθούν πράγματα που φαντάζουν ακατόρθωτα, αρκεί να συνοδεύονται από αυθεντικές ιδέες. Κυρίως όμως θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντάς μου τη συγκεκριμένη μελέτη, την οποία από την αρχή της συνεργασίας μας ήθελα να εκπονήσω.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής. Την Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, κα. Αμαλία Κύρτσου Καραγκούνη, η οποία ήταν πάντοτε δίπλα μου και με στήριζε με κάθε δυνατό μέσο σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου και τον Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας, κ. Δημήτρη Χατζηνικολάου για τις συμβουλές και τη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια του έργου μου.

Δε θα μπορούσα βεβαίως να παραλείψω να ευχαριστήσω το Διδάκτορα Μοριακής Μικροβιολογίας, κ. Σωτήρη Αμίλλη, για την ευγενική συνύπαρξη στον διπλανό πάγκο. Πρόκειται για έναν άνθρωπο που με δίδαξε πολλά σε επιστημονικό και τεχνικό επίπεδο και με στήριξε με τον αυθεντικό και αλτρουιστικό χαρακτήρα του όποτε κι αν τον χρειάστηκα. Ευχαριστώ επίσης, τους Στάθη Κατσίφα και Αλέξανδρο Σαββίδη για την άψογη συνεργασία και την αμέριστη βοήθεια τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την άριστη συνεργασία και τη διαρκή βοήθεια τους, τους συνεργάτες της ομάδας εργασίας για την εκπόνηση τη μελέτης από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, χωρίς τη συνεισφορά των οποίων δε θα είχε επιτευχθεί το συγκεκριμένο εγχείρημα. Ο λόγος γίνεται για τους κ. Κωνσταντίνο

Αλιφερη, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας και κ. Γιάννη Καλαμπόκη, υποψήφιο διδάκτορα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους και συνεργάτες μου στο εργαστήριο έναν προς έναν: την υποψήφια διδάκτορα και καταπληκτική φωτογράφο του εργαστηρίου, Όλγα Μαρτζούκου, της οποίας ο ήρεμος και ευγενικός χαρακτήρας αποτέλεσε αρκετές φορές καταλύτη για την αρμονική συνύπαρξη όλων στο εργαστήριο, καθώς και τα μικρότερα ηλικιακά μέλη του εργαστηρίου, τα οποία μόνο η ηλικία καθιστά «μικρότερα» από άλλους ερευνητές που έχω γνωρίσει. Ο λόγος γίνεται για τη Σοφία Μπαλάσκα, τη Γωγώ Παπαδάκη, τη Γεωργία Σιούπουλη και την Κοάρ Κοροσιάν, στις οποίες η δυνατότητα ανάληψης πρωτοβουλιών που δόθηκε από τον καθηγητή μας Γιώργο Διαλλινά μετατράπηκε σε αστείρευτη πηγή επιστημονικής γνώσης, με γνώμονα πάντα το καλό της ομάδας και του εργαστηρίου, αποδεικνύοντας έτσι ότι η γενναιοδωρία, ο σεβασμός και η ελευθερία, μπορούν να αποφέρουν καρπούς.

Πολλές ευχαριστίες, όμως χρωστώ και σε όλους αυτούς που μαζί τους πέρασα όλα αυτά τα χρόνια όμορφες στιγμές κατά τη συνεργασία μας. Μιλώ για την Κική Κανινή, της οποίας η βοήθεια και οι συμβουλές ήταν πάντα χρήσιμες και ευχάριστες, τη Δάφνη Γεωργιάδου, την Αναστασία Γαλανοπούλου, τη Μαριλένα Κουκουνιά, την Αλεξάνδρα Κουτσογιάννη, τον Κωνσταντίνο Κοτσαρίδη, το Θανάση Μαλάμο και πολλούς άλλους ακόμη που πέρασαν - έστω για λίγο - από το διάδρομό μας.

Όλους μαζί ξανά λοιπόν, να σας ευχαριστήσω για την οικογενειακή και φιλική ατμόσφαιρα που όλο αυτό τον καιρό έκανε το πρωινό ξύπνημα λαχτάρα για μια ακόμη πιο συναρπαστική μέρα. Όλοι μαζί αγωνιούσαμε κάθε στιγμή για τη φάση της δουλειάς, όπου βρισκόταν ο καθένας μας και για την επιτυχία των καινούριων εγχειρημάτων στο εργαστήριο. Οι κοινές αγωνίες είναι ένα συναίσθημα που δεν θα ξεχάσω ποτέ από αυτό το εργαστήριο. Ποτέ όμως, δε θα ξεχάσω και τους ανθρώπους που γνώρισα εκεί μέσα, «πίσω από τη γυάλινη πόρτα με το κουδούνι» όπως συνήθιζαν πολλοί να λένε στο Τμήμα Βιολογίας. Εκεί όπου τα φώτα κλείνουν τελευταία και ανάβουν πρώτα κάθε πρωί.

Τέλος, θα ήθελα ιδιαιτέρως να ευχαριστήσω του γονείς μου για τη στήριξη, την εμπύχωση και την οικονομική τους βοήθεια, τους φίλους μου που μου

συμπαραστάθηκαν όλα αυτά τα χρόνια και κυρίως την αδερφή μου, Ελένη για τη διαρκή υποστήριξη και υπομονή της.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μεταφορείς αποτελούν διαμεμβρανικές πρωτεΐνες για τη μεταφορά ουσιών από και προς το κύτταρο. Ειδικότερα, οι μεταφορείς φαρμακευτικών ενώσεων, προσφέρουν προστασία στον οργανισμό ξενιστή, διότι αποτελούν το συνδετικό κρίκο για τη μεταφορά των αντιμικροβιακών ουσιών από το μικροπεριβάλλον του ξενιστή, εντός του κυττάρου του μικροοργανισμού εισβολέα. Οι μεταφορείς άλλοτε αποτελούν στόχο για τη αντιμικροβιακή ένωση και άλλοτε αποτελούν τη δίοδο για την είσοδο αυτής εντός του κυττάρου στόχου. Παρά το πλεονέκτημα όμως, που θα μπορούσε να προσφέρει ο σχεδιασμός αντιμικροβιακών ουσιών με βάση τον επιθυμητό μεταφορέα στόχο, οι φαρμακοφόρες ουσίες επιλέγονται κυρίως βάσει της αποτελεσματικότητας έναντι της ασθένειας, καθώς και των λιγότερων παρενεργειών για τον ξενιστή και όχι με βάση την πύλη εισόδου.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να διερευνηθούν, για πρώτη φορά, οι πιθανοί μεταφορείς που εμπλέκονται στη συσσώρευση μιας ομάδας αντιμυκητιακών ενώσεων, που ονομάζονται αναστολείς της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέως (Succinic Dehydrogenase Inhibitors ή SDHIs), εντός των κυττάρων του *Aspergillus nidulans*. Γενικότερα, οι ουσίες που ανήκουν στην εν λόγω ομάδα χαρακτηρίζονται ως αποτελεσματικές, έναντι αρκετών ειδών μυκήτων που προσβάλλουν καλλιεργήσιμα φυτά. Η χημική ένωση που επιλέχθηκε για περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης και ανθεκτικότητας, μεταξύ άλλων που ελέγχθηκαν για την αποτελεσματικότητά τους έναντι του *Aspergillus nidulans*, είναι η τελευταίας γενιάς ένωση που ανήκει στην ομάδα των SDHIs, το boscalid. Σημειώνεται ότι, οι πιο συνήθεις μηχανισμοί ανθεκτικότητας αντιμυκητιακών ενώσεων προκύπτουν είτε από υπερέκφραση ή τροποποίηση του στόχου, είτε από ενεργοποίηση μεταφορέων εκροής στα μελετώμενα στελέχη (από ABC ή MFS μεταφορείς).

Η τοξικότητα της χημικής ένωσης boscalid ελέγχθηκε στα διαφορετικά είδη του γένους *Aspergillus*, όπου η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου διέφερε από είδος σε είδος. Παράλληλα, η φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης στόχου, για την εν λόγω ουσία, *sdhB*, δεν υπέδειξε συσχέτιση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης με τη διαβάθμιση της ευαισθησίας που φάνηκε από είδος σε είδος του γένους *Aspergillus*.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, οι φυσιολογικές συνθήκες, κάτω από τις οποίες εξελίσσονται οι δοκιμές αύξησης, δρουν καταλυτικά στην αποτελεσματικότητα του φαρμάκου έναντι του κυττάρου στόχου. Αρκεί να υπογραμμιστεί ο σημαντικός ρόλος της θερμοκρασίας στη ρευστότητα των μεμβρανών και κατά συνέπεια στη διάχυση των ουσιών, όπως επίσης και του pH στους μεταφορείς που λειτουργούν με συμεταφορά πρωτονίων. Οι δοκιμές σε διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες έδειξαν ότι, σε υψηλό pH η συσσώρευση του boscalid γίνεται με τη διαμεσολάβηση μεταφορέων, ενώ σε χαμηλότερο pH γίνεται τόσο με τη διαμεσολάβηση μεταφορέων όσο και με διάχυση. Τέλος, η διαθέσιμη πηγή αζώτου ρυθμίζει την έκφραση των μεταφορέων. Πιο αναλυτικά, η παρουσία αμμωνιακών ιόντων ως μοναδική πηγή αζώτου, καταστέλλει την έκφραση μεταφορέων που χρησιμεύουν στη μεταφορά εναλλακτικών πηγών αζώτου, όπως οι μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών οι οποίοι παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Στην περίπτωση όπου η μοναδική πηγή αζώτου ήταν τα αμμωνιακά ιόντα, παρατηρήθηκε ότι το boscalid ήταν αναποτελεσματικό έναντι του αγρίου τύπου στελέχους *Aspergillus nidulans*. Το γεγονός αυτό κατέδειξε ότι, οι μεταφορείς νουκλεοτιδικών βάσεων πιθανά να εμπλέκονται στη συσσώρευση του boscalid.

Η περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του boscalid έγινε χρησιμοποιώντας στελέχη από την τράπεζα στελεχών του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Μυκήτων, καθώς επίσης και νέα στελέχη που κατασκευάστηκαν κατά την πορεία της μελέτης με επιθυμητές ιδιότητες. Αναλυτικότερα, έγιναν δοκιμές αύξησης παρουσία του υπό εξέταση αντιμυκητιακού φαρμάκου, σε στελέχη με μεταλλαγές σε μεταγραφικούς παράγοντες. Στέλεχος areA30, με σημειακή μεταλλαγή (Leu683Met) στον μεταγραφικό παράγοντα areA, εμφάνισε αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με το αγρίου τύπου στέλεχος. Παράλληλα, στέλεχος (Δ7) με διεγραμμένους 7 μεταφορείς (πουρινών, πυριμιδινών και αλλαντοΐνης), εμφάνισε αντίστοιχη ανθεκτικότητα. Οι μεταφορείς αυτοί ήταν οι UapA, UapC, AzgA, FcyB, FurD, CntA και FurA. Τέλος, για τη διερεύνηση του κατά πόσο εμπλέκονται και οι 7 αυτοί μεταφορείς στη συσσώρευση του boscalid εντός του κυττάρου του μύκητα, έγινε μετασχηματισμός σε ισογενετικό υπόβαθρο του στελέχους Δ7, με κάθε έναν από αυτούς τους 7 μεταφορείς υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή κάθε φορά, ώστε η αναστροφή του ανθεκτικού φαινοτύπου να αποκαλύψει την εμπλοκή ή όχι του καθενός από αυτούς στη συσσώρευση του φυτοφαρμάκου. Τα

αποτελέσματα υπέδειξαν ότι, στη συσσώρευση του boscalid συμμετέχουν οι UapC, AzgA, FcyB, CntA και FurA. Αντίθετα, οι μεταφορείς UapA και FurD δεν εμπλέκονται στη διαδικασία συσσώρευσης του boscalid. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από τα μέχρι τώρα βιβλιογραφικά δεδομένα για τον έλεγχο των παραπάνω επτά μεταφορέων από τον μεταγραφικό παράγοντα *area*, σε συνδυασμό με τα πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού που έγιναν κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Ύστερα από τη σήμανση των τριών βασικών μεταφορέων FurA, AzgA, UapC με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, παρατηρήθηκε ενδοκύττωση των μεταφορέων αυτών μετά από την επίδραση με boscalid, όπως και βιβλιογραφικά έχει επιβεβαιωθεί για τους μεταφορείς αυτούς ότι συμβαίνει παρουσία του υποστρώματός τους. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη συσσώρευση και τη μεταφορά του φυτοφαρμάκου εντός του κυττάρου του μύκητα μέσω αυτών των μεταφορέων.

Κλείνοντας, πέρα από τη διερεύνηση συγκεκριμένων μεταφορέων στη συσσώρευση του boscalid, έγινε προσπάθεια ανεξάρτητης εύρεσης και νέων γονιδίων που πιθανά να σχετίζονται με την ανθεκτικότητα του μύκητα έναντι του boscalid με τη χρήση του μεταθετού στοιχείου Minos. Σε πρώτο επίπεδο έγινε βελτιστοποίηση της μεθόδου ανίχνευσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos και στη συνέχεια απομονώθηκε στέλεχος με ένθεση του μεταθετού στοιχείου Minos στον υποκινητή του γονιδίου AN6927. Πιθανολογείται ότι, η πρωτεΐνη το γονίδιο AN6927 έχει ρόλο αισθητήρα τόσο για την αντίληψη της οσμωτικής καταπόνησης, όσο και για τη μεταγωγή σήματος και ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την πρόσληψη του boscalid, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.



## SUMMARY

Transporters are the transmembrane proteins that transfer substances to and from the cell. In particular, drug transporters provide protection to the host organisms because they are the means which transport the antimicrobial compounds from the host microenvironment into the invader's microorganisms cells. Sometimes, transporters are targets for the antimicrobial compounds and in other cases; they support the entry of the compounds into the target cells. While it is fundamental to design the drugs in order to serve as a connecting bond between the substance and the transporter, most of the times the selection of the desired antimicrobial compound is made according to its efficiency against a microbial disease with the minimum possible side effects to the host.

The current study offers an original analysis of the potential transporters which are involved in the accumulation of a group of antifungal compounds called Succinic Dehydrogenase Inhibitors (SDHIs) in *Aspergillus nidulans* cells. Generally, the substances belonging to this group are effective against several species of fungi that infect cultivated plants. After in depth investigation in several groups of substances, boscalid was chosen for extensive research. The paper analyzes its action and also focuses on the resistance mechanism of *Aspergillus nidulans* against boscalid. It is noted that the most common mechanisms of resistance against antifungal compounds are either overexpression or modification of the target while in other times it can be activation of efflux transporters in several strains like ABC or MFS transporters.

The toxicity of boscalid was tested in different species of the *Aspergillus* genus. The efficacy of the drug differed from species to species. At the same time, the phylogenetic analysis of the tested species according to the sequence of *sdhB*, the target protein, did not indicate any correlation between the protein sequence and the toxicity of boscalid against *Aspergillus* genus. It is noteworthy that the physiological conditions under which growth assays evolve, limit the efficacy of the drug against the target cell. It is important to underline the essential role of temperature in membrane fluidity and consequently to the diffusion of substances. Furthermore, pH has a basic role to the function of proton

symporters connected to the availability of protons in the growth media. A test that conducted under different physiological conditions proved that at high pH, transporters mediate the accumulation of boscalid, while in lower pH is achieved by both transporters and diffusion.

In addition, it is already known that the available nitrogen source regulates the expression of the transporters. Specifically, in presence of ammonium ions, as the sole nitrogen source, suppress the expression of transporters that accumulate alternative nitrogen sources, such as purine and pyrimidine transporters, which have low expression levels. So, when ammonium ions were the sole nitrogen source, it was observed that boscalid was ineffective against the wild-type strain of *Aspergillus nidulans*. This experiment showed that nucleotide transporters are likely to be involved in the accumulation of boscalid.

Boscalid's action mechanism was thoroughly investigated by using strains from the strain bank of Fungal Molecular Biology Laboratory; also, during this study, new strains were constructed with the desirable properties. In detail, growth assays were performed in strains with mutations in transcription factors, in presence of antifungal drugs. The *areA30* strain, with point mutation (Leu683Met) in the transcription factor's region, showed increased resistance against boscalid comparing to wild-type strain. At the same time, strain ( $\Delta 7$ ) with 7 deleted transporters (UapA, UapC, AzgA, FcyB, FurD, CntA and FurA) showed similar resistance. In order to investigate which of these 7 transporters are involved in the accumulation of boscalid in fungal cells, plasmid transformations took place;  $\Delta 7$  strain was used in order to have the same isogenetic background and the expression of the transporter was, each time, under the control of a strong promoter. The inversion of the persistent phenotype reveals the involvement of each of them in the accumulation of the pesticide. The results indicated that boscalid is accumulated by UapC, AzgA, FcyB, CntA and FurA. Conversely, UapA and FurD transporters are not involved in boscalid's accumulation process. The current research has proved that the three basic transporters FurA, AzgA, UapC, tagged with GFP, are endocytosed by their substances. More importantly in this study, endocytosis took place because of boscalid's presence.

In conclusion, the current research examined specific transporters in the accumulation of boscalid. Moreover, it focused on finding new genes that may be related to the resistance of the fungi to boscalid using the Minos transposon. At first, the current study optimized the insertion detection method of the Minos transposon. Then, a strain was isolated with an insertion of Minos transposon into the AN6927 gene promoter. There is a notion that gene AN6927 encodes a protein with role either as a sensor to the osmotic stress or/and the signaling transduction for gene activation associated with boscalid uptake; a process that needs further investigation.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
SUMMARY .....	9
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	15
1.1 Κύκλος ζωής και Συστηματική κατάταξη του <i>Aspergillus nidulans</i> .....	16
1.1.1 Α φυλετική αναπαραγωγή .....	18
1.1.2 Φυλετική αναπαραγωγή.....	19
1.1.3 Παραφυλετικός κύκλος.....	20
1.2 Γιατί αξίζει να μελετώνται οι μεταφορείς στους μύκητες ; .....	21
1.3 Μοριακά εργαλεία στη διάθεση του ερευνητή για τη μελέτη των μεταφορέων	22
1.4 Η διαφορά μεταξύ μεταφορέων και καναλιών.....	24
1.5 Η δράση των φαρμάκων και ο πιθανός ρόλος των μεταφορέων .....	26
1.6 Οι μεταφορείς των παθογόνων μικροοργανισμών: πύλες ή στόχοι για τα φάρμακα.....	27
1.7 Η πολυανθεκτικότητα στους μύκητες.....	29
1.7.1 Πολυανθεκτικά στελέχη του είδους <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29
1.7.2 Πολυανθεκτικά στελέχη του είδους <i>Candida albicans</i> .....	30
1.7.3 Πολυανθεκτικά στελέχη του είδους <i>A. fumigatus</i> .....	32
1.8 Μεταφορείς πουρινών, πυριμιδινών και αλλαντοΐνης στον <i>Aspergillus nidulans</i> .	33
1.8.1 Η NAT/NCS2 οικογένεια .....	33
1.8.2 Η NCS1 οικογένεια.....	35
1.8.3 Η οικογένεια AzgA .....	36
1.8.4 Η οικογένεια CNT .....	37
1.9 Μηχανισμοί δράσης και ανθεκτικότητας παρεμποδιστών της Αφυδρογονάσης Ηλεκτρικού Οξέος (SDHs) στους μύκητες. ....	37
1.9.1 Η εμφάνιση των SDHs .....	37

1.9.2 Ο μηχανισμός δράσης των Αναστολέων της Αφυδρογονάσης του Ηλεκτρικού οξέος .....	39
1.9.3 Μεταλλαγμένα στελέχη με ανθεκτικότητα στο boscalid.....	42
1.10 Η χρήση των μεταθετών στοιχείων στη μεταλλαξιγένεση .....	44
ΣΚΟΠΟΣ .....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
2.1 Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.....	48
2.2 Χημικά Διαλύματα και θρεπτικά υποστρώματα.....	50
2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από νεαρό μυκήλιο <i>Aspergillus nidulans</i> .....	54
2.4 Μετασηματισμός πρωτοπλαστών από κονιδιοσπόρια <i>Aspergillus nidulans</i> .....	55
2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>E coli</i> ( mini prep).....	56
2.6 Μέθοδος εύρεσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos .....	57
2.7 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων ( competent cells ) <i>E. coli</i> .....	63
2.8 Κατασκευή στελεχών σε ισογενετικό υπόβαθρο στελεχούς Δ7 και άλλων στελεχών. ....	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	69
3.1 Φυσιολογικές δοκιμασίες ανάπτυξης παρουσία αντιμυκητιακών φυτοφαρμάκων	70
3.2 Ευαισθησία των διαφορετικών ειδών <i>Aspergillus</i> στο boscalid και φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης στόχου. ....	72
3.3 Η κυτταροτοξικότητα του boscalid εξαρτάται από τις φυσιολογικές συνθήκες που επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των μεταφορέων .....	76
3.4 Στελέχη με επιλεγμένες μεταλλαγές και απαλοιφές σε γονίδια του <i>Aspergillus nidulans</i> αποκαλύπτουν τον τρόπο δράσης του boscalid .....	78
3.5 Πέντε μεταφορείς νουκλεοβάσεων σχετίζονται με την τοξικότητα του boscalid. .	80
3.6 Ενδοκύττωση των μεταφορέων παρουσία boscalid.....	82

3.7 Βελτιστοποίηση της αντίχνευσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos και χρήση αυτού για τη μελέτη νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας ουσιών με αντιμυκητιακή δράση.....	86
3.8 Εύρεση γονιδίων που πιθανότατα συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα σε αντιμυκητιακές ενώσεις.....	88
3.8.1 Στελέχη με ανθεκτικότητα στην Ιτρακοναζολη.....	89
3.8.1 Στελέχη με ανθεκτικότητα στο boscalid.....	94
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	98
4.1 Νέος μηχανισμός ανθεκτικότητας στο boscalid.....	99
4.2 Ενδοκύττωση των μεταφορέων παρουσία boscalid.....	103
4.3 Αποτελεσματική και η νέα μέθοδος εύρεσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos στον <i>Aspergillus nidulans</i> .....	104
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	107
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	116
Παραρτημα Ι.....	116
Παράρτημα ΙΙ.....	120

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Κύκλος ζωής και Συστηματική κατάταξη του *Aspergillus nidulans*

Το είδος *Aspergillus nidulans* κατατάσσεται συστηματικά ως εξής: Βασίλειο: Fungi, Διάρσηση: Eumycota, Υποδιάρσηση: Ascomycotina, Κλάση: Plectomycetes, Τάξη: Eurotiales, Οικογένεια: Trichocomaceae, Γένος: *Aspergillus*.

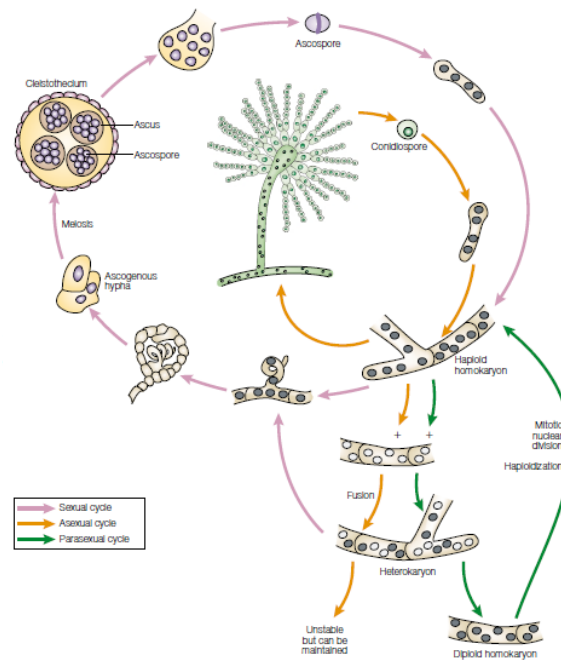
Ο πρώτος νηματοειδής μύκητας που χρησιμοποιήθηκε για γενετικές μελέτες ήταν η *Neurospora crassa*, από τους Beadle και Tatum το 1940, όπου καταδείχθηκε η σχέση μεταξύ γονιδίων και ενζύμων (Beadle and Tatum 1941). Δέκα περίπου χρόνια μετά, ο Guido Pontecorvo μελέτησε τη γενετική του *A. nidulans* και τον εισήγαγε ως πρότυπο οργανισμό. Η συμβολή των νηματοειδών μυκήτων στην κατανόηση διάφορων βιολογικών διαδικασιών είναι από τότε μέχρι σήμερα πολύ μεγάλη. Ενδεικτικά, οι νηματοειδείς μύκητες συνέβαλαν καταλυτικά στην κατανόηση του γενετικού ανασυνδιασμού, στη μελέτη της γονιδιακής ρύθμισης των υποκινητών και της μεθυλίωσης του DNA, καθώς επίσης και στην κατανόηση της δομής της χρωματίνης και του μιτοχονδριακού DNA. Επιπλέον, συνέδραμαν στη μελέτη της επιδιόρθωσης του DNA, της ρύθμισης του μεταβολισμού, της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, της μίτωσης και της πυρηνικής διαίρεσης, αλλά και στη μελέτη της κίνησης των πυρήνων και της λειτουργίας του κυτταροσκελετού, στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών απαραίτητων στην κίνηση, όπως είναι οι κινεσίνες και η δυνεΐνες, στη μελέτη της ανάπτυξης και της κυτταρικής διαφοροποίησης των μονοπατιών μεταγωγής σήματος και της ρύθμισης του pH.

Οι νηματοειδείς μύκητες που χρησιμοποιούνται για γενετικές μελέτες έχουν όλα ή τα περισσότερα από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά (Casselton and Zolan 2002): 1. Απλοειδή φάση, που επιτρέπει την τυχαία μεταλλαξιγένεση και επιλογή των επιθυμητών χαρακτηριστικών, καθώς και πολύ αποτελεσματικό γενετικό μετασχηματισμό. 2. Φάση δικάρου ή ετεροκάρου, για μελέτες συμπλήρωσης γονιδιακών λειτουργιών και επίστασης. 3. Την ικανότητα να αναπτύσσονται σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, που διευκολύνει την απομόνωση μεταλλαγών κατά συνθήκη θνησιγόνων γονιδίων (conditional lethals). 4. Ετεροθαλικά στελέχη για πραγματοποίηση διασταυρώσεων ή ομοθαλικά που, υπό συνθήκες, μπορούν να διασταυρωθούν. 5. Ομοθαλικά παράγωγα,



που επιτρέπουν τη δημιουργία μεταλλαγών σε απλοειδείς πυρήνες και στη συνέχεια, με αυτογονιμοποίηση, την επιλογή μεταλλαγών που σχετίζονται με την ικανότητα διαδικασιών των διπλοειδών (π.χ. μείωση). 6. Μικρά γονιδιώματα (12-50 Mb), που διευκολύνουν την ανάκτηση μεταλλαγών και τη γονιδιακή κλωνοποίηση. 7. Ικανότητα πραγματοποίησης ανάλυσης τετράδων, όπου και τα τέσσερα προϊόντα της μείωσης συγκροτούνται μαζί σε έναν ασκό, στους ασκομύκητες ή στην κορυφή ενός βασιδιακού κυττάρου, στους Βασιδιομύκητες. Αυτό επιτρέπει την άμεση εξέταση των γεγονότων μειωτικού ανασυνδιασμού και τη χαρτογράφηση γονιδίων.

Ο *A. nidulans* διαθέτει εξαιρετικό κύκλο ζωής, με φυλετική, αφυλετική και παραφυλετική αναπαραγωγή (Εικόνα 1.1), που θα περιγραφούν αναλυτικά στη συνέχεια. Η σταθερή εξελικτικά συνύπαρξη φυλετικού και αφυλετικού κύκλου σε ένα είδος έχει υπάρξει αντικείμενο μελετών, σχετικά με τη λειτουργικότητα της διττής αυτής φύσης. Επιπλέον, η συνύπαρξη αυτή σε ομοθαλικούς οργανισμούς όπως ο *A. nidulans*, των οποίων ο φυλετικός κύκλος πραγματοποιείται φυσιολογικά με αυτογονιμοποίηση, είναι εντυπωσιακή, δεδομένου ότι τα προϊόντα τόσο του αφυλετικού, όσο και του φυλετικού κύκλου έχουν ταυτόσημους γονότυπους και δε δημιουργείται ποικιλία μέσω ανασυνδιασμών και ανάμιξης γονιδίων. Μελέτες στον *A. nidulans* έχουν δείξει πως κατά το φυλετικό κύκλο, η τάση συσσώρευσης αρνητικών για τον οργανισμό μεταλλαγών είναι μειωμένη σε σχέση με τον αφυλετικό κύκλο (Bruggeman et al. 2003). Έχει προταθεί πως μία «στρατηγική» των οργανισμών για την καλύτερη επιβίωσή τους είναι η παραγωγή πολυάριθμων γαμετών ή ζυγωτών και η ενδο-οργανισμική επιλογή αυτών (Otto and Hastings 1998). Στον *A. nidulans*, τόσο στο φυλετικό, όσο και στον αφυλετικό κύκλο, η παραγωγή χιλιάδων σπορίων προτάθηκε πως εξυπηρετεί το σκοπό αυτό, ενώ οι διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ φυλετικού και αφυλετικού κύκλου στη συσσώρευση μεταλλαγών, θεωρήθηκε πως σχετίζονται με την αυτονομία των αναπαραγωγικών οργάνων, την οποία ο οργανισμός «επιβάλλει» αυστηρότερα στα φυλετικά όργανα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επίτευξη της ολοκλήρωσης της ανάπτυξης μόνο στα όργανα που προέρχονται από «υγιείς» πυρήνες, που μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη (Bruggeman et al. 2003).



**Εικόνα 1.1:** Το μυκήλιο του *A. nidulans* είναι ένα δίκτυο από διακλαδισμένες υφές συνδεδεμένων διαμερισμάτων ή κυττάρων, που το καθένα περιέχει πολλούς πυρήνες (κεντρική εικόνα). Το μυκήλιο αυτό ή ομοκάρυο, που αναπτύσσεται από μοναδικό απλοειδές σπόριο, διαφοροποιεί πολλά ταυτόσημα αφυλετικά κονιδιοσπόρια (αφυλετικός κύκλος). Ο *A. nidulans* είναι ομοθαλλικός, που σημαίνει ότι μπορεί να αυτογονιμοποιηθεί, αλλά μπορεί επίσης να διασταυρωθεί αρχίζοντας από σύντηξη ομοκάρων υφών με γενετικά διαφορετικούς πυρήνες (άσπρο και σκούρο πράσινο). Τα ετεροκάρνα που σχηματίζονται είναι ασταθή, αλλά μπορούν να διατηρήσουν μία ισορροπημένη αναλογία των διαφορετικών πυρήνων, αν οι γονεϊκοί πυρήνες έχουν διαφορετικές αυξοτροφικές μεταλλαγές και η ανάπτυξη πραγματοποιείται χωρίς τα αντίστοιχα συμπληρώματα. Η φυλετική αναπαραγωγή του *A. nidulans* έχει ως εξής: Στο σώμα παραγωγής φυλετικών σπορίων (fruiting body) ένα ζεύγος πυρήνων που προορίζεται για μείωση, διαιρείται συγχρόνως για να δημιουργήσει έναν πληθυσμό κυττάρων, γνωστό ως ασκογόνο υφή. Η υφή αυτή έχει πολλαπλές διακλαδώσεις και κάθε κορυφαίο της κύτταρο διαφοροποιείται σε ασκό, ένα εξειδικευμένο κύτταρο, όπου οι δύο απλοειδείς πυρήνες συντήκονται. Ο διπλοειδής πυρήνας εισέρχεται σε μείωση που ακολουθείται από μιτώσεις και σχηματίζονται 8 απλοειδή ασκοσπόρια. Το σώμα παραγωγής φυλετικών σπορίων, που καλείται κλειστοθήκιο, μπορεί να περιέχει δεκάδες χιλιάδες ασκοσπόρια, που απελευθερώνονται στο περιβάλλον, όταν το κλειστοθήκιο σπάσει. Επιπρόσθετα με το φυλετικό και τον αφυλετικό κύκλο, η ύπαρξη παραφυλετικού κύκλου προσδίδει κάποια από τα πλεονεκτήματα της μείωσης μέσω ενός μονοπατιού μιτώσεων. Ο παραφυλετικός κύκλος αρχίζει όταν οι απλοειδείς πυρήνες συντήκονται στα βλαστητικά κύτταρα ενός ετεροκαρύου (σωματικό διπλοειδές) και συνεχίζουν να διαιρούνται μιτωτικά. Επιχιασμοί μπορούν να συμβούν και η τυχαία απώλεια χρωμοσωμάτων αποκαθιστά τον απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων, που είναι 8.

### 1.1.1 Α φυλετική αναπαραγωγή

Πολλοί μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένου του *A. nidulans*, παράγουν κονίδια για να επιβιώσουν στις δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης και για να διασπαρθούν σε νέα

περιβάλλοντα. Η κονιδιοποίηση ευνοείται όταν βλαστητικά κύτταρα που έχουν αποκτήσει αναπτυξιακή ικανότητα (Axelrod *et al.* 1973) υπόκεινται σε επαγωγικά σιινάλα, που δεν είναι κατανοητά στο σύνολό τους, αλλά περιλαμβάνουν μειωμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών (Saxena and Sinha 1973) και κόκκινο φως (Mooney and Yager 1990).

Η αφυλετική διαφοροποίηση περιλαμβάνει το σχηματισμό του οργάνου κονιδιοποίησης, που ονομάζεται κονιδιοφορέας. Η πρώτη εκδήλωση της διαφοροποίησης του κονιδιοφορέα είναι η ανάπτυξη μιας εναέριας υφής, από ένα κύτταρο σύνδεσης του κονιδιοφορέα με το υπόστρωμα, το ποδικό κύτταρο. Η εναέρια υφή είναι παρόμοια με τη βλαστητική σε ότι αφορά την πολωμένη αύξηση, αλλά η επιμήκυνσή της σταματάει όταν φτάσει σε ύψος περίπου 100 μm. Στο σημείο αυτό, η εναέρια υφή υπόκειται σε μια διμορφική μετάπτωση, με το άκρο της να αναπτύσσεται μη πολωμένα και να διογκώνεται σχηματίζοντας τελικά το κυστίδιο του κονιδιοφορέα (*vesicle*), ενώ το υπόλοιπο τμήμα της αποτελεί το μίσχο (*stalk*). Τα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια του κονιδιοφορέα περιλαμβάνουν μη πολική ανάπτυξη ή εκβλάστηση. Το κυστίδιο σχηματίζει με εκβλάστηση μια σειρά κυττάρων, που ονομάζονται πρωτογενή στηρίγματα (*primary sterigmata*) ή μετούλες (*metulae*) και τα οποία διαθέτουν έναν πυρήνα που προέρχεται από διαίρεση των πυρήνων του κυστιδίου. Οι μετούλες με μία ή πολλαπλές εκβλαστήσεις δημιουργούν τα δευτερογενή στηρίγματα (*secondary sterigmata*) ή φιαλίδια (*phiallidae*). Τα φιαλίδια παράγουν με εκβλάστηση μία σειρά από κονιδιοσπόρια. Τα φιαλίδια θεωρούνται ως ένας τύπος βλαστοκυττάρων, επειδή παράγουν επαναλαμβανόμενα ένα νέο τύπο διαφοροποιημένου κυττάρου, ενώ διατηρούν αναλλοίωτη τη δικιά τους ταυτότητα. Τα κονιδιοσπόρια είναι σφαιρικά σπόρια, με παχύ, αδιαπέραστο και υδρόφοβο κυτταρικό τοίχωμα, τα οποία βρίσκονται σε ληθαργική, αδρανή κατάσταση, όπου μπορούν να διατηρηθούν για χρόνια (Timberlake 1993).

### 1.1.2 Φυλετική αναπαραγωγή

Κατά τον φυλετικό κύκλο του *A. nidulans* σχηματίζεται ένα σώμα παραγωγής φυλετικών σπορίων, που ονομάζεται κλειστοθήκιο, στον οποίο δύο πυρήνες πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν την ασκογόνο υφή. Η ασκογόνος υφή διακλαδίζεται επανειλημμένα και στην κορυφή της κάθε μίας δημιουργείται ένα διαφοροποιημένο κύτταρο με δύο

πυρήνες, ο ασκός. Οι απλοειδείς πυρήνες συντήκονται στον ασκό και σχηματίζουν ένα ζυγωτό, το οποίο εισέρχεται σε μείωση και δύο ακόλουθες μιτώσεις από τις οποίες παράγονται οχτώ ασκοσπόρια, το καθένα με δύο απλοειδείς πυρήνες. Ο *A. nidulans* είναι ομοθαλλικός μύκητας, που σημαίνει ότι δεν έχει διαφορετικούς συζευκτικούς τύπους και αυτογονιμοποιείται (*selfing*). Οι τύποι ζευγαρώματος στους ετεροθαλλικούς μύκητες καθορίζονται από την ύπαρξη ενός εκ των δύο  $a$  και HMG γονιδίων, τα οποία, ενώ καταλαμβάνουν την ίδια θέση στο γονιδίωμα, οι αλληλουχίες τους δε σχετίζονται. Ο *A. nidulans* διαθέτει τόσο το  $a$ , όσο και το HMG γονίδιο, τα οποία καταλαμβάνουν μη συνδεδεμένες θέσεις στο γονιδίωμα. Η διασταύρωση διαφορετικών στελεχών στον *A. nidulans* είναι φυσιολογικά εξαιρετικά σπάνια, γιατί περιλαμβάνει τη φάση του σωματικού ετεροκάρυου, το οποίο είναι ασταθές. Εργαστηριακά, η διασταύρωση διαφορετικών στελεχών επιτυγχάνεται όταν αυτά φέρουν διαφορετικές αυξοτροφίες, που δεν παρέχονται στο μέσο καλλιέργειας, οπότε το ετεροκάρυο σταθεροποιείται, λόγω της αδυναμίας κάθε στελέχους να αναπτυχθεί ξεχωριστά. Η διασταύρωση διαφορετικών στελεχών στον *A. nidulans* δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας νέων στελεχών και χαρτογράφησης γονιδίων, ακόμα και μεταλλαγών στο ίδιο γονίδιο, λόγω της υψηλής συχνότητας ανασυνδιασμών κατά τη μείωση (Scazzocchio 2006).

### 1.1.3 Παραφυλετικός κύκλος

Ο παραφυλετικός κύκλος αρχίζει με την αναστόμωση των υφών διαφορετικών στελεχών, που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ετεροκαρύου, όπου διαφορετικοί πυρήνες συνυπάρχουν στο ίδιο κυτταρόπλασμα. Οι διαφορετικοί πυρήνες μπορεί να συντηθούν και να σχηματίσουν ένα διπλοειδές ομοκάρυο, το οποίο είναι ασταθές και στις επικείμενες μιτώσεις υφίσταται απλοειδοποίηση με τυχαία απώλεια χρωμοσωμάτων. Κατά τη μίτωση, οι επιχιασμοί που μπορούν να συμβούν είναι σπάνιοι και έτσι γονίδια που εντοπίζονται στο ίδιο χρωμόσωμα συνήθως δε διαχωρίζονται. Ο παραφυλετικός κύκλος χρησιμοποιείται ως εναλλακτικός και ταχύτερος τρόπος δημιουργίας ποικιλίας, όταν οι υπό μελέτη ιδιότητες εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και δε χρειάζεται επιχιασμός για να ανακατευτούν.

## 1.2 Γιατί αξίζει να μελετώνται οι μεταφορείς στους μύκητες ;

Όλα τα είδη των κυττάρων απαραίτητως χρειάζονται να επικοινωνήσουν με το φυσικό τους περιβάλλον. Αυτή η επικοινωνία επιτυγχάνεται με τον έλεγχο της πρόσληψης ουσιών (uptake) και με τον έλεγχο της απομάκρυνσής τους από το κύτταρο (efflux), όπου είτε ο μύκητας δεν χρειάζεται είτε η συγκέντρωση κάποιων ουσιών έχει φτάσει σε τοξικά επίπεδα. Τέτοιες ουσίες είναι κυρίως δευτερογενείς μεταβολίτες, θρεπτικά συστατικά και ιόντα. Η πρόσληψη και η απομάκρυνση προς το εξωκυτταρικό περιβάλλον αυτών των διαλυτών ουσιών και των ιόντων εξαρτάται από ειδικές πολυτοπικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες, που κατηγοριοποιούνται σε δυο κατηγορίες: σε μεταφορείς μεταβολιτών και άλλων υδατοδιαλυτών ουσιών και σε κανάλια ιόντων (Gouaux and Mackinnon 2005; Rudnick 2013).

Οι μεταφορείς λειτουργούν σαν ένζυμα και διαθέτουν ένα κύριο ενεργό κέντρο το οποίο δεσμεύει το υπόστρωμα από τη μια πλευρά της μεμβράνης. Στη συνέχεια αλλάζει η στερεοδομή της πρωτεΐνης και το ενεργό κέντρο μαζί με το υπόστρωμα εκτίθενται ενδοκυτταρικά, όπου το υπόστρωμα σταδιακά απελευθερώνεται ενδοκυτταρικά (Mirza *et al.* 2006, Kaback 2015).

Η βιολογική σημασία των μεταφορέων και των καναλιών στην κυτταρική λειτουργία σχετίζεται με τη διατροφή, την ομοιόσταση, τη σηματοδότηση, την άμυνα, και την αποτοξίνωση. Η δυσλειτουργία τους σχετίζεται με αρκετές ανθρώπινες ασθένειες (π.χ, κυστική ίνωση, ο διαβήτης, ελαττώματα νευροδιαβίβασης κ.α) (DiFrancesco and DiFrancesco 2015). Επιπλέον, οι μεταφορείς έχουν άμεση σχέση με την ευαισθησία στα φάρμακα ή την απόκτηση ανθεκτικότητας (Wong *et al.* 2014). Ακόμη η σημαντικότητα της ύπαρξης μεταφορέων στο κύτταρο αντιστακλάται από το γεγονός ότι το 8-10% των γονιδίων των οργανισμών στους οποίους έχει αλληλουχηθεί το γονιδίωμά τους, αντιστοιχούν σε μεταφορείς.

Οι νηματοειδής μύκητες είναι πρωτοπόροι στα παραπάνω ποσοστά αφού τουλάχιστον το 10-12 % των γονιδίων τους κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεταφορέων (Ren *et al.* 2007). Σε *in silico* ανάλυση του γένους *Aspergillus* φαίνεται να διαθέτει πάνω από 120 διαφορετικές οικογένειες μεταφορέων. Μερικοί είναι αποκλειστικά του γένους αυτού, ορισμένοι

ειδικοί για μύκητες, μερικοί αποκλειστικά μικροβίων, και άλλοι παρόντες σε όλες τις μορφές ζωής. Οι περισσότεροι μεταφορείς μεταζώων έχουν ομόλογες πρωτεΐνες μυκήτων και φαινομενικά παρόμοιους μηχανισμούς υποκυτταρικής έκφρασης. Πρότυποι οργανισμοί όπως οι *Saccharomyces cerevisiae* και *A. nidulans* παρέχουν μοναδικά νέα γενετικά, βιοχημικά και κυτταρικά εργαλεία, που επιτρέπουν τη μελέτη της δομής και της λειτουργίας των μεταφορέων, της ρύθμισης της έκφρασης και αποδόμησης των μεταφορέων σε ζωντανά κύτταρα (Pantazopoulou and Diallinas 2007α, Diallinas 2016). Ειδικότερα ο *A. nidulans* χρησιμοποιείται από τη δεκαετία του 1990 ως ένα πρότυπο σύστημα στο οποίο έχουν γίνει πάρα πολλές μελέτες σχετικά με τη βιολογική λειτουργία των μεταφορέων, όπως είναι η ρύθμιση της έκφρασης, η μεμβρανική διακίνηση, η σχέση δομής και λειτουργίας, η εκλεκτικότητα των υποστρωμάτων και η μοριακή εξέλιξη των μεταφορέων. Αυτό αποτέλεσε μια λογική συνέχεια της υπάρχουσας γενετικής γνώσης και της μοναδικότητας που συνδυάζει η γενετική του *Aspergillus* με ειδικά εργαλεία που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια (Pantazopoulou and Diallinas 2007β, Diallinas 2014, 2016).

### 1.3 Μοριακά εργαλεία στη διάθεση του ερευνητή για τη μελέτη των μεταφορέων

Υπάρχουν μεταφορείς που εξυπηρετούν τις ίδιες ή παρόμοιες ανάγκες για το κύτταρο των μυκήτων, γεγονός που αποτελεί πρόβλημα στην ανάπτυξη του επιθυμητού φαινοτύπου για τη μελέτη ενός νέου μεταφορέα. Με τη δυνατότητα όμως που υπάρχει σε οργανισμούς, όπου το γονιδίωμά τους έχει αλληλουχηθεί πλήρως και είναι γνωστές οι λειτουργίες πολλών γονιδίων ή και πιθανές μη μελετημένων, είναι δυνατόν να γίνουν απλές και σύντομες δοκιμές πρόσληψης σε μόλις εκβλαστημένα κονιδιοσπόρια. Το στέλεχος που έχει χρησιμοποιηθεί κατά βάση για τη μελέτη των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων και δεν έχει καμία ανιχνεύσιμη ικανότητα μεταφοράς νουκλεοτιδικών βάσεων, έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα τέλειο εργαλείο για τον χαρακτηρισμό άλλων δευτερευόντων ή κρυπτικών μεταφορέων που σχετίζονται με τις πουρίνες και τις πυριμιδίνες (Amillis *et al.* 2007). Στο στέλεχος αυτό, το οποίο ονομάστηκε Δ7, απουσιάζουν επτά μεταφορείς οι οποίοι είναι οι UapA, UapC, AzgA,

CntA, FurA, FurD και FcyB. Το στέλεχος Δ7 επιτρέπει τον απευθείας λειτουργικό χαρακτηρισμό οποιουδήποτε μεταφορέα, με πιθανή λειτουργία τη μεταφορά νουκλεοσιδίων ή νουκλεοτιδικών βάσεων από διαφορετικά είδη *Aspergillus* (Krypotou et al. 2015α) και πιθανότατα από οποιοδήποτε άλλο μύκητα. Τέλος, το στέλεχος αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό οποιουδήποτε μεταφορέα νουκλεοτιδικών βάσεων, νουκλεοσιδίων και αλλαντοΐνης, από οποιοδήποτε ευκαρυωτικό οργανισμό, αν υπάρχουν οι κατάλληλοι κυτταρικοί μηχανισμοί μεμβρανικής διακίνησης και ενσωμάτωσης στην πλασματική μεμβράνη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, η χρήση των φθορίζουσών πρωτεϊνών αποτέλεσε σταθμό στη μελέτη των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, τόσο για τη μελέτη της έκφρασης, όσο και για την τοπολογία και τη μεμβρανική διακίνηση αυτών (Valdez-Taubas *et al.* 2000α). Οι μεταφορείς σημαίνονται συνήθως στο καρβοξυτελικό κυρίως άκρο τους και όχι στο αμινοτελικό, διότι το τελευταίο είναι κρίσιμο για μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις και για τη μετατόπιση του μέσω της τρανσλοκάσης στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι μεταφορείς της πλασματικής μεμβράνης σημασμένοι με Πράσινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη GFP (Green Florescence Protein) οριοθετούν την περιφέρεια της μεμβράνης του *Saccharomyces cerevisiae* ή του κυττάρου της υψής. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση είκοσι διαφορετικών μυκητιακών μεταφορέων δείχνουν ότι δεν υπάρχει *a priori* τρόπος για να προβλεφθεί αν η σήμανση ενός μεταφορέα θα επηρεάσει τον εντοπισμό ή τη λειτουργία του. Για παράδειγμα, οι μεταφορείς της οικογένειας NAT (Nucleobase Ascorbate Transporters) σημασμένοι με την GFP έχουν τα ίδια κινητικά χαρακτηριστικά με τους αντίστοιχους μη-σημασμένους μεταφορείς. Όσον αφορά στους μεταφορείς των οικογενειών MFS (Major Facilitator Superfamily), APC (Amino acid-Polyamine-organoCation), και NCS1 (Nucleobase Cation Symporter 1), αυτοί μπορεί να έχουν διαφορετική σταθερότητα ή λειτουργική ικανότητα με ή χωρίς σημασμένο το αμινοτελικό άκρο με GFP. Επιπρόσθετα, η σταθερότητα και λειτουργία του μεταφορέα μπορεί να εξαρτάται από τον πιθανό συνδέτη μεταξύ του μεταφορέα και της GFP (Tavoularis *et al.* 2001). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι, τα μυκητιακά συστήματα μελέτης μας επιτρέπουν τη μελέτη της λειτουργίας οποιουδήποτε μεταφορέα, μέσω της σύγκρισης της ικανότητας δέσμευσης του υποστρώματος και του προφίλ ειδικότητας του κάθε μεταφορέα σημασμένου ή όχι με GFP. Τέλος η σήμανση με GFP μας παρέχει ένα



πολύ αξιόλογο εργαλείο προκειμένου να κατατάσσονται οι μεταλλαγές των μεταφορέων σε δύο μεγάλες ομάδες: εκείνες που επηρεάζουν την υποκυτταρική έκφραση, τοπολογία στη μεμβράνη και σταθερότητα του μεταφορέα και εκείνες που επηρεάζουν τη δράση του μεταφορέα (Diallinas 2016).

## 1.4 Η διαφορά μεταξύ μεταφορέων και καναλιών

Οι όροι μεταφορείς, περμεάσες, εναλλάκτες, αντλίες εισροής ή εκροής, διαμεσολαβητές, κανάλια ή πόροι, χρησιμοποιούνται για διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεταφοράς θρεπτικών συστατικών, μεταβολιτών, φαρμάκων, ξενοβιοτικών ή ιόντων, μέσω της πλασματικής μεμβράνης. Οι μεταφορείς διαθέτουν μοναδικό σημείο στο οποίο γίνεται η σύνδεση με το υπόστρωμα. Σε κάθε κύκλο μεταφοράς συνδέεται ένα υπόστρωμα και χαρακτηρίζεται από κινητικές σταθερές Michaelis-Menten. Η σύνδεση με το υπόστρωμα οφείλεται σε αλλαγή της στερεοδιάταξης του μεταφορέα όπως και η σταδιακή μετατροπή από την ανοιχτή δομή από τον εξωκυττάριο χώρο, προς την ανοιχτή δομή προς τον ενδοκυττάριο χώρο και τελικά την απελευθέρωση του υποστρώματος. Με άλλα λόγια, οι μεταφορείς δε διαθέτουν ένα συνεχόμενο ανοιχτό πόρο που είναι προσβάσιμος και από τις δύο πλευρές της μεμβράνης (Kaback *et al.* 2011). Οι μεταφορείς καταλύουν τη μεταφορά  $10^2$ - $10^5$  μορίων υποστρώματος ανά δευτερόλεπτο και τις περισσότερες φορές φαίνεται να λειτουργούν ως μονομερή και αποτελούνται από διαμεμβρανικές περιοχές, κυρίως α-έλικες, οι οποίες είναι πολύ καλά πακεταρισμένες και συνδέονται μεταξύ τους με υδρόφιλες λούπες διαφορετικού μήκους. Επιπρόσθετα, υδρόφιλες θηλιές εκτός της μεμβράνης μπορεί να συμμετέχουν στην αναγνώριση του υποστρώματος. Επίσης, είναι γνωστό ότι και τα ενδοκυτταρικά υδρόφιλα άκρα των μεταφορέων έχουν πολύ μεγάλο ρόλο σε μετα-μεταφραστική ρύθμιση, στη μεταφορά της σωστά διπλωμένης πρωτεΐνης στη μεμβράνη και στην ανανέωση αυτής μέσω του φαινομένου της ενδοκύττωσης. Τέλος, οι μεταφορείς μπορούν να δράσουν σαν εναλλάκτες (facilitators) (μεταφορά υποστρώματος υπό την επίδραση κλίσης συγκέντρωσης), ως ενεργοί μεταφορείς (μεταφέροντας το υπόστρωμα έναντι της κλίσης συγκέντρωσης με την κατανάλωση ATP ή πιο κοινά με τη συμεταφορά ή αντιμεταφορά  $H^+$ ,  $Na^+$  ή άλλων ιόντων) ή ως αντιμεταφορείς όπου διαφορετικά υποστρώματα μεταφέρονται σε αντίθετες κατευθύνσεις. Ελάχιστες είναι εκείνες οι ουσίες που διαχέονται μέσω της μεμβράνης και



δε χρησιμοποιούν κάποιο τρόπο μεταφοράς από τους παραπάνω. Τέτοιες ουσίες είναι η αιθανόλη και ορισμένα μικρού μοριακού βάρους αέρια. Γίνεται κατανοητό ότι η δράση των αντιβιοτικών και άλλων ειδών φαρμάκων εξαρτάται από τη δράση ορισμένων μεταφορέων, οι οποίοι συμβάλλουν είτε στην εισροή είτε στην εκροή των ουσιών αυτών προς και από το κύτταρο, αντίστοιχα. Αν και υπάρχει αρκετή πληροφόρηση για τον μηχανισμό εκροής των φαρμάκων από το κύτταρο οδηγώντας σε πολυανθεκτικότητα ή πλειοτροπική ανθεκτικότητα των καρκινικών κυττάρων και των παθογόνων μικροοργανισμών (Niero *et al.* 2014, Paul and Moye-Rowley 2014), ελάχιστα είναι γνωστά για την πρόσληψη των φαρμάκων από το κύτταρο στόχος.

Σε αντίθεση με τους μεταφορείς, τα κανάλια ή πόροι, μεταφέρουν κυρίως μικρού μοριακού βάρους μόρια όπως νερό, ουρία, γλυκερόλη ή ιόντα. Έχουν επίσης εντελώς διαφορετικούς μηχανισμούς λειτουργίας σε σύγκριση με τους μεταφορείς και φυσικά διαφορετική δομή από αυτούς. Όπως και οι μεταφορείς, έτσι και τα κανάλια αποτελούνται από αρκετές διαμεμβρανικές περιοχές που έχουν δομή α-έλικας, αλλά το λειτουργικό κυρίως μέρος τους αποτελείται από ομο-ολιγομερή, που δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση δύο ή περισσότερων λειτουργικών υπομονάδων. Τα κανάλια δυνητικά αποτελούνται από ένα συνεχή πόρο. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτός ο πόρος περιορίζεται από τα αποκαλούμενα φίλτρα εκλεκτικότητας και η είσοδος ελέγχεται από τομείς ή πύλες. Φίλτρα εκλεκτικότητας είναι τα στενά τμήματα του πόρου, το μέγεθος και το φορτίο των οποίων είναι προσαρμοσμένο για ειδικά ιόντα. Όταν ένα κανάλι είναι ανοιχτό, τότε ένα ή περισσότερα ιόντα κατευθύνονται προς την μια πλευρά της μεμβράνης, ανάλογα με την κλίση συγκέντρωσης. Τα κανάλια λειτουργούν κυρίως ως διαμεσολαβητές και είναι πολύ πιο γρήγορα στη μεταφορά του υποστρώματός τους σε σχέση με τους μεταφορείς.

Η σημαντικότητα των μεταφορέων αντικατοπτρίζεται στις εξήντα και πλέον γενετικές ασθένειες που προκαλούνται από τη δυσλειτουργία πρωτεϊνών μεταφορέων και καναλιών στα θηλαστικά (λ.χ. Κυστική Ίνωση, Ασθένεια Menkes/Wilsons, μη ινσουλινο-εξαρτώμενος διαβήτης κ.α.). Τέλος, θα πρέπει να υπογραμμιστεί ξανά ότι οι μεταφορείς είναι ρυθμιστές κλειδιά στη δράση των φαρμακευτικών ενώσεων και ειδικότερα των αντιβιοτικών.

## 1.5 Η δράση των φαρμάκων και ο πιθανός ρόλος των μεταφορέων

Οι φαρμακοφόρες ουσίες, οι οποίες επιλέγονται για να αποτελέσουν τη δραστική ουσία του φαρμακευτικού σκευάσματος, κρίνονται από την αποτελεσματικότητά τους έναντι των συμπτωμάτων της νόσου και κατά από το πόσο γρήγορα και εύκολα αυτά κατευνάζονται, με όσο το δυνατό λιγότερες παρενέργειες για τον οργανισμό που νοσεί. Τις περισσότερες φορές μια δραστική ουσία χρειάζεται να περάσει την πλασματική μεμβράνη για να δράσει στο στόχο, ωστόσο γνωρίζουμε πάρα πολύ λίγα για το πως το φάρμακο το επιτυγχάνει αυτό. Ορισμένα φάρμακα είναι υδρόφοβες ενώσεις, που προφανώς διαπερνούν το λιπιδικό πρόσκομμα της μεμβράνης με μη υποβοηθούμενη διάχυση. Σε άλλες περιπτώσεις υδρόφιλα φάρμακα εγκλείονται σε λιποσώματα τα οποία συντήκονται και διαπερνούν τη λιπιδική διπλοστιβάδα των κυττάρων. Ωστόσο, η πλειονότητα των φαρμάκων, υδρόφοβης και μη φύσεως, εισέρχονται εντός του κυττάρου με άγνωστους μεταφορείς και διαμεσολαβητές (Kell *et al.* 2013, Lanthaler *et al.* 2011). Κατά γενική ομολογία σύμφωνα με αυτά που αναφερθήκαν παραπάνω, τα περισσότερα από τα μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενα φάρμακα, δρουν μη ειδικά προς κύτταρα στόχους ή τα φυσιολογικά υγιή κύτταρα.

Με στόχο την αύξηση της ειδικότητας πρόσληψης των φαρμάκων, πρέπει να σχεδιαστούν φάρμακα που να προσλαμβάνονται από συγκεκριμένους μεταφορείς και ιδανικά από μεταφορείς που εκφράζονται αποκλειστικά ή κατά το πλείστον στα κύτταρα στόχους. Είτε αυτά είναι κύτταρα παθογόνων μικροοργανισμών, είτε καρκινικά κύτταρα. Σε ορισμένα αντικαρκινικά φάρμακα αυτό έχει καταστεί δυνατό, μέσω της δράσης συγκεκριμένων μεταφορέων, όπως ο μεταφορέας πεπτιδίων PepT1 (Nakanishi *et al.* 2000). Τα περισσότερα όμως από τα αντιβακτηριακά, αντιμυκητιακά, αντιπρωτοζωικά ή αντικαρκινικά φάρμακα, που χρησιμοποιούνται δεν έχουν σχεδιαστεί με τη λογική να αναγνωρίζονται αποκλειστικά από συγκεκριμένους μεταφορείς των κυττάρων-στόχων.

Ορισμένα από τα μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενα φάρμακα δε χρειάζεται να διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη για να φτάσουν το στόχο τους, αλλά έχουν σαν στόχο ευαίσθητα συστατικά της μεμβράνης όπως είναι κάποιοι μεταφορείς, κάποια κανάλια ή αισθητήρες που απαντώνται στην κυτταρική μεμβράνη (Kell *et al.* 2013). Οι ABC

μεταφορείς, οι οποίοι συμβάλουν στην εκροή των φάρμακων και ξενοβιοτικών ουσιών από το καρκινικό κύτταρο, μπορούν να αποτελέσουν πιθανοί στόχοι των φαρμάκων (Choi and Yu 2014, Paul and Moye-Rowley 2014).

Οι Ρ-γλυκοπρωτεΐνες (MDR1), καλά μελετημένα μέλη των ABC μεταφορέων, έχουν αποτελέσει στόχο φαρμακευτικών ουσιών (Saneja *et al.* 2014). Από τις Ρ-type ΑΤΡασες, οι  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ΑΤΡασες και οι  $\text{H}^+/\text{K}^+$  ΑΤΡασες μπορούν να στοχευθούν σχετικά εύκολα και να αποτελέσουν φαρμακευτικό στόχο (Alexander 2011). Εκτός από τους ABC μεταφορείς εκροής, υποψήφιοι στόχοι για κάποια φάρμακα μπορούν να αποτελέσουν οι μεταφορείς εισροής μεταβολιτών (Saneja *et al.* 2014). Οι αναστολείς του μεταφορέα κατεχολαμίνης (SLC6A) και οι συμμεταφορείς Na-K-Cl ή Na-Cl (SLC12A) χρησιμοποιούνται κυρίως, ως αντι-υπερτασικά και διουρητικά φάρμακα (Stahl *et al.* 2013). Τέλος, πολλά από τα χρησιμοποιούμενα φάρμακα δεν στοχεύουν σε μεταφορείς αλλά σε μεμβρανικές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως υποδοχείς εμπλεκόμενοι στην κυτταρική σηματοδότηση. Για παράδειγμα, οι G-protein coupled receptors (GPCRs) αποτελούν στόχο για περισσότερο από το ένα τέταρτο των σημερινών φάρμακων, σε άκρα αντίθεση με τους αναστολείς των μεταφορέων που είναι περίπου δέκα φορές λιγότεροι (Rask-Andersen *et al.* 2014).

## 1.6 Οι μεταφορείς των παθογόνων μικροοργανισμών: πύλες ή στόχοι για τα φάρμακα

Τα βακτήρια, οι μύκητες τα πρωτόζωα διαθέτουν πλήθος μεταφορέων, πολλοί από τους οποίους δεν απαντώνται στους ανώτερους ευκαριωτικούς οργανισμούς (<http://www.membranetransport.org>, (Ren *et al.* 2004). Επιπρόσθετα, ακόμα και σε περιπτώσεις που τα κύτταρα ξενιστές και τα κύτταρα των μικροοργανισμών διαθέτουν παρόμοιες δραστηριότητες μεταφορέων, αυτοί χαρακτηρίζονται από διακριτά κινητικά χαρακτηριστικά και διακριτή εξειδίκευση. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι οι μεταφορείς των παθογόνων μικροοργανισμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν ειδικές δίοδοι αντιμικροβιακών ουσιών. Συμβατή με αυτή την ιδέα είναι η δυνατότητα συστηματικού και πλήρους χαρακτηρισμού των μεταφορέων των σημαντικότερων παθογόνων.

Ένα από τα μεγάλα προβλήματα στη μελέτη της λειτουργίας και εξειδίκευσης ενός μεταφορέα, είναι η ύπαρξη ενός πλήθους μεταφορέων με επικαλυπτόμενες ιδιότητες σε περισσότερους από έναν οργανισμούς. Η παρόμοια κινητική και η εξειδίκευση ενός μεταφορέα σε σχέση με άλλους μεταφορείς είναι συχνό φαινόμενο. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί μόνο με τη μελέτη ενός μεταφορέα, σε κατάλληλο γενετικό υπόβαθρο, στερούμενο άλλων λειτουργικά σχετιζόμενων μεταφορέων. Τέτοια στελέχη μπορούν εύκολα να κατασκευασθούν και να δοκιμαστούν με συνδυασμό πολλών διαγραμμένων γονιδίων (knock-out) σε πρότυπους οργανισμούς όπως, οι *E. coli*, *A.nidulans* ή *S. cerevisiae* (Keniya *et al.* 2013, Goudela *et al.* 2006). Οι μεταφορείς από παθογόνα μικρόβια επίσης μπορούν να απομονωθούν, να εκφραστούν και να χαρακτηριστούν λειτουργικά σε κατάλληλα στελέχη πρότυπων συγγενών οργανισμών. Ενδεικτικό είναι αυτό που για παράδειγμα συνέβη για ένα αριθμό μεταφορέων πουρινών από τους *A. fumigatus* και *C. albicans*, οι οποίοι μελετήθηκαν σε *A. nidulans* ή *S. cerevisiae* και ορισμένοι μεταφορείς πρωτόζωων, που μελετήθηκαν στον *S. cerevisiae* (Natto *et al.* 2005, Papageorgiou *et al.* 2008).

Μια εναλλακτική λύση για την εκμετάλλευση των μικροβιακών μεταφορέων είναι η χρήση τους, όχι ως πύλες φαρμάκων, αλλά ως στόχοι φαρμάκων, σε ειδικές όμως περιπτώσεις όπου οι μεταφορείς είναι απαραίτητοι για την επιβίωση ή την μολυσματικότητα του παθογόνου. Παράδειγμα αποτελεί η *Borrelia burgdorferi*, ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου Lyme, η οποία μεταδίδεται στον άνθρωπο από το τσίμπημα μολυσμένων τσιμπουριών που ανήκουν σε μερικά είδη του μολυσματικού γένους *Ixodes*. Η μόλυνση συνήθως εξαλείφεται με αντιβιοτικά, μόνο εάν διαγνωσθεί και αντιμετωπιστεί νωρίς, ωστόσο μερικά άτομα δεν αποκρίνονται σε στην αγωγή. Επιπλέον, τα μέχρι σήμερα σχετικά εμβόλια προκαλούν αυτοάνοσες παρενέργειες στους λήπτες και έχουν μεγάλο κόστος. Μια εναλλακτική, εξαιρετικά στοχευμένη φαρμακολογική προσέγγιση, μπορεί να αναπτυχθεί με βάση το γεγονός ότι ο *B. burgdorferi* στερείται των ενζύμων που απαιτούνται για την *de novo* σύνθεση των πουρινών. Ως εκ τούτου, ο κύκλος ζωής του και η μολυσματικότητα εξαρτώνται από δύο μεταφορείς πουρινών της οικογένειας NAT τους BBB22 και BBB23. Αυτό υποστηρίζεται από την παρατήρηση ότι στέλεχος *B. Burgdorferi*, στο οποίο είχαν απενεργοποιηθεί τα γονίδια *bbb22-23*, ήταν μη μολυσματικό σε ποντικούς (Jain *et al.* 2012). Έτσι, οποιαδήποτε ένωση

αναστέλλει ειδικά τους BBB22/23 μεταφορείς, θα μπορούσε ενδεχομένως να χρησιμεύσει ως ένα πολύ εξειδικευμένο φάρμακο για θεραπεία της Βορρελίωση. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι BBB22/23 μεταφορείς ανήκουν σε μια υποοικογένεια NAT, που ονομάζεται AzgA (Cecchetto *et al.* 2004), η οποία απουσιάζει από τον άνθρωπο, ενισχύοντας την πρόβλεψη ότι ειδικά φάρμακα που στοχεύουν τους BBB22/23 μεταφορείς δεν θα προσλαμβάνονται από ανθρώπινα κύτταρα, και πολύ πιθανώς δεν θα προκαλούν ανεπιθύμητες παρενέργειες.

## 1.7 Η πολυανθεκτικότητα στους μύκητες

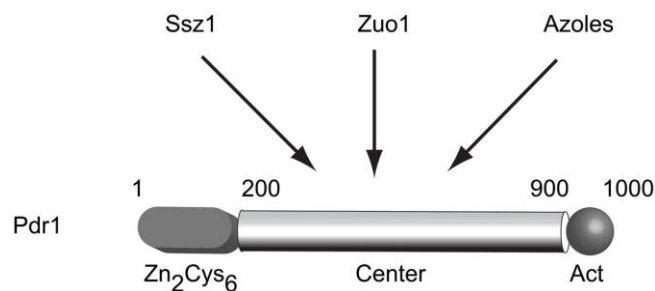
### 1.7.1 Πολυανθεκτικά στελέχη του είδους *Saccharomyces cerevisiae*

Έχουν αναπτυχθεί νέας γενιάς αντιμυκητιακά φάρμακα, όπως είναι οι αζόλες και οι εχινοκαρδίνες, τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και ειδικότητα για τους παθογόνους μύκητες, γεγονός που τις έχει κατατάξει στις υψηλές θέσεις προτίμησης για την αντιμετώπιση σχετικών ασθενειών (Brown *et al.* 2012). Η ανθεκτικότητα στις αζόλες προέρχεται από διαφορετικές οδούς, μία άμεση και μία έμμεση. Η άμεση ανθεκτικότητα προκαλείται από αλλαγές που επιτελούνται στο ένζυμο στόχο των αζολών, που είναι η 14α διμεθυλάση της λανοστερόλης. Το ένζυμο αυτό κωδικοποιείται από το γονίδιο *erg11* στον μύκητα *S. cerevisiae*, με τα ανθεκτικά στελέχη να εμφανίζουν είτε τροποποιήσεις στην αλληλουχία του γονιδίου, είτε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του προϊόντος του γονιδίου. Τα εμμέσως ανθεκτικά στελέχη που απομονώθηκαν, έχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης ABC μεταφορέων (ATP-binding cassette), οι οποίοι προκαλούν εκροή της αντιμυκητιακής ένωσης από το κύτταρο των μυκήτων όταν η συγκέντρωσή της υπερβεί τα τοξικά όρια (Prasad and Goffeau 2012). Οι μεταφορείς ABC προσδίδουν επίσης ανθεκτικότητα και στα καρκινικά κύτταρα έναντι των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.

Ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας που φάνηκε να αποτελεί μόριο κλειδί στην εμφάνιση του φαινομένου ανθεκτικότητας μελετήθηκε στον *S. cerevisiae* και είναι ο Pdr1 (Saunders and Rank 1982). Οι πρώτες γενετικές προσεγγίσεις επισημαίνουν ότι τα κυρίαρχα αλληλόμορφα του γονιδίου *pdr1* παρέχουν ανθεκτικότητα σε ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών τοξικών ενώσεων (Rank and Bech-Hansen 1973, Rank *et al.* 1976). Αυτός

ο φαινότυπος ευρέως φάσματος ανθεκτικότητας του *S. cerevisiae* σε φάρμακα, ορίστηκε ως πλειοτροπική ανθεκτικότητα (Pdr). Είναι λειτουργικά ανάλογη με την πολυανθεκτικότητα σε φάρμακα, που εμφανίζεται σε κύτταρα θηλαστικών αλλά και σε άλλους μύκητες (Gulshan and Moye-Rowley 2007).

Η μετατροπή της λειτουργίας του Pdr1 που οδηγεί σε ανθεκτικότητα προκαλείται από απλές μεταλλαγές υποκατάστασης αμινοξέων στην κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης (Εικόνα 1.2). Αυτές οι μεταλλαγές οδηγούν σε αυξημένη, συστηματική μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων, τα οποία κωδικοποιούν μεταφορείς εκροής τύπου ABC (Carvajal *et al.* 1997). Ειδικότερα, η ενεργοποίηση της έκφρασης του μεταφορέα Pdr5 καταλαμβάνει εξέχουσα θέση στο φαινόμενο της πολυανθεκτικότητας του *S. cerevisiae* σε αντιμυκητιακά (Katzmann *et al.* 1996).



**Εικόνα 1.2:** Η προβλεπόμενη δομή του μεταγραφικού παράγοντα *S.cerevisiae* Pdr1. Ο τομέας δέσμευσης του DNA βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο και περιέχει ένα Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> σύμπλεγμα που βρίσκεται ανάμεσα στα αμινοξέα 1-200 ενώ η μεταγραφική περιοχή ενεργοποίησης βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο περίπου στα 900-1000 κατάλοιπα αμινοξέων. Η κεντρική περιοχή που αλληλεπιδρά με τα φάρμακα και οδηγεί σε ενεργοποίηση του γονιδίου και κατ' επέκταση σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που επηρεάζει, βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 200 και 900.

### 1.7.2 Πολυανθεκτικά στελέχη του είδους *Candida albicans*

Δύο πολύ καλά μελετημένα και χαρακτηρισμένα γονίδια του μικροοργανισμού *C. albicans* εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα που εμφανίζουν συνήθως στελέχη αυτού του είδους. Το πρώτο είναι ένας ABC μεταφορέας που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cdr1* (Prasad *et al.* 1995) και ένας MFS μεταφορέας που κωδικοποιείται από το γονίδιο *mdr1* (Fling *et al.* 1991). Ο CDR1 απομονώθηκε στη βάση συμπληρωματικότητας της υπερευαισθησίας σε φάρμακα των *pdr5* μεταλλαγμένων στελεχών του *S.cerevisiae*. Απώλεια του γονιδίου *cdr1* οδήγησε σε έναν έντονο φαινότυπο ευαισθησίας της *C.*

*albicans* σε φάρμακα. Ένας ομόλογος μεταφορέας κωδικοποιούμενος από γονίδιο ABC μεταφορέα, είναι και ο Cdr2, που συμβάλλει επίσης στην ανθεκτικότητα σε φάρμακα όπως οι αζόλες και η υγρομυκίνη, όταν υπερπαραχθεί ή όταν το *cdr1* διαγράφεται (Karoor *et al.* 2010). Ο μεταφορέας Mdr1 έχει αναφερθεί ότι υπερεκφράζεται και προκαλεί ανθεκτικότητα σε πολλά κλινικά στελέχη. Παρόλα αυτά, η διαγραφή του γονιδίου δεν αναστρέφει το φαινότυπο και την αντίδραση του οργανισμού σε χορηγούμενα φάρμακα (Lettner *et al.* 2010).

Το γονίδιο *tac1* (*Transcriptional Activator* των *Cdr* γονιδίων) συσχετίστηκε με την ανθεκτικότητα στις αζόλες όταν απομονώθηκε από ανθεκτικά κλινικά στελέχη. Έχει παρόμοιο μηχανισμό δράσης με τους μεταγραφικούς παράγοντες Pdr1 και Pdr3 στο *S. cerevisiae*. Κατά τη διαγραφή του *tac1* γονιδίου παρατηρείται αυξημένη ευαισθησία στις αζόλες και μειωμένη έκφραση του γονιδίου *cdr1* που κωδικοποιεί ένα ABC μεταφορέα (Coste *et al.* 2004). Η σύνδεση του Tac1 στον υποκινητή οδηγεί σε έκφραση του Cdr1 και ανθεκτικότητα στα φάρμακα. Φαίνεται ότι ένας αριθμός διαφορετικών υποκαταστάσεων και ακόμη μικρές ελλείψεις αμινοξέων ενισχύουν έντονα τη λειτουργία της Tac1 (Coste *et al.*, 2007).

Ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας που εμφανίζει παρόμοια δράση με αυτή του Tac1 είναι ο μεταγραφικός παράγοντας *mrr1*, του οποίου η υπερέκφραση οδηγεί στην υπερέκφραση του MFS μεταφορέα εκροής Mdr1 (Morschhauser *et al.* 2007). Σε στελέχη ανθεκτικά στη φλουκοναζόλη, τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού αυτού παράγοντα είναι υψηλά (Dunkel *et al.* 2008).

Ένας άλλος ακόμη μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση του Mdr1 είναι ο Cap1, ωστόσο αυτός δεν σχετίζεται τόσο με την ανθεκτικότητα στα φάρμακα, αλλά κυρίως με την απόκριση του κυττάρου στην καταπόνηση (Rognon *et al.* 2006). Τέλος, ο μεταγραφικός παράγοντας Urc2, είναι συνδεδεμένος άμεσα με την ανθεκτικότητα στις αζόλες, και όχι τόσο με πολυανθεκτικότητα στην *C.albicans*. Ο Urc2 αποτελεί θετικό ρυθμιστή στην παραγωγή των στερολών και μεταλλαγές που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά του, οδηγούν σε ανθεκτικότητα στις αζόλες (Flowers *et al.* 2012).



### 1.7.3 Πολυανθεκτικά στελέχη του είδους *A. fumigatus*

Με το πέρασμα των δεκαετιών τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα έχουν αυξηθεί. Παράλληλα έχουν αυξηθεί και τα κρούσματα της Ασπεργιλίωσης, που προκαλείται ευκολότερα στα άτομα αυτά, με τον *Aspergillus fumigatus* να είναι ο πιο κοινός οργανισμός που προκαλεί μεγάλο αριθμό θανάτων. Η αμφοτερεσίνη Β είναι ένα σχετικά αποτελεσματικό φάρμακο για την αντιμετώπιση της Ασπεργιλίωσης, εντούτοις φαίνεται να προκαλεί τοξικότητα στους νεφρούς. Οι εχينوκαρδίνες χορηγούνται επίσης τοπικά για την αντιμετώπιση της Ασπεργιλίωσης, αλλά κυρίως είναι ουσίες μυκητοστατικής φύσεως. Η χημική ομάδα με τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι της Ασπεργιλίωσης και τη μικρότερη τοξικότητα στον ασθενή, θεωρείται πως είναι οι τριαζόλες, όπως η ιτρακοναζόλη και η βορικοναζόλη (Pound *et al.* 2011). Με τη συνεχόμενη όμως χρήση των τριαζολών έχουν προκύψει στελέχη με ανθεκτικότητα, είτε από μεταλλαγή στο ένζυμο στόχο, είτε από φαινόμενα ενεργοποίησης της εκροής μέσω μεταφορέων.

Ο πιο προφανής μηχανισμός ανθεκτικότητας στις τριαζόλες, και ο πρώτος που μελετήθηκε, είναι αυτός της επίδρασης στα επίπεδα έκφρασης του ενζύμου που κωδικοποιεί την εργοστερόλη, η 14α διμεθυλάση της στερόλης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cyp51A*. Η πρώτη μεταλλαγή που ταυτοποιήθηκε και συσχετίστηκε με την ανθεκτικότητα στις τριαζόλες είναι η αλλαγή του L98H στο γονίδιο *cyp51A*, η οποία και σε συνδυασμό με μεταλλαγές αναρροϊκά του υποκινητή του γονιδίου, είχε σαν αποτέλεσμα την πολυανθεκτικότητα στις αζόλες στα απομονωθέντα στελέχη του *A. fumigatus*.

Από το 2008, ένα μεγάλο ποσοστό των πολυανθεκτικών στις αζόλες *A. fumigatus* στελεχών έχουν απομονωθεί και έχει αποδειχθεί ότι έχουν μη-εξαρτώμενη από το *cyp51A* ανθεκτικότητα, εμπλέκοντας το ρόλο άλλων μηχανισμών. Μια ολοκληρωμένη μελέτη στην οποία συμμετείχαν 64 ανθεκτικά στελέχη *A. fumigatus* στις αζόλες που έγινε στο Ηνωμένο Βασίλειο, αποκάλυψε ότι το 43% των περιπτώσεων, που συνδέονται με ανθεκτικότητα δεν είχαν μεταλλάξεις στο *cyp51A* γονίδιο (Escribano *et al.* 2013). Μεταγενέστερες μελέτες έχουν προσδιορίσει ότι φαινόμενα ανθεκτικότητας μη εξαρτώμενα από το *cyp51A* γονίδιο βρίσκονται σε άνοδο, με πάνω από 50% των



περιπτώσεων να αφορούν εναλλακτικούς μηχανισμούς. Ανάλυση των στελεχών αυτών έδειξε υπερέκφραση των ABC μεταφορέων σε πολλές από τις περιπτώσεις και πιο ειδικά, του μεταφορέα CDR1B (Fraczek *et al.* 2013).

Γενικότερα, στο γονιδίωμα του *A. fumigatus* υπάρχουν πολλά γονίδια που κωδικοποιούν πιθανούς μεταφορείς. Ειδικότερα, φαίνεται να υπάρχουν 50 ABC και 300 MFS μεταφορείς (Kovalchuk and Driessen 2010), κάποιιοι από τους οποίους έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την πολυανθεκτικότητα του *A. fumigatus* στις αζόλες (Ferreira *et al.* 2005). Η διαγραφή του *cdr1B* έχει ως αποτέλεσμα τετραπλάσια αύξηση στην ευαισθησία στην ιτρακοναζόλη, ενώ αυτή του *abcB* έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία σε διαφορετικές αζόλες όπως τη βορικοναζόλη, ιτρακοναζόλη καθώς και την κετοκοναζόλη (Paul *et al.* 2013). Η διαγραφή ενός άλλου μεταφορέα που ανήκει στην ίδια οικογένεια, την ABC του *abcA*, είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας όχι όμως στα επίπεδα που επέδρασε η διαγραφή του *abcB*. Τέλος, η επίδραση του μεταφορέα Mdr4 έχει επίσης συσχετιστεί με την ανθεκτικότητα σε αντιμυκητιακές ενώσεις που στοχεύουν τον *A. fumigatus* κατά τη δημιουργία βιοφίλμ (Rajendran *et al.* 2011).

Ωστόσο, πολύ λίγα στοιχεία είναι γνωστά για την ταυτότητα μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στον έλεγχο πολυανθεκτικότητας στα φάρμακα στον *A. fumigatus*. Μεταλλαγές στον *yap1* καταδεικνύουν ότι αυτός ο παράγοντας οδηγεί σε πολυανθεκτικότητα στα αντιμυκητιακά φάρμακα και σε ανοχή στην οξειδωτική καταπόνηση. Επίσης, πολλαπλά αντίγραφα του πλήρους μήκους γονιδίου *yap1* οδηγούν σε ευαισθησία στη βορικοναζόλη (Qiao *et al.* 2010).

## 1.8 Μεταφορείς πουρινών, πυριμιδινών και αλλαντοΐνης στον *Aspergillus nidulans*

### 1.8.1 Η NAT/NCS2 οικογένεια

Στην οικογένεια αυτή συγκαταλέγονται σήμερα εκατοντάδες αλληλουχίες πρωτεϊνών που προέρχονται από Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, Αρχαίους προκαριωτικούς οργανισμούς, μύκητες, διάτομα, φυτά και ζώα. Οι πρωτεΐνες της NAT

οικογένειας αποτελούνται ως επί το πλείστον από 414-650 αμινοξέα σε μήκος, πιθανώς διαθέτουν 14 διαμεμβρανικά τμήματα α-έλικας (TMSs) και κυτταροπλασματικά N- και C-άκρα.

Τα χαρακτηρισμένα μέλη της NAT/NCS2 οικογένειας ανήκουν σε βακτήρια (*E. coli*, *B. subtilis*) και κυρίως μύκητες (*A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. brasiliensis*, *C. albicans*), αλλά και σε φυτά (καλαμπόκι) και θηλαστικά (ποντικός, αρουραίος, άνθρωπος). Είναι στη μεγάλη τους πλειοψηφία συμμεταφορείς  $H^+$  εξειδικευμένοι για οξειδωμένες πουρίνες (ξανθίνη ή/και ουρικό οξύ) ή ουρακίλη. Οι μυκητιακοί μεταφορείς ουρακίλης δεν ανήκουν στις NAT/NCS2 αλλά στην NCS1 /PRT. Ενδιαφέρον προκαλεί ότι τα μέλη της οικογένειας από τα θηλαστικά, Svct1 και Svct2, οι οποίοι είναι συμμεταφορείς ασκορβικού / $Na^+$ , με υψηλό βαθμό ειδικότητας και υψηλή συγγένεια για τη βιταμίνη. Τα φυτά έχουν πολλούς μεταφορείς NAT/NCS2, ο μοναδικός ωστόσο με γνωστή λειτουργία είναι ο Lpe1, ένας υψηλής συγγένειας και υψηλής ενεργότατος μεταφορέας ουρικού και ξανθίνης απαραίτητος για την ανάπτυξη των χλωροπλαστών στο καλαμπόκι. Αρκετοί μεταφορείς της NAT οικογένειας από τον *Arabidopsis sp.* έχουν κλωνοποιηθεί και μελετηθεί σε σχέση με τη διαφορική μεταγραφή τους σε διάφορους φυτικούς ιστούς. Παρά την ανάλυση των διπλών και τριπλών μεταλλάξεων *knock-out*, δεν παρατηρήθηκε φαινότυπος σε κάποια από τα μελετώμενα στελέχη (Liang *et al.* 2001).

Ο *A. nidulans* έχει δύο μεταφορείς που ανήκουν στη NAT/NCS2 οικογένεια και ονομάζονται UapA και UapC, οι οποίοι έχουν χαρακτηριστεί όσον αφορά τη μεταγραφική και κυτταρική τους ρύθμιση, την έκφραση κατά τη διάρκεια του αγενούς ή σεξουαλικού κύκλου, και τις σχέσεις δομής-λειτουργίας που καθορίζουν την εξειδίκευση και τη σταθερότητα τους. Ο UapA αποτελείται από 574 αμινοξέα, υψηλής συγγένειας και ενεργότητας μεταφορέας που ευθύνεται για την πρόσληψη του ουρικού οξέος και ξανθίνης, όπως επίσης για τη μεταφορά 2-θειουρικού, 2-θειοξανθίνης, 3-μεθυλοξανθίνης, αλλοπουρινόλης ή οξυπουρινόλης. Ο UapC είναι μεταφορέας ουρικού οξέος και ξανθίνης, αλλά φαίνεται να έχει μικρότερη συγγένεια για ουρικό από ότι για ξανθίνη, ενώ επίσης έχει πολύ χαμηλή συγγένεια για άλλες πουρίνες, που δεν αναγνωρίζονται από τον UapA, όπως η αδενίνη και η υποξανθίνη (Krypotou and Diallinas 2014).

### 1.8.2 Η NCS1 οικογένεια

Τα μέλη της οικογένειας NCS1/PRT αποτελούνται από 419-635 αμινοξέα και έχουν, πιθανότατα 12 διαμεμβρανικές TMSs. Τα N-άκρα και C-άκρα προβλέπεται να έχουν κυτταροπλασματική διευθέτηση και δεν υπάρχει μεγάλος υδρόφιλος βρόγχος ή επαναλαμβανόμενα μοτίβα, όπως στα μέλη των μεταφορέων MFS. Σε ορισμένα από αυτά έχει δειχθεί ότι πραγματοποιούν μεταφορά υποστρώματος/ $H^+$  κατά την πρόσληψη. Η NCS1 οικογένεια εμφανίζεται στα προκαρυωτικά, τους μύκητες και τα φυτά, και περιλαμβάνει μεταφορείς για πουρίνες, κυτοσίνη, ουριδίνη, αλλαντοΐνη, πυριδοξίνη ή θειαμίνη (<http://www.tcdb.org/>, de Koning and Diallinas 2000). Με βάση το γεγονός ότι ορισμένοι βακτηριακοί μεταφορείς NAT/NCS2 έχουν ομοιότητες με τα μέλη της NCS1 οικογένειας, οι δύο οικογένειες έχουν κάποια μακρινή συγγένεια (Krypotou *et al.* 2015a, de Koning and Diallinas 2000).

Δύο εκτενώς μελετημένοι μεταφορείς πουρινών και πυριμιδινών της NCS1 οικογένειας του *S. cerevisiae* είναι η περμεάση Fcy2p αδενίνης-γουανίνης-υποξανθίνης-κυτοσίνης (Weber *et al.* 1990) και η περμεάση Fur4p ουρακίλης (Jund *et al.* 1988). Ο Fcy2p μεταφορέας έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας υψηλής συγγένειας και μεγάλης ενεργότητας μεταφορέας  $H^+$  και αδενίνης-γουανίνης-υποξανθίνης-κυτοσίνης. Ο Fur4p είναι ένας υψηλής συγγένειας και μεγάλης ενεργότητας μεταφορέας  $H^+$  και ουρακίλης. Στον *A. nidulans* η Fur4p ομοιάζουσα πρωτεΐνη έχει χαρακτηριστεί και ονομάζεται FurD (Amillis *et al.* 2007). Ο FurD είναι επίσης ένας υψηλής συγγένειας και μεγάλης ενεργότητας μεταφορέας  $H^+$  και ουρακίλης, ωστόσο δε θα πρέπει να είναι ο μόνος μεταφορέας πρόσληψης ουρακίλης στον *A. nidulans* καθώς στελέχη  $\Delta furD$  συνεχίζουν να έχουν χαμηλή ικανότητα πρόσληψης ουρακίλης. Επιπρόσθετα, έχει φανεί ότι η δράση του μεταφορέα FurD ανιχνεύεται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με τον σημαντικό λειτουργικά φυσιολογικό του ρόλο (Vlanti and Diallinas 2008). Ο FurD αναγνωρίζει επίσης με σχετικά υψηλή συγγένεια αρκετά ανάλογα ουρακίλης. Αυτές είναι ουσίες με υποκαστάτη στη θέση 5, όπως η 5-φθοροουρακίλη, η 5-χλωροουρακίλη και η 5-αμινοουρακίλη. Η αναγνώριση της 5-φθοροουρακίλης από μεταφορείς ουρακίλης έχει επίσης παρατηρηθεί σε βακτήρια, ζυμομύκητες, φυτά και θηλαστικά (de Koning and Diallinas 2000). Η θυμίνη (5-

μεθυλουρακίλη) είχε επίσης μια σχετικά υψηλή συγγένεια, αν και 8 φορές μειωμένη συγκριτικά με την ουρακίλη. Τέλος, 2-θειουρακίλη έχει 19-φορές μειωμένη συγγένεια για τον FurD, σε σύγκριση με την ουρακίλη (Hamari *et al.* 2009).

Επιπρόσθετα, μια πρωτεΐνη της οικογένειας NCS1/PRT που έχει πρόσφατα χαρακτηριστεί και είναι μεταφορέας δευτερογενούς πηγής αζώτου, είναι ο μεταφορέας FurA στον *A. nidulans*. Απαλειφή του γονιδίου από το αγρίου τύπου στέλεχος δείχνει ότι ο FurA είναι ο κύριος μεταφορέας αλλαντοΐνης, με την ομόλογη πρωτεΐνη FurE να δρα ως δευτερογενής μεταφορέας αλλαντοΐνης (Hamari *et al.* 2009, Krypotou *et al.* 2015 α). Επιπλέον, ένας μεταφορέας της οικογένειας NCS1 που έχει μελετηθεί εκτενώς στον *A. nidulans* είναι ο FcyB. Φαίνεται ότι ο μεταφορέας FcyB έχει μια υψηλή συγγένεια για τα φυσιολογικά του υποστρώματα αδερίνη, υποξανθίνη, γουανίνη και κυτοσίνη.

### 1.8.3 Η οικογένεια AzgA

Αυτή η οικογένεια περιλαμβάνει ομόλογα σε βακτήρια, Αρχαίους προκαρυωτικούς οργανισμούς, φυτά και στους μύκητες, αλλά μόνο στους *A. nidulans* και *A. fumigatus* οι πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί ως συμμεταφορείς υποξανθίνης-αδερίνης-γουανίνη/H<sup>+</sup> (Cecchetto *et al.* 2004, Goudela *et al.* 2008). Οι μυκητιακής προελεύσεως πρωτεΐνες μοιράζονται 35% και 44% σε βακτηριακά και φυτικά ομόλογα, αντίστοιχα, ενώ η ομοιότητα μεταξύ μυκήτων ποικίλλει από 45% έως 75%. Οι AzgA ομοιάζουσες πρωτεΐνες είναι μεγάλες, με μήκος 423-594 αμινοξέα και προβλέπεται να έχουν 12 TMSs. Με βάση τη συνολική πρωτογενή και δευτερογενή αλληλουχία, οι AzgA πρωτεΐνες ομαδοποιούνται ως ξεχωριστή υποοικογένεια εντός της MFS (<http://www.tcdb.org/>). Ωστόσο, ο AzgA συμμερίζεται επίσης κάποια κοινά χαρακτηριστικά με την οικογένεια NAT/NCS2. Επιπλέον, δε μπορεί να ανιχνευθεί διπλή συμμετρία όπως σε πρωτεΐνες MFS οικογένειας. Η πρωτεΐνη AzgA (580 αμινοξέα οξέα, 12 TMS) του *A. nidulans* είναι ένας υψηλής συγγένειας και υψηλής χωρητικότητας, μεταφορέας ειδικός για αδερίνη, γουανίνη, υποξανθίνη, 8-αζαξανθίνη και 2,6-διαμινοπουρίνη. Επίσης, μεταφέρει αποτελεσματικά τα τοξικά ανάλογα πουρινών και 8-αζαγουανίνη (Cecchetto *et al.* 2004, Pantazopoulou and Diallinas 2007β, Krypotou and Diallinas 2014)

### 1.8.4 Η οικογένεια CNT

Ο μεταφορέας CntA για τον *Aspergillus nidulans* αποτελεί το βασικό μεταφορέα νουκλεοσιδίων. Η διαγραφή του γονιδίου σε επιλεγμένο στέλεχος έδειξε μειωμένη ανάπτυξη παρουσία νουκλεοσιδίων, ως μοναδική πηγή αζώτου, ανθεκτικότητα στην 5-fluorouridine αλλά όχι στην 5-fluorouracil ή 5-fluorocytosine. Επιπρόσθετα, σε στελέχη που έχει γίνει γενετική απαλοιφή του μεταφορέα *cntA*, δε διαφαίνεται πρόσληψη αδενοσίνης, γουανοσίνης, ινoσίνης και θειαμίνης. Ένα αληθινά λειτουργικό ομόλογο του CntA (CaCNT) υπάρχει στην *C. albicans* (Loewen *et al.* 2003). Ο CaCNT είναι μεταφορέας αδενοσίνης, ουριδίνης, ινoσίνης και γουανοσίνης, αλλά, σε αντίθεση με τον CntA, δεν μπορεί να αναγνωρίσει θυμιδίνη ή κυτιδίνη.

## 1.9 Μηχανισμοί δράσης και ανθεκτικότητας παρεμποδιστών της Αφυδρογονάσης Ηλεκτρικού Οξέος (SDHIs) στους μύκητες.

### 1.9.1 Η εμφάνιση των SDHIs

Η μακρόχρονη ερευνητική δραστηριότητα στο πεδίο της φυτοπροστασίας είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύτιμων χημικών ενώσεων, με πολλές επιθυμητές ιδιότητες. Σε αυτές περιλαμβάνονται η εξειδικευμένη δράση, η συστηματικότητα, η αποτελεσματική θεραπευτική δράση, η εκριζωτική δράση καθώς και η υψηλή δραστηριότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις. (Avenot *et al.* 2008 β).

Ο αναστολείς της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDHIs) είναι μυκητοκτόνα με σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών από πολλούς φυτοπαθογόνους μύκητες. Συνδέονται ειδικά στη θέση δέσμευσης της ουβικινόνης (Q-περιοχή) του μιτοχονδριακού συμπλέγματος II, με αποτέλεσμα την αναστολή της μυκητιακής αναπνοής. Λόγω της μοναδικής λειτουργίας τους και του τρόπου δράση τους, φαίνεται ότι στελέχη με ανθεκτικότητα σε άλλα χημικά μόρια, όπως τις στρομπιλουρίνες, τα βενζιμιδαζόλια ή τις ανιλινοπυριμιδίνες, δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στις SDHIs. Ως εκ τούτου, είναι

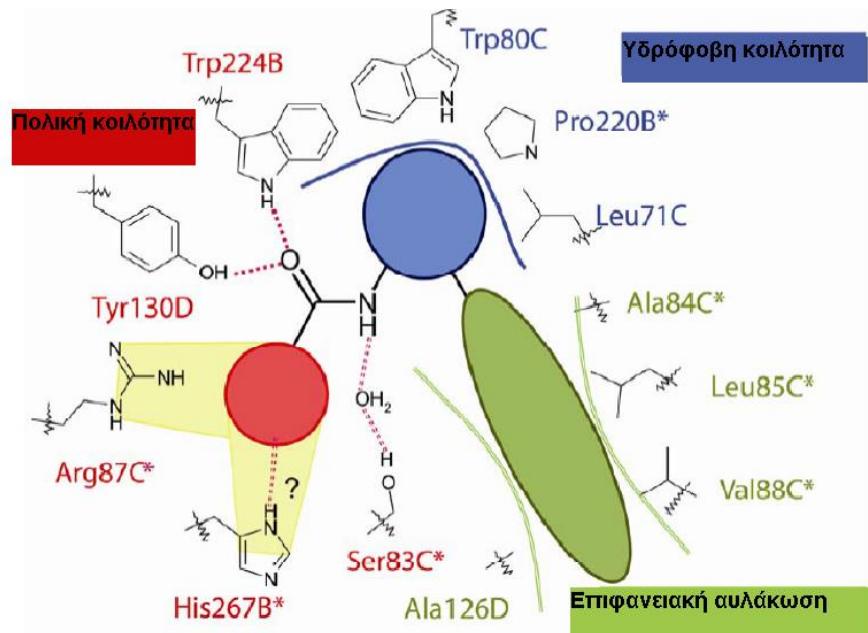
εξαιρετικά σημαντική η μελέτη και η χρήση τους για την ανάπτυξη ισχυρών μυκητοκτόνων και τη βελτιστοποίηση του ελέγχου των φυτικών ασθενειών (Zhang *et al.* 2009).

Μυκητοκτόνα της ομάδας των SDHI, όπως το carboxin, χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στη γεωργία στα τέλη της δεκαετίας του 1960, δρώντας κατά ασθενειών που προκαλούνται κυρίως από Βασιδιομύκητες (rusts, *Rhizoctonia* κλπ), ενώ νεότερες δραστικές ενώσεις της ίδιας ομάδας, όπως το boscalid, το penthiopyrador και το fluopyram διαθέτουν ευρύτερο φάσμα αντιμυκητιακής δράσης (Yanase *et al.* 2007). Δυστυχώς, λόγω της ιδιαιτερότητας του τρόπου δράσης τους, η συστηματική χρήση αυτών των μορίων μπορεί να προκαλέσει επιλογή ανθεκτικών στελεχών φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών στο πεδίο. Η μελέτη των γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δυναμική της εξέλιξης των ανθεκτικών πληθυσμών αποτελεί αναγκαίο βήμα για την βιώσιμη χρήση των SDHI ως μυκητοκτόνα.

Για παράδειγμα, η ύπαρξη μεταλλάξεων που ευθύνονται για την ανθεκτικότητα μυκήτων στους αναστολείς του συμπλέγματος II, όπως το carboxin ή το boscalid, είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια. Πρόσφατα, η απελευθέρωση στην αγορά του πρώτου εκπροσώπου της νεότερης γενιάς SDHIs, του boscalid, είχε σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση του ελέγχου μυκητιακών ασθενειών αλλά η συστηματική χρήση του για κάποιο χρονικό διάστημα οδήγησε στην εμφάνιση των πρώτων ανθεκτικών στελεχών (Avenot and Michailides 2010).

Τα κύρια χαρακτηριστικά του μηχανισμού δράσης των SDHIs παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.9.1. Οι SDHIs δεσμεύονται κοντά στην περιοχή της ουβικινόνης, όπου προβλέπεται έμμεση αλληλεπίδραση με αυτή, σε πρότυπο που κατασκευάστηκε σύμφωνα με τις αλληλουχίες από τον οργανισμό *M. graminicola*. Ο κεντρικός αμιδικός δεσμός σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου με την Tyr224 στην υπομονάδα SdhB και την Tyr 130 στην SdhD και μέσω ενός μορίου νερού, που συνδέεται στην Ser83 της υπομονάδας SDHC. Οι θέσεις αυτές είναι πολύ συντηρημένες ανάμεσα στα διάφορα είδη και αποκαλύπτουν την άμεση σχέση της ουβικινόνης στην καταλυτική ικανότητα του ενζύμου. Η σχισμή του καταλυτικού κέντρου είναι πολύ εσωτερικά του συμπλέγματος και οριοθετείται ακόμη από τα αμινοξέα Arg87 του SdhC και His67 του SdhB (Tran *et*

*al.* 2006). Επίσης, στη σύνδεση του αναστολέα υπάρχει πιθανότητα να συμμετέχουν και υδρόφοβοι δεσμοί, που αναπτύσσονται μεταξύ των SDHs και των SdhC και SdhB, με πιο πιθανή να είναι με την Pro222 του SdhB, η οποία είναι αυστηρώς συντηρημένη. Η “υδρόφοβο υπόλοιπο” κυρίως αλληλεπιδρά με αμινοξέα των υπομονάδων SdhC και SdhD, τα οποία σχηματίζουν ένα αυλάκι στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, το οποίο εκτίθεται στα λιπίδια της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης (Zhou *et al.* 2011).



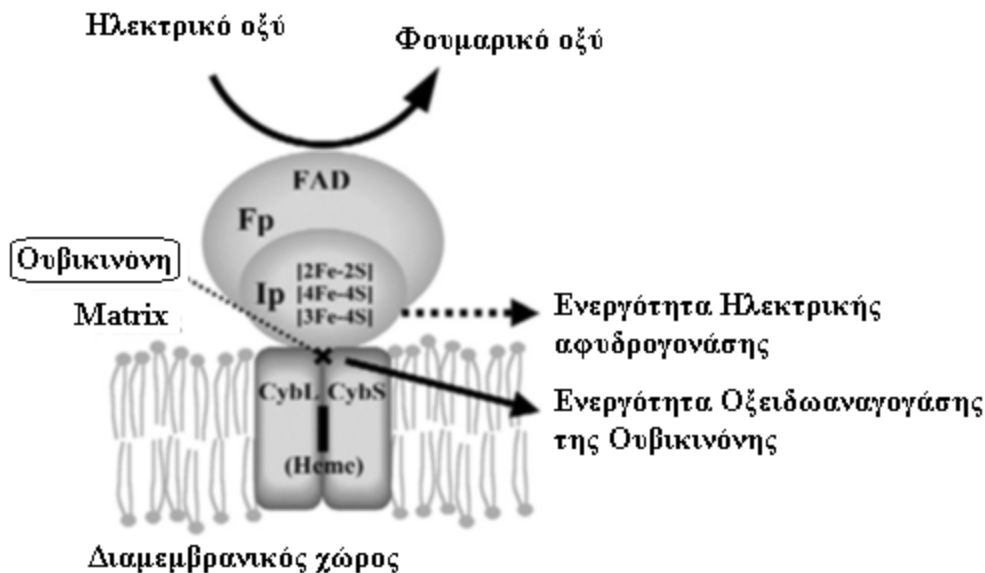
**Εικόνα 1.9.1:** Σχηματική αναπαράσταση της θέσης δέσμευσης του αναστολέα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος, από τις υπομονάδες του συμπλέγματος II. Με κόκκινο απεικονίζεται η πολική κοιλότητα μέσα στην οποία δεσμεύεται ο δακτύλιος της χημικής ένωσης με όξινο χαρακτήρα και η κοντινή αμιδική ομάδα. Με μπλε φαίνεται η υδρόφοβη κοιλότητα μέσα στην οποία δεσμεύεται η ομάδα συνδέτης του αναστολέα και είναι αρωματικής ή αλειφατικής φύσεως. Τέλος η πράσινη ωοειδής περιοχή παριστάνει τη θέση στην πρωτεΐνη όπου συνδέεται το υπόλοιπο τμήμα της ένωσης SDHI. Τα αμινοξέα με τα ομόλογα χρώματα είναι αυτά του αλληλεπιδρούν με τα αντίστοιχα μέρη του αναστολέα του συμπλόκου II.

## 1.9.2 Ο μηχανισμός δράσης των Αναστολέων της Αφυδρογονάσης του Ηλεκτρικού οξέος

Ο στόχος των μυκητοκτόνων SDHI είναι η ηλεκτρική αφυδρογονάση (SDH), η οποία είναι σύμπλεγμα της αναπνευστικής αλυσίδας. Επίσης, αναφέρεται και ως σύμπλεγμα II



ή ηλεκτρική οξειδωαναγωγή της ουβικινόνης (SQR) (Hagerhall 1997). Το ενζυμικό αυτό σύμπλεγμα οδηγεί στην οξείδωση του ηλεκτρικού προς φουμαρικό στη μιτοχονδριακή μήτρα (ή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων), με την αναγωγή της ουβικινόνης (UQ), έναν υδρόφοβο μεμβρανικά δεσμευμένο μεταφορέα ηλεκτρονίων, προς ουβικινόλη (UQH<sub>2</sub>) στη μεμβράνη κατά τη διάρκεια της αερόβιας αναπνοής (Horsefield *et al.* 2006). Εκτός από τη λειτουργία του ως αφυδρογονάση στην αναπνευστική αλυσίδα, το σύμπλεγμα II διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος. Το μιτοχονδριακό σύμπλεγμα της Αφυδρογονάσης του Ηλεκτρικού Οξέος αποτελείται από ένα τμήμα που βρίσκεται εντός της εσωτερικής μεμβράνης του μιτοχονδρίου και λειτουργεί σαν άγκυρα (membrane-anchor domain), και από ένα περιφερικό τμήμα που βρίσκεται εντός του διαμεμβρανικού χώρου του μιτοχονδρίου (membrane-peripheral domain) (Εικόνα 1.9.2).



**Εικόνα 1.9.2:** Η δομή των υπομονάδων του συμπλέγματος II και οι ενζυμικές του ενεργότητες αυτών (Omura and Shiomi, 2007). Το ενζυμικό σύμπλεγμα μετατρέπει την ουβικινόνη προς ουβικινόλη με ταυτόχρονη οξείδωση του ηλεκτρικού οξέος προς φουμαρικό στη εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου κατά τη διάρκεια της αναερόβιας αναπνοής. Στη θέση δέσμευσης της ουβικινόνης συνδέονται οι αναστολείς SDHI και αποτρέπουν την οξείδωση του ηλεκτρικού προς φουμαρικό. Οι υπομονάδες CybL ή SdhC και CybS ή SdhD αποτελούν την «άγκυρα» του συμπλόκου στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Οι υπομονάδες Fp ή SDHA και η Ip ή SDHB συνδεόμενα με το σχηματισμό της άγκυρας συνδέονται ομοιοπολικά με το FAD για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ FAD και κινόνης στη μεμβράνη.



Η περιφερειακή περιοχή, η οποία αποτελείται από δύο υδρόφιλες υπομονάδες, τις SdhA και SdhB, αποτελεί το διαλυτό μέρος του συμπλέγματος και διαθέτει δραστηριότητα ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (οξειδωση του ηλεκτρικού σε φουμαρικό). Η υπομονάδα SdhA είναι μια Φλαβο-πρωτεΐνη (Fr), με την οποία ο συμπάραγοντας FAD συνδέεται ομοιοπολικά με το ένζυμο και βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Από την άλλη πλευρά είναι η σίδηρο-θειούχα πρωτεΐνη (Ip), η οποία διαθέτει τρία clusters σιδήρου-θείου, τα: [2Fe-2S], [4Fe-4S] και [3Fe-4S], για μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ FAD και κίνησης στη μεμβράνη (Ōmura and Shiomi 2007). Η κύριες ακολουθίες των Fr και Ip είναι εξαιρετικά συντηρημένες μεταξύ των ειδών και είναι ενδεικτικά προγονικά γονίδια. Η περιοχή του συμπλέγματος που αγκυροβολεί στη μεμβράνη αποτελείται από δύο υδρόφοβες εκτεταμένες υπομονάδες SdhC ή CybL και SdhD ή CybS που σχηματίζουν τη μεγάλη και μικρή υπομονάδα του κυτοχρώματος b αντίστοιχα, συνεισφέροντας η καθεμιά τρεις trans μεμβρανικές K-έλικες (I, II, III, και IV, V, VI αντίστοιχα) (Ackrell 2000).

Εκτός από τα πρωτεϊνικά συστατικά του το σύμπλεγμα II, περιέχει επίσης μια προσθετική ομάδα αίμης b στο σύμπλοκο μεταξύ SdhC και SdhD (Sun *et al.* 2005). Αυτός ο διαμεμβρανικός υδρόφοβος τομέας εμφανίζει μεγαλύτερη ποικιλομορφία με διαφορετική περιεκτικότητα σε αίμη β-τύπου και μικρή ομοιότητα στην αλληλουχία μεταξύ των ειδών. Οι μεμβρανικές υπομονάδες που δομούν την άγκυρα του συμπλέγματος διαθέτουν θέσεις δέσμευσης για την αναγωγή της ουβικινόνης και για κάποιους αναστολείς, όπως επίσης και για την αγκυροβόληση του διαμεμβρανικού τμήματος (Fr και Ip) στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, υποβοηθώντας έτσι τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην ουβικινόνη (Avenot and Michailides 2010).

Περαιτέρω αναλύσεις του συμπλέγματος II σε στελέχη διαφορετικών οργανισμών που είναι ανθεκτικά στις αντιμυκητιακές ενώσεις SDHI, πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να βρεθούν αμινοξέα «κλειδιά» στο σύμπλεγμα που επηρεάζουν στο επίπεδο της ανθεκτικότητας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θέση δέσμευσης της UQ, η οποία δομείται από τρία πρωτεϊνικά συστατικά (SdhB, SdhC και SdhD) και είναι σαφώς κοντά στο cluster [3Fe-4S] και από την heme-b, είναι αρκετά συντηρημένη ανάμεσα σε βακτήρια και ευκαριωτικούς οργανισμούς. Οι SDHIs είναι ειδικοί διακόπτες για τη

διακοπή της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το cluster [3Fe-4S] στην ουβικινόνη των μυκήτων (Huang *et al.* 2006).

### 1.9.3 Μεταλλαγμένα στελέχη με ανθεκτικότητα στο boscalid

Τα μεταλλαγμένα στελέχη μυκήτων που εκδηλώνουν ανθεκτικότητα στο boscalid, έχουν κατασκευαστεί σε εργαστηριακές συνθήκες, αλλά και έχουν απομονωθεί από τον αγρό. Όμως είναι λίγα σχετικά στον αριθμό, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.9.1. Από καλλιέργειες έχουν απομονωθεί μύκητες, όπως ο *Alternaria alternata* (Avenot *et al.* 2008 α) από τη φιστικιά, ο *Botrytis cinerea* από τα σταφύλια (Stammli *et al.* 2007), τις φράουλες, τα μήλα και τα πράσινα λαχανικά, ο *Corynespora cassiicola* από τα αγγούρια, ο *Didymella bryoniae* από τα πεπόνια και ο *Podosphaera xanthii* στα κολοκύθια (Miazzi and McGrath 2008). Η μοριακή βάση της ανθεκτικότητας έχει μελετηθεί αρκετά σε πολλούς διαφορετικούς μύκητες, μέσω της αλληλούχησης των πυρηνικών γονιδίων της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης σε ανθεκτικά στις SDHIs στελέχη.

**Πίνακας 1.9.1:** Μεταλλαγές στα γονίδια του μιτοχονδριακού συμπλέγματος II που προκαλούν ανθεκτικότητα στις SDHIs σε διάφορους οργανισμούς.

Αμινοξική αντικατάσταση στο σύμπλεγμα της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος		Οργανισμοί	Γενετική τροποποίησηση		
Υπομονάδα	Σημειακή μεταλλαγή		Φαινότυπος	Τύπος	
B	H252L	<i>Ustilago maydis</i>	Carboxin resistant (CbxR)	Lab	
	H267Y	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	CbxR	Lab	
	H239L	<i>Pleurotus ostreatus</i>	CbxR	Lab	
	H228N	<i>Paracoccus denitrificans</i>	CbxR	Lab	
	H229L	<i>Xanthomonas campestris</i>	CbxR	Lab	
	H277Y, R	<i>Alternaria alternata</i>	Boscalid resistant (BosR)	Field	
	H278Y	<i>Corynespora cassiicola</i>	BosR	Field	
	P225L, T, F; H272Y,R	<i>Botrytis cinerea</i>	BosR	Lab & Field	
	H -> Y	<i>Didymella bryoniae</i>	BosR	Field	
	H -> Y	<i>Podosphaera xanthii</i>	BosR	Field	
	H249Y, L, N	<i>Aspergillus oryzae</i>	CbxR	Lab	
	C	N80K	<i>Coprinus cinereus</i>	CbxR	Lab
		H134R	<i>Alternaria alternata</i>	BosR	Field
S73P		<i>Corynespora cassiicola</i>	BosR	Field	
T90I		<i>Aspergillus oryzae</i>	CbxR	Lab	
D	D89G	<i>Paracoccus denitrificans</i>	CbxR	Lab	
	D123E, D133R	<i>Alternaria alternata</i>	BosR	Field	
	S89P	<i>Corynespora cassiicola</i>	BosR	Field	
	D132R	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	BosR	Field	
	D124E	<i>Aspergillus oryzae</i>	CbxR	Lab	

Ειδικότερα, στην *A.alternata*, στην υπομονάδα SdhB έχει βρεθεί σε ανθεκτικά στελέχη μεταλλαγή, λόγω της οποίας η ιστιδίνη 277 μετατρέπεται σε τυροσίνη ή αργινίνη. Στο *B.cinerea*, μεταλλαγές στην ίδια υπομονάδα προκαλούν ανθεκτικότητα στο boscalid. Σε

αυτή την περίπτωση, η Ιστιδίνη 272 αντικαθίσταται από Τυροσίνη ή Αργινίνη και η Προλίνη 225 από Φαινιλαλανίνη ή Λευκίνη. Οι τελευταίες προκαλούν απώλεια ικανότητας στο σύμπλοκο να δεσμεύσει τον αναστολέα και να σταματήσει η ροή των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Avenot *et al.* 2008β; Stammer *et al.* 2007)..

Ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου Ip (*sdhB*) σε μεταλλαγμένα ανθεκτικά στο boscalid στελέχη των *C.cassiiicola*, *D.bryoniae* και *B.cinerea*, έδειξε σημειακή μεταλλαγή, που οδηγεί σε αντικατάσταση της ιστιδίνης 278 από Τυροσίνη. Ωστόσο, κάποια από τα ανθεκτικά στελέχη δεν βρέθηκε να έχουν κάποια διαφορά στην αλληλουχία του γονιδίου *sdhB* σε σχέση με το αγρίου τύπου στέλεχος, ενώ οι μεταλλαγές που έχουν στις υπόλοιπες υπομονάδες του συμπλέγματος II στην αναπνευστική αλυσίδα είναι λίγες. Κάποιες από αυτές είναι στην υπομονάδα SdhC (αντικατάσταση της ιστιδίνης 134 από αργινίνη μέσω σημειακής μεταλλαγής) και στην υπομονάδα SdhD (αντικατάσταση της ιστιδίνης 133 από αργινίνη). Μια εξήγηση για τη σπανιότητα εύρεσης μεταλλαγών που σχετίζονται με ανθεκτικότητα στις υπομονάδες SdhC και SdhD είναι το επιλεκτικό μειονέκτημα, που πιθανά προσφέρουν οι μεταλλαγές αυτές σε συνθήκες αγρού. Έχει φανεί ακόμη ότι, μεταλλαγές αυτού του τύπου προκαλούν μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης και ανικανότητα ανταπόκρισης στην οξειδωτική καταπόνηση. Γενικότερα, μεταλλαγές που σχετίζονται με την περιοχή, στην οποία δεσμεύεται η ουβικινόνη φαίνεται να έχουν σαν αποτέλεσμα υπερευαισθησία στην οξειδωτική καταπόνηση (Avenot and Michailides 2010).

Αποτελεσματικές στρατηγικές πρόληψης και διαχείρισης της εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών μυκήτων μπορεί να επιτευχθούν μέσω της κατανόησης των παραγόντων που σχετίζονται με την προέλευση, την ανάπτυξη και την εξάπλωση της ανθεκτικότητας. Παρά το γεγονός ότι η ανθεκτικότητα στα αντιμυκητιακά φάρμακα περιορίζει σημαντικά τον χρόνο αποτελεσματικότητας και ζωής των μυκητοκτόνων, η μελέτη της ανθεκτικότητας μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση, σε μοριακό επίπεδο, του μηχανισμού της δράσης μιας συγκεκριμένης κατηγορίας χημικών ουσιών. Νέα SDHI μυκητοκτόνα έχουν αναπτυχθεί, μερικά από τα οποία φαίνεται να έχουν διαφορετική μορφή διασταυρούμενης ανθεκτικότητας με προϋπάρχοντα SDHI μυκητοκτόνα. Η εγγενής δραστηριότητα ενός μυκητοκτόνου καθορίζεται με βάση την ειδική συγγένεια με

τη θέση στόχο (Yamaguchi and Fujimura 2005). Οι διαφορές στη δραστηριότητα ανάμεσα στα SDHI μυκητοκτόνα μπορούν να προκύψουν από διαφορές στη συγγένεια πρόσδεσης τους ή αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα στις υπομονάδες της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης, που εμπλέκονται στη θέση πρόσδεσης του αναστολέα. Ο χαρακτηρισμός του πλήρους φάσματος των αλλαγών των αμινοξέων στα SDH γονίδια, που οδηγούν στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στα SDHI μυκητοκτόνα, θα αποκαλύψει, με μεγαλύτερη ακρίβεια, τους μηχανισμούς αναστολής και ανθεκτικότητας σε αυτά (Yamaguchi and Fujimura 2005).

## 1.10 Η χρήση των μεταθετών στοιχείων στη μεταλλαξιγένεση

Την τελευταία δεκαετία έχουν αναπτυχθεί διάφορες μεθοδολογίες οι οποίες εκμεταλλεύονται τη χρήση μεταθετών στοιχείων για τη μελέτη γονιδίων, για τη διαγραφή αυτών, όπως και τον εντοπισμό θέσης εσωνίων, εξωνίων και υποκινητών. Ένα από τα πιο καλά μελετημένα μεταθετά στοιχεία το οποίο ανακαλύφθηκε στην *Drosophila hydei* και ανήκει στην *Tc1/ mariner* οικογένεια. Αποτελείται από δύο αντίστροφα επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα άκρα του μήκους 254bp και στο μέσον αυτών βρίσκεται το γονίδιο της Τρανσποζάσης, μήκους 1029bp, γονίδιο διακοπτόμενο από 60bp (Evangelinos *et al.* 2015).

Ο μηχανισμός στον οποίο υπακούει το μεταθετό στοιχείο Minos είναι του τύπου “cut and paste” και ολόκληρος ο κύκλος μεταφοράς από τη στιγμή που το μεταθετό θα αποχωρήσει από την αρχική του θέση και θα εντεθεί στη νέα θέση καταλύεται από την τρανσποζάση του. Μελέτες στο γονίδιο της τρανσποζάσης έχουν δείξει ότι το ένζυμο αυτό διαθέτει περιοχή δέσμευσης στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και η καταλυτική περιοχή βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο που πραγματοποιεί τη μετάθεση. Η περιοχή στόχος στην οποία εντίθεται το μεταθετό στοιχείο είναι το δινουκλεοτίδιο TA το οποίο και διπλασιάζεται. Μετά τη μετάθεση από την αρχική του θέση ένθεσης, αφήνει ένα αποτύπωμα 6 bp που αποτελείται από τις τέσσερις τελευταίες βάσεις ενός εκ των δύο IRs συν του ενός διπλασιασμένου στόχου (Pavlopoulos *et al.* 2007).

Τα πλεονεκτήματα που ξεχωρίζουν το μεταθετό στοιχείο Μίνος είναι αφενός μεν το γεγονός ότι είναι ενεργό σε πληθώρα οργανισμών μοντέλων, αφετέρου ότι έχει καταγραφεί ένθεση σε πληθώρα περιοχών όπως εσώνια, εξώνια και υποκινητές γεγονός που χαρακτηρίζει τη μετάθεση του από τυχαιότητα.

Το μεταθετό στοιχείο το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη έχει ήδη μελετηθεί για την ενεργότητα του στον *A. nidulans*. Το μεταθετό αυτό στοιχείο που έχει κατασκευαστεί βρίσκεται σε κασέτα. Στα άκρα της κασέτας βρίσκονται τα IRs ενώ στο μέσο αυτών βρίσκονται δύο γονίδια το, *yA* και το *inoB*. Τέλος εξωτερικά των IRs έχουν προστεθεί περιοχές εκατέρωθεν της θέσης -10 του υποκινητή της αναγωγής των νιτρικών *niaD* με σκοπό το μεταθετό στοιχείο αρχικά να εντεθεί στη θέση αυτή μέσω ομόλογου ανασυνδιασμού, γνωρίζοντας ότι το αποτύπωμα που αφήνει πίσω του από τη θέση αυτή, δεν επηρεάζει τη μεταγραφή και έκφραση του γονιδίου αυτού.

Τα γονίδια *yA* και *inoB* αποτελούν μάρτυρες για την επιτυχία κατασκευής τοποθέτησης στο γονιδίωμα του οργανισμού του μεταθετού στοιχείου, καθώς εισήχθη με μετασχηματισμό σε στέλεχος *ΔyA:pyr4 ΔinoB:(Af)pyrG ΔnkuA:argB*. Η εισαγωγή του μεταθετού στοιχείου Μίνος αρχικά στον υποκινητή της αναγωγής των νιτρικών *niaD*, εμποδίζει την έκφρασή του γονιδίου και την ανάπτυξη του στελέχους σε νιτρικά ως μόνη πηγή αζώτου. Μόνο αν το μεταθετό στοιχείο μετατεθεί σε άλλη θέση, το νέο στέλεχος που προκύπτει θα έχει την ικανότητα ανάπτυξης σε νιτρικά (Evangelinos *et al.* 2015).

## ΣΚΟΠΟΣ

Ο *Aspergillus nidulans* αποτελεί πρότυπο οργανισμό για τη μελέτη και κατανόηση διαφόρων βιολογικών διεργασιών τις τελευταίες δεκαετίες. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας και δράσης αντιμυκητιακών φαρμάκων και ειδικότερα του boscalid και της ομάδας των αναστολέων της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHIs).

Οι επιμέρους στόχοι ήταν:

- Η διερεύνηση των φυσιολογικών συνθηκών που διαμορφώνονται στο μικροπεριβάλλον του μύκητα, επηρεάζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα του αντιμυκητιακού boscalid και την εμφάνιση ανθεκτικού φαινοτύπου.
- Η εύρεση μεταφορέων που συμβάλλουν στη συσσώρευση του boscalid στα κύτταρα του *Aspergillus nidulans*, μέσω της κατασκευής νέων στελεχών με επιθυμητές ιδιότητες όσο και με τη χρήση προϋπαρχόντων στελεχών της τράπεζας του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας Μυκήτων .
- Τέλος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η βελτιστοποίηση της μεθόδου εύρεσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos. Το μεταθετό στοιχείο μπορεί να αποτελέσει βασικό εργαλείο για την αποκάλυψη νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας. Αφενός η ένθεσή του μπορεί να οδηγήσει σε φαινότυπο από απώλεια λειτουργίας γονιδίου (loss of function mutation), αφετέρου η ένθεσή του στον υποκινητή ενός γονιδίου μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση φαινοτύπου από υπερέκφραση το εν λόγω γονίδιο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 2.1 Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν στελέχη από την τράπεζα στελεχών του Εργαστηρίου Μοριακής Μικροβιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ. Παράλληλα, δημιουργήθηκαν και νέα στελέχη με τη χρήση τεχνικών μοριακής βιολογίας όπως παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 2 και τη χρήση του μεταθετού στοιχείου *Minos* (Evangelinos *et al.* 2015). Όλα τα στελέχη παρουσιάζονται συγκεντρωμένα στον πίνακα 2.3.

**Πίνακας 2.3:** Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν και κατασκευάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

Στέλεχος	Γονότυπος	Αναφορά
WT	<i>pabaA1</i>	-
$\Delta 7$ (a)	<i>ΔuapA uapC::pyrG ΔazgA ΔFcyB::argB ΔFurD::riboB ΔFurA::riboB ΔcntA pabaA1 pantoB100</i>	(Kryptou <i>et al.</i> 2015a)
$\Delta 7$ (b)	<i>ΔuapA uapC::pyrG ΔazgA ΔFcyB::argB ΔFurD::riboB ΔFurA::riboB ΔcntA pabaA1</i>	(Kryptou <i>et al.</i> 2015a)
$\Delta 7::uapA^+$	<i>ΔuapA uapC::pyrG ΔazgA ΔFcyB::argB ΔFurD::riboB ΔFurA::riboB ΔcntA pabaA1 pantoB100 [pBS 510<sub>p</sub> uapA-GFP argB]</i>	This study
$\Delta 7::uapC^+$	<i>ΔuapA uapC::pyrG ΔazgA ΔFcyB::argB ΔFurD::riboB ΔFurA::riboB ΔcntA pabaA1 pantoB100 [pBS uapC-GFP]</i>	This study
$\Delta 7::azgA^+$	<i>ΔuapA uapC::pyrG ΔazgA ΔFcyB::argB ΔFurD::riboB ΔFurA::riboB ΔcntA pabaA1 pantoB100 [pBS 510<sub>p</sub> azgA argB]</i>	This study
$\Delta 7::fcyB^+$	<i>ΔuapA uapC::pyrG ΔazgA ΔFcyB::argB ΔFurD::riboB ΔFurA::riboB ΔcntA pabaA1 pantoB100 [exp FcyB paba]</i>	This study
$\Delta 7::cntA^+$	<i>ΔuapA uapC::pyrG ΔazgA ΔFcyB::argB ΔFurD::riboB ΔFurA::riboB ΔcntA pabaA1 pantoB100 [pGEM-gpdA<sub>p</sub>-cntA pantoB+]</i>	This study
$\Delta 7::furA^+$	<i>ΔuapA uapC::pyrG ΔazgA ΔFcyB::argB ΔFurD::riboB ΔFurA::riboB ΔcntA pabaA1 pantoB100 [pGEM-gpdA<sub>p</sub>-FurA-GFP pantoB<sup>+</sup>]</i>	(Kryptou <i>et al.</i> 2015a)



Συνέχεια Πίνακα 2.3

<i>Δ7::furD<sup>+</sup></i>	<i>ΔuapA uapC::pyrG ΔazgA ΔFcyB::argB ΔFurD::riboB</i> <i>ΔFurA::riboB ΔcntA pabaA1 pantoB100</i> [pGEM-gpdA <sub>p</sub> -FurD pantoB <sup>+</sup> ]	(Kryptou et al. 2015a)
<i>ΔACZ::azgA-GFP</i>	<i>azgAGFP uapAΔ uapCΔ::AFpyrG azgAΔ pabaA1</i>	(Kryptou et al. 2014)
<i>uapA-GFP</i>	<i>uapAΔ::UapA-GFPL (in locus) uapCΔ::AFpyrG</i> <i>pabaA1 pantoB100</i>	(Gournas et al. 2010)
<i>uaY (a)</i>	<i>uaY9 pabaA1</i>	(Suarez et al. 1991) (Suarez et al. 1995)
<i>uaY (b)</i>	<i>uaY2 pantoB100 biA1 Ya2</i>	(Suarez et al. 1991) (Suarez et al. 1995)
<i>uaY<sup>c</sup></i>	<i>uaY462<sup>c</sup> pantoB100 biA1</i>	(Suarez et al. 1991) (Suarez et al. 1995)
<i>areA30</i>	<i>areA30 pabaA1</i>	(Kudla et al. 1990)
<i>areA102</i>	<i>areA102 pyroA4 fwA1</i>	(Kudla et al. 1990)
<i>prnBΔ</i>	<i>prnB377 pabaA1 ya2</i>	(Tavoularis et al. 2001)
<i>agtAΔ</i>	<i>agtAΔ::AFpyrG pyroA4 biA1 wA4</i>	(Apostolaki et al. 2009)
<i>acpAΔ, acpBΔ, acpCΔ</i>	<i>AN1839Δ::AFpyrG AN7317Δ::AFriboB acpAΔ::panB</i> <i>nkuAΔ::argB pantoB100 riboB2 pyrG89 pyroA4</i>	(Sa-Pessoa et al. 2015)
<i>jenAΔ, jenBΔ</i>	<i>AN6703Δ::AFriboB AN6095Δ::AFpyrG nkuAΔ::argB</i> <i>pyrG89 pyroA4 riboB2</i>	(Sa-Pessoa et al. 2015)
<i>uapAΔ</i>	<i>uapA24 pantoB100 ya2</i>	(Scazzocchio et al. 1982)
<i>uapCΔ</i>	<i>uapC201/401 pabaA1</i>	(Scazzocchio et al. 1982)
<i>uapCΔ, azgAΔ</i>	<i>uapC201 azgA4 pantoB100 biA1 ya2</i>	(Scazzocchio et al. 1982)
<i>furAΔ</i>	<i>furAΔ::riboB pantoB100 biA1 riboB2</i>	(Hamari et al. 2009)
<i>furDΔ</i>	<i>furDΔ::riboB riboB2 biA1</i>	(Hamari et al. 2009)
<i>cntAΔ</i>	<i>cntAΔ::riboB riboB2 biA1</i>	(Hamari et al. 2009)
<i>FcyBΔ</i>	<i>FcyBΔ::argB pabaA1 16</i>	(Vlanti and Diallinas 2008)
<i>A.nidulans</i> FGSCA4	<i>Aspergillus nidulans</i> wild type	*
<i>A.foetidus</i> CBS172.66	<i>Aspergillus foetidus</i> wild type	*
<i>A.niger</i> CBS513.88	<i>Aspergillus niger</i> wild type	*
<i>A.brasiliensis</i> CBS101740	<i>Aspergillus brasiliensis</i> wild type	*
<i>A.aculeatus</i> CBS 172.66	<i>Aspergillus aculeatus</i> wild type	*
<i>A.fumigatus</i> Af293	<i>Aspergillus fumigatus</i> wild type	*
<i>A.fischeri</i> CBS544.65	<i>Aspergillus fischeri</i> wild type	*
<i>A.versicolor</i> CBS 795.97	<i>Aspergillus versicolor</i> wild type	*
<i>A.wentii</i> DTO 134-E9	<i>Aspergillus wentii</i> wild type	*

Συνέχεια Πίνακα 2.3

<i>A.sidowii</i> CBS593.65	<i>Aspergillus sidowii</i> wild type	*
<i>A.terreus</i> NIH2624	<i>Aspergillus terreus</i> wild type	*
<i>A.flavus</i> CBS128202	<i>Aspergillus flavus</i> wild type	*
<i>A.glaucus</i> CBS516.65	<i>Aspergillus glaucus</i> wild type	*
<i>A.tubigensis</i> CBS134.48	<i>Aspergillus tubigensis</i> wild type	*
<i>A.carbonarius</i> DTO 115-B6	<i>Aspergillus carbonarius</i> wild type	*
wscAΔ	<i>biA1 argB2 akuB::aurA wscA::ptrA</i>	(Futagami <i>et al.</i> 2011)
wscBΔ	<i>biA1 argB2 akuB::aurA wscB::ptrA</i>	(Futagami <i>et al.</i> 2011)
wscAΔ wscBΔ	<i>biA1 argB2 akuB::aurA wscA::ptrA wscB::argB</i>	(Futagami <i>et al.</i> 2011)
gpdA-wscB	<i>biA1 argB2 pantoB100 [pGEM-gpdA<sub>p</sub>-cntA pantoB+]</i>	This study
MT2	<i>ΔyA::pyr4 ΔinoB::pyrGAf niaD-::Minos IR-yA-inoB-Minos IR argB::gpdAmini-MnTpase pantoB100</i>	(Evangelinos <i>et al.</i> 2015)
LA2	<i>ΔyA::pyr4 ΔinoB::pyrGAf niaD-::Minos IR-yA--inoB-Minos IR argB::gpdAmini-MnTpase pyroA4</i>	(Evangelinos <i>et al.</i> 2015)

\*Προσφορά από τον Prof. R. de Vries του Fungal Biodiversity Centre Institute of the Royal Netherland Academy of Arts and Sciences (KNAW)

## 2.2 Χημικά Διαλύματα και θρεπτικά υποστρώματα

2.2.1 Ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης: Tris-HCl 0,2M pH=8, SDS 1%, EDTA 1 mM pH=8

2.2.2 Διάλυμα ιχνοστοιχείων: 40 mg Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> • 10 H<sub>2</sub>O, 400 mg CuSO<sub>4</sub> • 5 H<sub>2</sub>O, 800 mg FePO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 800 mg MnSO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O. 800 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 8 g ZnSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O & προσθήκη dH<sub>2</sub>O έως το 1 L

2.2.3 Διάλυμα αλάτων: 26 g KCl, 26 g MgSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O, 76 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 ml trace-element solution, 2 ml χλωροφόρμιο (ως συντηρητικό) & προσθήκη dH<sub>2</sub>O έως το 1 L

2.2.4 Διάλυμα αλάτων Φαρμάκων: 26 g KCl, 26 g MgSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O, 76 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 ml trace-element solution, 2 ml χλωροφόρμιο (ως συντηρητικό) & προσθήκη dH<sub>2</sub>O έως το 1 L

2.2.5 Διάλυμα Βιταμινών: 20 mg p-aminobenzoic acid, 50 mg aneurin, 10 ml biotin, 100 mg nicotinic acid, 200 mg calcium D-pantothenate, 50 mg pyridoxine • HCl, 100 mg riboflavin & προσθήκη dH<sub>2</sub>O έως το 1 L.

2.2.6 Ρυθμιστικό Διάλυμα pH 5,5 1 M: Τα 100 ml Buffer εμπεριέχουν  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  7,9 ml &  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  92,1 ml

2.2.7 Ρυθμιστικό Διάλυμα pH 6,8 1 M: Τα 100 ml Buffer εμπεριέχουν  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  46.3 ml &  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  53,7 ml

2.2.8 Ρυθμιστικό Διάλυμα pH 8,0 1 M: Τα 100 ml Buffer εμπεριέχουν  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  93.2 ml &  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  6,8 ml

2.2.9 Διάλυμα P1: 50 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM EDTA

2.2.10 Διάλυμα P2: 200 mM NaOH. 1% SDS

2.2.11 Διάλυμα P3: 3 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH= 5,5

2.2.12 Διάλυμα TFB I : 30 mM  $\text{CH}_3\text{COOK}$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{MnCl}_2$ , 100 mM  $\text{RbCl}_2$ , 15% γλυκερόλη, 1 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$  pH=5,8

2.2.13 Διάλυμα TFB II 10 mM MOPS pH= 6,5, 75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{RbCl}_2$ , 15% γλυκερόλη, 1 M KOH pH=6.5

2.2.14 PBS Ρυθμιστικό Διάλυμα: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα NaOH 3M και διάλυμα HCl 3M στο 7.4. Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C, p= 1 atm για 20 min.

2.2.15 Πλήρες στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Complete media agar (**CM**)) : Διάλυμα Αλάτων 20 ml, Διάλυμα Βιταμινών 10 ml, Casamino acids 1 g, Yeast extract 1 g, Bactoreptone 2 g, D- Γλυκόζη 10 g, 17 g Άγαρ & προσθήκη  $\text{dH}_2\text{O}$  έως το 1 L. Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα NaOH 3M και διάλυμα HCl 3 M στο 6,8. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C, p= 1 atm για 20 min.

2.2.16 Ελάχιστο Στερεό Θρεπτικό Υπόστρωμα (Minimal Media agar (**MM**)): Διάλυμα Αλάτων 20 ml, Γλυκόζη 10 g ή Φρουκόζη 1 g, 15 g Oxoid Άγαρ & προσθήκη  $\text{dH}_2\text{O}$  έως το 1 L. Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα NaOH 3 M και διάλυμα HCl 3M στο 6,8. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C, p= 1 atm για 20 min.

**Πίνακας 2.1:** Χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται κατά την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων και προστίθενται μετά την αποστείρωση αυτών.

Χημικές ουσίες	Συμπύκνωση Αρχικού Δ/τος	Συγκέντρωση Αρχικού Δ/τος
Ammonium tartate ( $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ )	100x	9,2 % w/v
p-aminovenzoic acid ( $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}$ )	100x	0,2 % w/v
D-βιοτίνη ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ )	1000x	0,2 % w/v
Calcium-D-pantothenate ( $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_5$ )	100x	1 % w/v
Νιτρικό Νάτριο( $\text{NaNO}_3$ )	100x	8,5 % w/v
Νιτρώδες Νάτριο ( $\text{NaNO}_2$ )	100x	6,9 % w/v
Αργινίνη ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ )	100x	10,54 % w/v
Ουρία ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ )	100x	3 % w/v
Ριβοφλαβίνη ( $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ )	100x	0,01 % w/v
Πυριδοξίνη ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$ )	100x	0,01 % w/v
Ινοσιτόλη ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	100x	0,2 % w/v

2.2.17 Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Σουκρόζης (Sucrose Media Agar (**SM**)): Διάλυμα Αλάτων 20 ml, D-Σουκρόζη 342,3 g, D- Γλυκόζη 10 g, Oxoid Άγαρ 15 g & προσθήκη  $\text{dH}_2\text{O}$  έως το 1 L. Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα  $\text{NaOH}$  3M και διάλυμα  $\text{HCl}$  3M στο 6,8. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους  $121^\circ\text{C}$ ,  $p=1\text{ atm}$  για 20 min.

2.2.18 Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Σουκρόζης επικάλυψης (Top Sucrose Media Agar(**Top SM**)): Διάλυμα Αλάτων 20 ml, D- Σουκρόζη 342,3 g, D- Γλυκόζη 10 g, Oxoid Άγαρ 6 g & προσθήκη  $\text{dH}_2\text{O}$  έως το 1 L. Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα  $\text{NaOH}$  3 M και διάλυμα  $\text{HCl}$  3 M στο 6,8. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους  $121^\circ\text{C}$ ,  $p=1\text{ atm}$  για 20 min.

Οι ουσίες με μυκητοκτόνο δράση που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2, καθώς επίσης και οι διαλύτες τους όπως και τα αντίστοιχα μοριακά βάρη των ουσιών.

**Πίνακας 2.2:** Οι ουσίες με μυκητοκτόνο δράση που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Χημική Ομάδα	Δραστική Ουσία	MLB.	10ppm → μM	Διαλύτης
SDHI's	Boscalid	343.21	29.14 μM	Methanol
	Isopyrazam	359.41	27.82 μM	Methanol
Strobilurin type	Fluopyram	396.71	25.21 μM	Methanol
	Pyraclostrobin	387.82	25.79 μM	Methanol
	Azoxystrobin	403.39	24.79 μM	Acetonitril
	Trifloxystrobin	408.37	24.49 μM	Methanol
	Fluoxastrobin	458.83	21.79 μM	Dichloromethane
	Kresoxim-methyl	313.35	31.91 μM	Toluene
Phenylpyrroles	Fludioxonil	248.19	40.29 μM	Methanol
Anilinopyrimidines	Cyprodinil	225.29	44.39 μM	Ethanol
DMI's (Azoles)	Pyrimethanil	199.25	50.19 μM	Methanol
	Flusilazole	315.39	31.71 μM	Dichloromethane
	Epoxiconazole	329.76	30.33 μM	Acetonitril
	Difenoconazole	406.26	24.61 μM	Ethanol

2.2.19 Θρεπτικό υπόστρωμα Μικροσκοπίας (MicM): Διάλυμα Αλάτων χωρίς φωσφορικά κατάλοιπα 20 ml, D- Γλυκόζη 1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM & προσθήκη  $\text{dH}_2\text{O}$  έως το 1 L. Η αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος γίνεται σε χύτρα ταχύτητος αυστηρά για 15 min.

2.2.20 Στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB: Luria Broth 20 g, Άγαρ 14g & προσθήκη  $\text{dH}_2\text{O}$  έως το 1 L. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο στους 121 °C, p= 1 atm για 30 min.

2.2.21 Διάλυμα I:  $\text{MgSO}_4$  1,2 M, Ορθοφωσφορικά 10 mM pH=5,8

2.2.22 Διάλυμα II: Σορβιτόλη 1 M,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, Tris-HCl 10 mM pH=7,5

## 2.3 Απομόνωση γενωμικού DNA από νεαρό μυκήλιο *Aspergillus nidulans*

- Με σπάτουλα συλλέγεται το ¼ του μυκηλίου που έχει αναπτυχθεί για 4 περίπου ημέρες σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Complete Media (§2.1.15), το οποίο επωάζεται σε 25 ml Minimal Media, σε κωνική φιάλη των 100 ml για 16h στους 37°C στις 140 rpm μέχρι τη δημιουργία νεαρού μυκηλίου.
- Η καλλιέργεια φιλτράρεται με blutex και το μυκήλιο που συλλέγεται στεγνώνεται πολύ καλά με τη βοήθεια απορροφητικού χαρτιού. Το μυκήλιο τοποθετείται σε κομμάτι αλουμινόχαρτου όπου τυλίγεται, για να αποφευχθούν οι απώλειες μυκηλίου και παγώνεται εντός υγρού αζώτου (-80 °C).
- Το μυκήλιο μεταφέρεται σε γουδί που περιέχει ήδη υγρό άζωτο και θρυμματίζεται κάνοντας κυκλικές κινήσεις (δίσ).
- Το θρυμματισμένο μυκήλιο συλλέγεται (περίπου 100-200 mg) σε φιαλίδιο τύπου Eppendorf και τοποθετείται ξανά εντός υγρού αζώτου ώστε να παραμένει παγωμένο.
- Προστίθενται 800 µl Ρυθμιστικό διάλυμα απομόνωσης (§2.2.1) και αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια vortex μέχρι να ομογενοποιηθεί. Ακολουθεί επώαση για 20 min στον πάγο.
- Προστίθενται 800 µl φαινόλης και αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια vortex μέχρι να ομογενοποιηθεί. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm.
- Πολύ προσεκτικά η άνω (υδατική) φάση μεταφέρεται, χωρίς να συλλεχθεί καθόλου φαινόλη, σε νέο Eppendorf και προστίθενται 800 µl (ίσο όγκο) χλωροφορμίου και αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια vortex μέχρι να ομογενοποιηθεί. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm.
- Πολύ προσεκτικά η άνω (υδατική) φάση μεταφέρεται, χωρίς να συλλεχθεί καθόλου χλωροφόρμιο σε νέο Eppendorf.
- Προστίθεται ίσο με το 1/10 του όγκου του δείγματος CH<sub>3</sub>COONa 3M pH=5,3 και ίσος όγκο δείγματος ισοπροπανόλη. Αναδεύεται ομαλά με το χέρι. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm.
- Το υπερκείμενο αποχύνεται με έντονη κίνηση και προστίθενται 200 µl Αιθανόλης 70% και χωρίς ανάδευση φυγοκεντρείται για 2 min στις 12000 rpm.

- Η αιθανόλη αφαιρείται πλήρως με τη βοήθεια πιπέτας και το δείγμα στεγνώνεται στους 50 °C για περίπου 20 min (μέχρι πλήρους εξατμίσεως της αιθανόλης).
- Το δείγμα αναδιαλύεται σε 50 µl απιονισμένου νερού και προστίθεται RNase σε συγκέντρωση 100 µg/ml. Το δείγμα επωάζεται στους 37 °C για 30 min.
- Τα δείγματα DNA φυλάσσονται στους -20 °C.

## 2.4 Μετασχηματισμός πρωτοπλαστών από κονιδιοσπόρια *Aspergillus nidulans*

- Με σπάτουλα συλλέγεται το ¼ του μυκηλίου, το οποίο έχει αναπτυχθεί για 4 περίπου ημέρες σε πλήρες στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (§2.2.15). Τα συλλεγόμενα κονιδιοσπόρια αναδιαλύονται σε 10 ml διαλύματος Tween 0,02% και φιλτράρονται με τη βοήθεια αποστειρωμένου blutex. Με το εναιώρημα των κονιδίων εμβολιάζονται 200 ml MM σε κωνική φιάλη του 1L και επωάζεται για περίπου 4 h στους 37 °C σε 120 rpm.
- Πριν την παρέλευση των 4 ωρών ελέγχεται η καλλιέργεια ώστε να μην ξεπεραστεί το στάδιο ανάπτυξης που ενδείκνυται για τον μετασχηματισμό. Σε οπτικό πεδίο οπτικού μικροσκοπίου μεγέθυνσης x40 τα σπόρια θα πρέπει να εμφανίζουν κάποια συσσωματώματα και ένα τουλάχιστον κονιδιοσπόριο του οπτικού πεδίου θα πρέπει να έχει εκβλαστήσει.
- Τα εναιώρημα των κονιδιοσπορίων συλλέγεται σε Falcons και φυγοκεντρείται για 10 min στις 4000 rpm.
- Το θρεπτικό υπόστρωμα αποχύνεται και τα κονιδιοσπόρια εναιωρούνται σε 20 ml αποστειρωμένου διαλύματος I (§2.2.21). Το νέο εναιώρημα από χύνεται σε αποστειρωμένη κωνική στην οποία προστίθενται 170 mg ενζύμου Glucanex.
- Επωάζεται για 1-2 h στους 30 °C υπό ανάδευση 60 rpm
- Οι πρωτοπλάστες συγκεντρώνονται φυγοκεντρώντας για 10 min στις 4000 rpm.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα (πρωτοπλάστες) επαναιωρείται σε 10 ml Διάλυμα II (§2.2.22). Ακολουθεί ξέπλυμα των πρωτοπλαστών και φυγοκέντρωση για 10 min στις 4000 rpm.

- Αφαιρείται το υπερκείμενο οι πρωτοπλάστες αναδύονται σε κατάλληλο όγκο Διαλύματος II (§2.2.22) και μοιράζεται σε Eppendorf των 2 ml, 400 µl εναιωρήματος σπορίων με διάλυμα PEG 4000 50µl .

**Στην παρούσα φάση οι πρωτοπλάστες μπορούν να αποθηκευτούν στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για μετασχηματισμό.**

- Το DNA προστίθεται στο εναιώρημα των πρωτοπλαστών και το δείγμα επωάζεται για 15 min στον πάγο. Συμπεριλαμβάνεται δείγμα αρνητικού μάρτυρα στο οποίο δεν έχει προστεθεί DNA
- Προστίθενται 500 µl 60% PEG 4000, στη συνέχεια αναδεύεται πολύ καλά με απότομες κινήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι την παρέλευση του χρόνου επώασης για 15 min ( 2-3 φορές) σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 10 min στις 6000 rpm.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται στους πρωτοπλάστες 1 ml από το Διάλυμα II (§2.2.13) χωρίς να επαναδιαλυθεί το ίζημα. Οι πρωτοπλάστες ξεπλένονται, φυγοκεντρώντας για 2 min στις 6000 rpm.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο και οι πρωτοπλάστες επαναδιαλύονται σε 200 µl του Διαλύματος II.
- Το εναιώρημα των πρωτοπλαστών αποχύνεται σε Falcon των 15 ml και προστιθενται 4 ml Top SM (§2.2.18). Ακολουθεί προσεκτική και γρήγορη ανακίνηση και εμβολιασμός σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα SM. Με κυκλικές κινήσεις του τρυβλίου το εμβόλιο ισομοιράζεται χωρίς κενά σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου.
- Με την παρέλευση 15 min και το πήξιμο του Top SM (§2.2.18) τα τρυβλία επωάζονται για 4 ημέρες στους 37 °C.

## 2.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από E coli ( mini prep)

- Συλλέγεται 1 ml υγρής κορεσμένης καλλιέργειας LB σε Eppendorf και φυγοκεντρείται για 1 min στις 12.000 rpm.



- Αφαιρείται πλήρως το υπερκείμενο και αναδιαλύεται σε 200 μl Διαλύματος P1 (§2.2.9). Ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση μέχρι να αναδιαλυθούν πλήρως τα κύτταρα
- Προστίθενται 200 μl Διαλύματος P2 (§2.2.10) και ακολουθεί ήπια ανακίνηση δια χειρός.
- Έπειτα προστίθενται 200 μl Διαλύματος P3 (§2.2.11) και ακολουθεί ήπια ανακίνηση δια χειρός.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm.
- Το υπερκείμενο συλλέγεται σε ένα Eppendorf και προστίθεται 500 μl ισοπροπανόλης και ανακινείται ελαφρώς. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 12000 rpm.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται 200 μl διαλύματος αιθανόλης 70%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 5 min 12000 rpm.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται πλήρως και το δείγμα στεγνώνεται είτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους 50 °C για 15 min.
- Το δείγμα αναδιαλύεται σε 100 μl απιονισμένου νερού και προστίθενται RNAase σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml. Το δείγμα επιάζεται στους 37 °C για 30 min.
- Το DNA μπορεί να αποθηκευτεί για ορισμένο χρονικό διάστημα στους -20 °C.

## 2.6 Μέθοδος εύρεσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos

### **Προετοιμασία θρεπτικών υποστρωμάτων και στελεχών που περιέχουν το μεταθετό στοιχείο Minos.**

Αποστειρώνεται και επιστρώνεται ελάχιστο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (§2.1.16), το οποίο περιέχει τις απαραίτητες αυξοτροφίες, μοναδική πηγή αζώτου τα νιτρικά ιόντα και τον περιοριστικό παράγοντα επιλογής (φάρμακα, αντιμυκητιακές ενώσεις, τοξικά ανάλογα πουρινών κ.α.). Σε 4 τρυβλία με πλήρες στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (§2.1.15) έχουν εμβολιαστεί προ πενθημέρου στελέχη που εμπεριέχουν το μεταθετό στοιχείο Minos. Τα σπόρια συλλέγονται με αποστειρωμένη σπάτουλα και εναιωρούνται σε διάλυμα Tween20 0.02%.

Το διάλυμα των σπορίων συμπυκνώνεται κατάλληλα και ύστερα αποχύνεται εντός Top Agar MMG (Άγαρ 0.6 % w/v) το οποίο δεν έχει πήξει και η θερμοκρασία του δεν υπερβαίνει τους 45 °C. Η περιεκτικότητα του δ/τος σπορίων με Tween20 δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% v/v στον τελικό όγκο του Top Agar MMG (§2.2.16, Άγαρ 0,6%) .

Τέλος, με τη βοήθεια αποστειρωμένου πλαστικού σωλήνα τύπου Φάλκον το τελικό δ/μα ισομοιράζεται στα τρυβλία επιλογής, περίπου 5 ml ανά τρυβλίο και τα τρυβλία αφήνονται σε ηρεμία για περίπου 30 min μέχρι να πήξουν.

Ακολουθεί επώαση σε κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας.

### **Πέψη γενωμικού DNA *Aspergillus nidulans* με την περιοριστική ενδονουκλεάση Sau3A**

Πραγματοποιήθηκε 4 ώρες πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Sau3A. Η ποσότητα του ενζύμου προστέθηκε σταδιακά στο δείγμα στο χρόνο 0 h και 2 h. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ένζυμο αυτό επιλέχθηκε κατάλληλα για δύο βασικούς λόγους. Αφενός μεν το ένζυμο αυτό δεν διαθέτει θέσεις κοπής εντός των δύο επαναλαμβανόμενων πλευρικών αλληλουχιών “Minos IRs”, τα οποία αποτελούν οδηγό και μήτρα για την εύρεση της θέσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου . Αφετέρου, η θέση περιορισμού για το ένζυμο αυτό είναι η αλληλουχία 5'-GATC-3'. Η αλληλουχία αυτή σε σχέση με άλλα ένζυμα που αναγνωρίζουν πέντε ή έξι νουκλεοτίδια ως θέση κοπής, εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στο γονιδίωμα του *Aspergillus nidulans*, οπότε τα τμήματα του κατακεραματισμένου από το ένζυμο DNA, είναι σχετικά μικρότερα και επομένως ευκολότερα στη διαχείριση κατά τη διάρκεια της μεθόδου που θα παρουσιαστεί παρακάτω.

Ειδικότερα, γενωμικό DNA (περίπου 1000 ng/μl) επώαστηκε σε θερμοκρασία 37 °C με τελική συγκέντρωση ενζύμου 1,4 units. Το κατάλληλο ρυθμιστικό δ/μα δράσης του ενζύμου Sau3A ήταν σε τελική συγκέντρωση 1x σύμφωνα με τις προδιαγραφές του ενζύμου και η τελική συγκέντρωση ρυθμίστηκε με την προσθήκη απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού σε τελικό όγκο αντίδρασης 30 μl. Μετά το πέρας των τεσσάρων

ωρών τα δείγματα επώαστηκαν στους 65 °C για 20 min με σκοπό την απενεργοποίηση του ενζύμου.

### **Συγκόλληση (Ligation)**

Μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού ακολουθεί η συγκόλληση των τμημάτων DNA που προέκυψαν με τη χρήση NEB T4 ligase<sup>TM</sup> (2,000,000 units/ml) σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση. Στο δείγμα του κομμένου DNA προστίθενται 20 μl από 10x DNA ligase buffer και 0,16 μl NEB T4 ligase<sup>TM</sup> (2,000,000 units/ml) τέλος αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό προστίθενται σε τελικό όγκο 200 μl και η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου overnight (~ 20 °C).

### **Καθαρισμός δειγμάτων**

Την επόμενη μέρα ακολουθεί καθαρισμός δειγμάτων με την προσθήκη ίσου όγκου με του δείγματος αλκοολούχου διαλύματος Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol σε αναλογία 100:96:4 σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί έντονη ανάδευση με vortex για περίπου 1 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 8 min στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη μεταφορά 160 μl από το υπερκείμενο σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα των 1,5 ml, προστίθενται σε κάθε δείγμα 400 μl 100% EtOH και 16 μl 3 M CH<sub>3</sub>COONa pH 5,2, γίνεται ήπια ανάδευση δια χειρός και επωάζονται στους -80 °C για 1 h· εναλλακτικά μπορεί να γίνει επώαση στους 4 °C overnight. Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 12000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο αποχύνεται. Τα δείγματα στεγνώνονται στους 50 °C για 15 min και αναδιαλύονται σε 30 μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.

### **Ενίσχυση περιοχής ένθεσης του μεταθετού στοιχείου και αλληλούχηση αυτής**

Οι γενωμικές περιοχές που πλαισιώνουν το μεταθετό στοιχείο Minos (Minos flankings) ενισχύθηκαν σύμφωνα με την παρακάτω μεθοδολογία. Τα θραύσματα από το γενωμικό DNA που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία ενισχύθηκαν με μια ακολουθία αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης. Η πρώτη αντίδραση παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.4.

Ένα αρχικό στάδιο 2 min στους 95 °C, ακολουθήθηκε από 30 κύκλους που περιλαμβάνουν 30 sec σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 30 sec σε θερμοκρασία 55 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 3 min στους 72 °C, όπου σχηματιστήκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 5 min. Τα τελικά προϊόντα της PCR δεν ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και ακολούθησε απευθείας ο καθαρισμός αυτών με πρωτόκολλο καθαρισμού αιθανόλης.

**Πίνακας 2.4:** Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις αυτών κατά την πρώτη αντίδραση εύρεσης της περιοχής ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση 25 µl
10x Kapa Buffer με $Mg^{2+}$	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Minos External_New primer (10 mM)	2,5 µl
Minos End F primer (10 mM)	2,5 µl
Απολινωμένο DNA	5 µl
KAPA Taq DNA Polymerase (5units/ul), Kapa Biosystems	0,2 µl
dd H <sub>2</sub> O	11,8 µl

Σε κάθε δείγμα προστίθεται 2,5x του όγκου του αιθανόλη και 1/10 αυτού  $CH_3COONa$  pH=5.2 και ακολουθεί ήπια ανάδευση. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία -80 °C για 1 h. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 12 min στις 12000 rpm και το υπερκείμενο αποχύνεται. Στη συνέχεια προστίθενται 50 µl διαλύματος αιθανόλης 70%, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 12 min στις 12000 rpm και το υπερκείμενο αφαιρείται με τη βοήθεια πιπέτας. Τα δείγματα στεγνώνονται στους 50 °C για 10 min και το προϊόν επαναιωρείται σε 20 µl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού.

Τα θραύσματα από το γενωμικό DNA που ενισχύθηκαν με την πρώτη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ενισχύθηκαν στη συνέχεια με μια δεύτερη εσωτερική (nested) PCR. Η δεύτερη αντίδραση παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.5. Ένα αρχικό στάδιο 2 min στους 95 °C, ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 30 sec σε θερμοκρασία

αποδιάταξης στους 95 °C, 30 sec σε θερμοκρασία 53 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 3 min στους 72 °C, όπου σχηματιστήκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 5 min. Από τα τελικά προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν 5 µl σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία.

**Πίνακας 2.5:** Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις αυτών κατά τη δεύτερη αντίδραση (nested PCR) εύρεσης της περιοχής ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση 25 µl
10x Kapa Buffer με Mg <sup>2+</sup>	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Minos_PCR1_F (23) (10 mM)	2,5 µl
Minos_PCR1_R (24) (10 mM)	2,5 µl
DNA 1 <sup>ης</sup> PCR	2 µl
KAPA Taq DNA Polymerase (5units/ul), Kapa Biosystems	0,2 µl
dd H <sub>2</sub> O	14,8 µl

Στο στάδιο αυτό εμφανίζονται μερικώς πιο έντονες ζώνες όπου βρίσκονται τα ενισχυμένα προϊόντα από την ένθεση του μεταθετού στοιχείου. Στη συνέχεια, στο ενισχυμένο τμήμα DNA, που φαίνεται μερικώς στο πήκτωμα αγαρόζης, γίνεται εξαγωγή αυτού από τη γέλη αγαρόζης και καθαρισμός με “ Gel Extraction KIT” σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του προμηθευτή.

Η περαιτέρω ενίσχυση των προϊόντων της αντίδρασης και η κλωνοποίηση των τμημάτων αυτών, συνοδεύεται από μια ακόμη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που ονομάζεται 3<sup>η</sup> PCR. Μήτρα για την αντίδραση αυτή αποτελεί το DNA το οποίο απομονώθηκε από τη γέλη αγαρόζης όπως παρουσιάζεται παραπάνω. Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.6. Ένα αρχικό στάδιο 2 min στους 95 °C, ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 30 sec σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 30 sec σε θερμοκρασία 53 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια

σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 3 min στους 72 °C, όπου σχηματιστήκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 5 min. Από τα τελικά προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν 5 μl σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα PCR προϊόντα διαχωρίστηκαν από τους εκκινητές και τα ελεύθερα νουκλεοτίδια με τη χρήση του Nukleospin Kit (MN, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

**Πίνακας 2.6:** Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις αυτών κατά την τρίτη αντίδραση εύρεσης της περιοχής ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση 25 μl
5x HF Buffer με Mg <sup>2+</sup>	5 μl
dNTPs (10 mM)	0,5 μl
Minos_PCR1_F (23) (10 mM)	2,5 μl
Minos_PCR1_R (24) (10 mM)	2,5 μl
DNA 2 <sup>ης</sup> PCR	2 μl
Phusion DNA Polymerase (5units/μl)	0,2 μl
dd H <sub>2</sub> O	12,8 μl

Τα προϊόντα του καθαρισμού από τη γέλη κλωνοποιήθηκαν σε Blunt Venter Invitrogen σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και τα προϊόντα της αντίδρασης μετασχημάτισαν σε δεκτικά κύτταρα *E. coli*. Ακολουθεί επώαση των τρυβλίων που περιείχαν 50 μg/mL kanamycin overnight, χωρίς η επώαση στο σύνολό της να ξεπερνά τις 16 ώρες. Σε 6 από τις αναπτυγμένες αποικίες γίνεται colony PCR όπως περιγράφεται στον Πίνακα 2.7.

Από τις αποικίες που θα παρατηρηθεί θετική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποικίας (colony PCR) *E.coli* επιλέγεται τυχαία μία αποικία και στο πλασμίδιο αυτό γίνεται αλληλούχηση των νουκλεοτιδίων του. Η αλληλούχηση των πλασμιδίων έγινε με τη χρήση του πρωταρχικού τμήματος M13 Forward 5'GTAAAACGACGGCCAG3'

σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας κατασκευής. Η εύρεση της ένθεσης πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BLAST NCBI.

**Πίνακας 2.7:** Τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις αυτών κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποικίας ύστερα από την κλωνοποίηση της περιοχής ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση 25 $\mu$ l
5x HF Buffer με $Mg^{2+}$	5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ l
Minos_PCR1_F (23) (10 mM)	2,5 $\mu$ l
Minos_PCR1_F (24) (10 mM)	2,5 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	12,8 $\mu$ l
Phusion DNA Polymerase (5units/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
<i>E. coli cells</i>	

Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διαδικασία εύρεσης της ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos ( Πίνακας 2.8).

**Πίνακας 2.8:** Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διαδικασία εύρεσης της ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos.

Μόριο Εκκινήτης	Αλληλουχία
Minos_External_New	CGCCGCGTTCGAATTAATAGTG
Minos_End_F	CCACTATTAATTCGAACGCGGC
Minos_PCR1_F (23)	GTTTTGCTCTATTTCCAACAACAAC
Minos_PCR1_F (24)	CTCTTTGAGACGAAATGCATTGG

## 2.7 Δημιουργία δεκτικών κυττάρων ( competent cells ) *E. coli*

- Μια απομονωμένη αποικία *E. coli* ( DH5a) εμβολιάζεται σε 2 σωλήνες που εμπεριέχουν 5 ml αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB, στον έναν προστίθεται αμπικιλίνη και οι καλλιέργειες επωάζονται για 16 h στους 37 °C στις 220 rpm.

- Από την πυκνή καλλιέργεια βακτηρίων που παράγεται, χρησιμοποιούνται 2,5 ml για τον εμβολιασμό 250 ml υγρού LB σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 2 L για τον βέλτιστο αερισμό και ανάδευση.
- Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για ανάδευση στις 220 rpm μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας να φτάσει το 0,45-0,55 σε μήκος κύματος 600 nm.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των κυττάρων για 5 min στις 4000 rpm στους 4 °C.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 100 ml κρούου Διαλύματος TFB I (§ 2.1.12) , τα κύτταρα επωάζονται για 5 min στον πάγο και φυγοκεντρώνται για 5 min στις 4000 rpm και στους 4 °C.
- Το υποκείμενο αφαιρείται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml ψυχρού Διαλύματος TFB II (§ 2.1.13).
- Το εναιώρημα των κυττάρων επωάζεται για 15-60 min στον πάγο.
- Στην συνέχεια, τα κύτταρα διαμοιράζονται σε Eppendorf ( 200 µl / Eppendorf ) και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -80 °C.

## 2.8 Κατασκευή στελεχών σε ισογενετικό υπόβαθρο στελέχους Δ7 και άλλων στελεχών.

Στην προσπάθεια να ταυτοποιηθούν ποιοι από τους μεταφορείς νουκλεοβάσεων, νουκλεοσιδίων ή αλλαντοΐνης σχετίζεται με την τοξικότητα του boscalid, Δ7 (b) στέλεχος (Krypotou *et al.* 2015 a), μετασχηματίστηκε κάθε φορά με ένα πλασμίδιο το οποίο υπερέκφραζε έναν από τους επτά μεταφορείς (§ 2.5). Το στέλεχος Δ7 έχει διαγραμμαμένους και τους επτά αυτούς μεταφορείς πουρινών πυριμιδινών και αλλαντοΐνης.

Το στέλεχος Δ7::*uarA*<sup>+</sup> κατασκευάστηκε ως εξής. Το γονίδιο του μεταφορέα *uarA* είχε κλωνοποιηθεί σε πλασμίδιο όπως αναφέρεται από (Pantazopoulou *et al.* 2007). Η επιλογή των μετασχηματισμένων στελεχών έγινε παρουσία ουρικού οξέος ως μοναδική πηγή αζώτου σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM. Ο μετασχηματισμός έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Παραγράφου 2.5. Χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας σε δοκιμές αύξησης το αρχικό στέλεχος Δ7 το οποίο δεν μπορούσε να αυξηθεί παρουσία ουρικού οξέος, καθώς σε αυτό έχουν διαγραφεί και οι δύο μεταφορείς ουρικού οξέως UarA UarC



και για θετικό μάρτυρα ένα στέλεχος αγρίου τύπου (wt) που είχε κανονική αύξηση παρουσία ουρικού οξέος ως μοναδική πηγή αζώτου .

Το στέλεχος  $\Delta 7::uarC^+$  κατασκευάστηκε ως εξής. Το γονίδιο του μεταφορέα *uarC* είχε κλωνοποιηθεί σε πλασμίδιο όπως αναφέρεται από (Valdez-Taubas *et al.* 2000β). Η επιλογή των μετασχηματισμένων στελεχών έγινε παρουσία ουρικού οξέος ως μοναδική πηγή αζώτου σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM. Ο μετασχηματισμός έγινε σύμφωνα με την Παράγραφο 2.5. Χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας σε δοκιμές αύξησης το αρχικό στέλεχος  $\Delta 7$  το οποίο δεν μπορούσε να αυξηθεί παρουσία ουρικού οξέος, καθώς σε αυτό έχουν διεγραφεί και οι δύο μεταφορείς ουρικού οξέος UarA UarC και ως θετικός μάρτυρας ένα στέλεχος αγρίου τύπου (wt) που είχε κανονική αύξηση παρουσία ουρικού οξέος ως μοναδική πηγή αζώτου .

Η κατασκευή των στελεχών  $\Delta 7::fcyB^+ \Delta 7::azgA^+$  πραγματοποιήθηκε με πλασμίδια στα οποία ήταν κλωνοποιημένα έκαστο από τα δύο γονίδια των μεταφέρων αυτών σύμφωνα με (Vlanti and Diallinas 2008) και (Krypotou *et al.* 2014) αντίστοιχα. Τα πλασμίδια εισήχθησαν με μετασχηματισμό σύμφωνα με την Παράγραφο 2.5. Η επιλογή των μετασχηματισμένων στελεχών έγινε παρουσία αδερίνης ως μοναδική πηγή αζώτου σε τελική συγκέντρωση 0.5 mM. Χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας σε δοκιμές αύξησης το αρχικό στέλεχος  $\Delta 7$  το οποίο δεν μπορούσε να αυξηθεί παρουσία αδερίνης , καθώς σε αυτό έχουν διεγραφεί όλοι οι γνωστοί μεταφορείς αδερίνης και ως θετικός μάρτυρας ένα στέλεχος αγρίου τύπου (wt) που είχε κανονική αύξηση παρουσία αδερίνης ως μοναδική πηγή αζώτου.

Η κατασκευή του στελέχους  $\Delta 7::cntA^+$  πραγματοποιήθηκε με φορέα κλωνοποίησης τον pGEM-T-easy vector που φέρει ισχυρό υποκινητή *gpdA* (περίπου 1000 bp). Το γονίδιο *cntA* κλωνοποιήθηκε στις θέσεις περιορισμού AatII και SpeI της περιοχής πολυκλωνοποίησης (MCS), η περιοχή τερματισμού της *trpC3'* κλωνοποιείται στις θέσεις περιορισμού NotI και PstI του MCS, και το γονίδιο *pantoB*, στις θέσεις περιορισμού NdeI του MCS (Krypotou *et al.* 2015α). Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του μεταφορέα νουκλεοσιδίων *cntA* ενισχύθηκε από άγριου τύπου γονιδιωματικό DNA *A. nidulans* με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα εκκινητικά μόρια και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις περιορισμού SpeI και NotI του φορέα του MCS. Τα

ολιγονουκλεοτίδια CntA ORF SpeI F και CntA ORF NotI R που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση που απαριθμούνται στο Πίνακα 2.9 ενώ τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης φαίνεται στον πίνακα 2.10.

**Πίνακας 2.9:** Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη τη διαδικασία κλωνοποίησης των μεταφορέων που εξεταστήκαν και άλλων γονιδίων.

Μόριο Εκκινητής	Αλληλουχία
CntA ORF SpeI F	CGCGACTAGTATGGCCAACGAAAACGTGCTGGAGG
CntA ORF NotI R	CGCGGCGGCCGCTTACGAAGTAGCAGTGGTCATATACTGC
ORFWSCB_SPE1_F	GCGCACTAGTATGAATATAACAGCTTATTACGCC
ORFWSCB_NOT1_R	GCGCGCGGCCGCTTAGAAAAAGAAGCTGTAGCGGCG

**Πίνακας 2.10:** Συστατικά για την ενίσχυση και κλωνοποίηση του μεταφορέα νουκλεοσιδίων *cntA* κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση 25 $\mu$ l
5x HF Buffer με $Mg^{2+}$	5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ l
CntA ORF SpeI F (10 mM)	2,5 $\mu$ l
CntA ORF NotI R (10 mM)	2,5 $\mu$ l
DNA 2 <sup>ης</sup> PCR	2 $\mu$ l
Phusion DNA Polymerase (5units/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	12,8 $\mu$ l

Ένα αρχικό στάδιο 2 min στους 95 °C, ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 30 sec σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 30 sec σε θερμοκρασία 57 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 3 min στους 72 °C, όπου σχηματιστήκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 5 min. Από τα τελικά προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν 5  $\mu$ l σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα PCR προϊόντα

διαχωρίστηκαν από τους εκκινητές και τα ελευθέρως νουκλεοτίδια με τη χρήση του Nukleospin Kit (MN, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα προϊόντα του καθαρισμού από τη γέλη κλωνοποιήθηκαν σε φορέα pGEM-T-easy vector τα προϊόντα της αντίδρασης μετασχημάτισαν σε δεκτικούς πρωτοπλάστες *Aspergillus nidulans* (§ 2.3).

Τα στελέχη  $\Delta 7::furA^+$  και  $\Delta 7::furD^+$  που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη κατασκευάστηκαν όπως αναφέρεται από (Krypotou *et al.* 2015a) στο ίδιο ισογενετικό υπόβαθρο  $\Delta 7$ .

Η κατασκευή του στελέχους *gpdA-wscB* πραγματοποιήθηκε σε αρχικό στέλεχος αγρίου τύπου με γονότυπο *biA1 argB2 pantoB100*. Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο pGEM-T-easy vector που φέρει ισχυρό υποκινητή *gpdA* (περίπου 1000 bp). Το γονίδιο *wscB* κλωνοποιήθηκε στις θέσεις περιορισμού AatII και SpeI της περιοχής πολυκλωνοποίησης (MCS)·η περιοχή τερματισμού της *trpC3'* κλωνοποιείται στο στις θέσεις περιορισμού NotI και PstI του MCS, και το γονίδιο *pantoB*, στις θέσεις περιορισμού NdeI του MCS (Krypotou *et al.* 2015a). Το ORF του γονιδίου *wscB* ενισχύθηκε από άγριου τύπου γονιδιωματικό DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα εκκινητικά μόρια και κλωνοποιήθηκε στις θέσεις περιορισμού SpeI και NotI του φορέα του MCS.

**Πίνακας 2.11:** Συστατικά για την ενίσχυση και κλωνοποίηση του γονιδίου *wscB* κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Αντιδραστήρια	Αντίδραση 25 $\mu$ l
5x HF Buffer με $Mg^{2+}$	5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ l
ORFWSCB_SPE1_F (10 mM)	2,5 $\mu$ l
ORFWSCB_NOT1_R (10 mM)	2,5 $\mu$ l
DNA 2 <sup>ns</sup> PCR	2 $\mu$ l
Phusion DNA Polymerase (5units/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	12,8 $\mu$ l

Τα oligονουκλεοτίδια ORFWSCB\_SPE1\_F και ORFWSCB\_NOT1\_R που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.9, ενώ τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης φαίνεται στον Πίνακα 2.11.

Ένα αρχικό στάδιο 2 min στους 95 °C, ακολουθήθηκε από 35 κύκλους που περιλαμβάνουν 30 sec σε θερμοκρασία αποδιάταξης στους 95 °C, 30 sec σε θερμοκρασία 56 °C, κατά το οποίο τα εκκινητικά μόρια σχημάτισαν δεσμούς υδρογόνου στις κατάλληλες θέσεις των μορίων DNA και 3 min στους 72 °C, όπου σχηματιστήκαν οι νέες πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες. Ακολούθησε ένα τελικό βήμα στους 72 °C για 5 min. Από τα τελικά προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν 5 μl σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα PCR προϊόντα διαχωρίστηκαν από τους εκκινητές και τα ελεύθερα νουκλεοτίδια με τη χρήση του Nukleosprin Kit (MN, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα προϊόντα του καθαρισμού από τη γέλη κλωνοποιήθηκαν σε φορέα pGEM-T-easy vector τα προϊόντα της αντίδρασης μετασχημάτισαν σε δεκτικούς πρωτοπλάστες *Aspergillus nidulans* (§ 2.3).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1 Φυσιολογικές δοκιμασίες ανάπτυξης παρουσία αντιμυκητιακών φυτοφαρμάκων

Κατά την έναρξη της παρούσας μελέτης, που σκοπό έχει την εύρεση νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας που εμφανίζουν οι μύκητες ή που δυνητικά θα μπορούσαν να εμφανίσουν έναντι αντιμυκητιακών φυτοφαρμάκων, πραγματοποιήθηκαν *in vivo* δοκιμές ανάπτυξης παρουσία χημικών ουσιών με μυκητοκτόνο δράση. Οι ουσίες για τις οποίες ελέγχθηκε η βιωσιμότητα του αγρίου τύπου στελέχους *Aspergillus nidulans* αυξότροφου για p-aminobenzoic acid (*pabaA1*) ομαδοποιούνται σε τέσσερις ομάδες σύμφωνα με τη δραστηριότητα τους.

Πρώτη ομάδα είναι αυτή των αναστολέων της αναπνευστικής αλυσίδας (respiratory inhibitors) η οποία περιλαμβάνει τις χημικές ουσίες SDHI's (succinic dehydrogenase inhibitors) που αναστέλλουν τη δράση της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος και τις στρομπιλουρίνες που αναστέλλουν τη μιτοχονδριακή αναπνοή δεσμευόμενες στο κυτόχρωμα b. Στις SDHI's ανήκουν οι ουσίες boscalid, isopyrazam και flyopyram ενώ αντίστοιχα στις Στρομπιλουρίνες ανήκουν οι pyraclostrobin, azoxystrobin, trifloxystrobin, fluoxastrobin και kresoxim-methyl.

Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν οι phenylpyrroles, ουσίες των οποίων η δράση έχει ως στόχο την παρεμπόδιση της οσμωρύθμισης του κυττάρου, διεγείροντας την κινάση της ιστιδίνης στο MAPK, μονοπάτι που ανταποκρίνεται στην οσμωτική καταπόνηση. Η ουσία της ομάδας αυτής, η οποία δοκιμάστηκε για την ικανότητα της να αναστέλλει την ανάπτυξη του *A. nidulans*, είναι η fludioxonil.

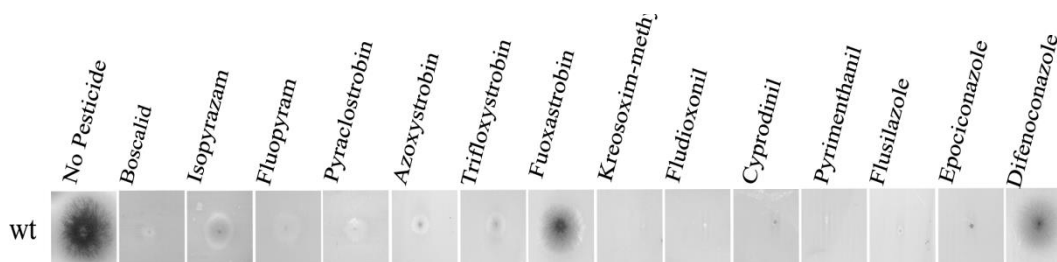
Στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι αναστολείς σύνθεσης μελανίνης και ονομάζονται anilinopyrimidines. Οι ουσίες που ανήκουν στην ομάδα αυτή έχουν τη ικανότητα να αναστέλλουν την αύξηση του νεαρού μυκηλίου επιδρώντας λίγο μετά την εκβλάστηση και συγκεκριμένα το σχηματισμό του άκρου (tip). Γενικά αναστέλλουν πλήθος βιοδιεργασιών όπως είναι η παραγωγή της μεθειονίνης με την αναστολή του ενζύμου cystathionine-β-lyase. Από την ομάδα των anilinopyrimidines χρησιμοποιήθηκαν οι cyprodinil και pyrimethanil.

Στην τέταρτη και τελευταία ομάδα ανήκουν οι αναστολείς σύνθεσης της εργοστερόλης, οι αζόλες. Από την ομάδα αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι flusilazole, epoxiconazole και difenoconazole. Το σύνολο των ουσιών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

**Πίνακας 3.1:** Οι αντιμυκητιακές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πρώτη φάση των βιοδοκιμών στο αγρίου τύπου στέλεχος *Aspergillus nidulans* αυξοτρόφο για p-aminobenzoic acid, όπως επίσης και τα μοριακά βάρη των ενώσεων αυτών και η αντιστοίχιση των 10 ppm σε  $\mu\text{M}$ .

		Active compound	M.W.	10ppm $\rightarrow$ $\mu\text{M}$	Solvent
Respiratory inhibitors	SDHI's	Boscalid	343.21	29.14 $\mu\text{M}$	Methanol
		Isopyrazam	359.41	27.82 $\mu\text{M}$	Methanol
	Strobilurin type	Fluopyram	396.71	25.21 $\mu\text{M}$	Methanol
		Pyraclostrobin	387.82	25.79 $\mu\text{M}$	Methanol
		Azoxystrobin	403.39	24.79 $\mu\text{M}$	Acetonitril
		Trifloxystrobin	408.37	24.49 $\mu\text{M}$	Methanol
		Fluoxastrobin	458.83	21.79 $\mu\text{M}$	Dichloromethane
		Kresoxim-methyl	313.35	31.91 $\mu\text{M}$	Toluene
Cellular wall degraders Melanin biosynthesis inhibitors Sterol (ergosterol) inhibitors	Phenylpyrroles	Fludioxonil	248.19	40.29 $\mu\text{M}$	Methanol
		Anilinopyrimidines	Cyprodinil	225.29	44.39 $\mu\text{M}$
	DMI's (Azoles)		Pyrimethanil	199.25	50.19 $\mu\text{M}$
		Flusilazole	315.39	31.71 $\mu\text{M}$	Dichloromethane
		Epoxiconazole	329.76	30.33 $\mu\text{M}$	Acetonitril
		Difenoconazole	406.26	24.61 $\mu\text{M}$	Ethanol

Οι *in vivo* δοκιμές ανάπτυξης πραγματοποιήθηκαν σε ελάχιστο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MMG (§2.1.16) με τη χρήση  $\text{NaNO}_3$  ως μοναδικής πηγή αζώτου, σε θερμοκρασία 37 °C, pH 6,8 και την προσθήκη αυξοτροφικών ανάλογα με τα προς έλεγχο στελέχη *A. nidulans*. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών φαίνονται στην Εικόνα 3.1.



**Εικόνα 3.1:** Τοξικότητα των αντιμυκητιακών φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πρώτη φάση των βιοδοκιμών. Οι βιοδοκιμές έγιναν σε θρεπτικό υπόστρωμα MMG με  $\text{NaNO}_3$  ως μοναδική πηγή αζώτου σε θερμοκρασία 37 °C και pH 6,8.

Από τα αποτελέσματα αυτά γίνεται φανερό ότι κάθε αντιμυκητιακή ουσία επιδρά σε διαφορετικό βαθμό στην αναστολή της αύξησης του αγρίου τύπου *Aspergillus nidulans* που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη σειρά πειραμάτων. Οι ουσίες fluoxastrobin και difenococonazole προκαλούν την ελάχιστη αναστολή στην αύξηση του *Aspergillus nidulans* σε σχέση με τις υπόλοιπες ουσίες που ελέγχθηκαν. Αντίθετα, όλα τα υπόλοιπα φάρμακα με αντιμυκητιακή προκάλεσαν αισθητή αναστολή στην αύξηση του υπό δοκιμή στελέχους αγρίου τύπου (wt).

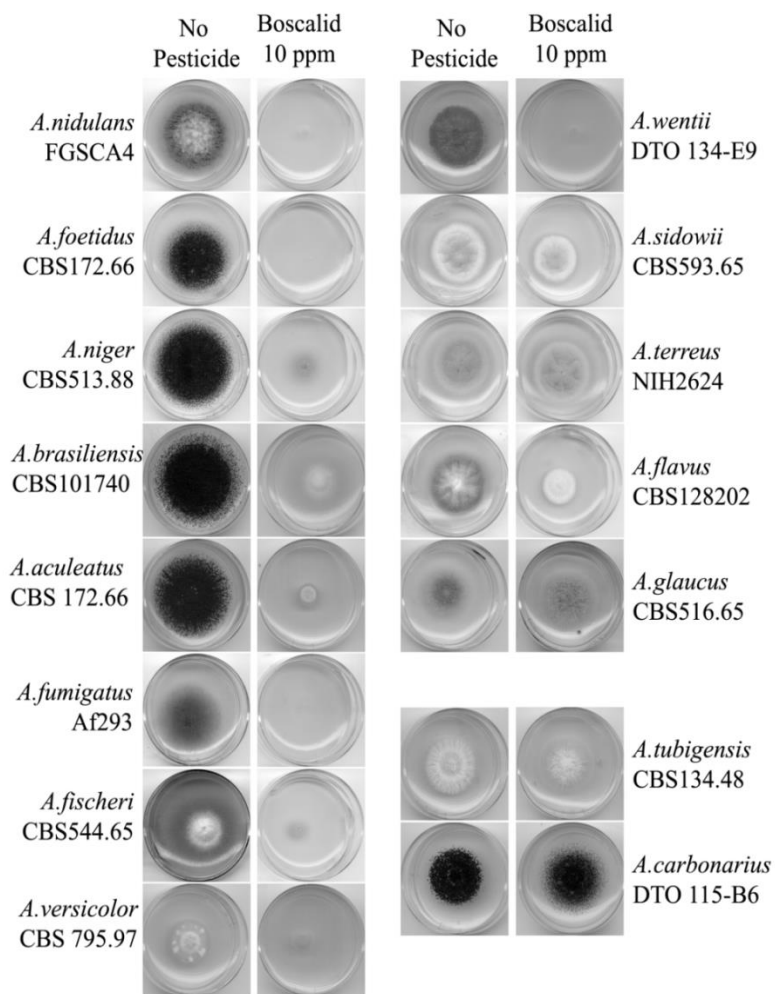
Οι ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των SDHI's φαίνεται να προκαλούν τη μέγιστη αναστολή στην αύξηση του μύκητα. Η ουσία που προκάλεσε τόσο τη μέγιστη αναστολή ανάμεσα στις ουσίες τις ίδιας ομάδας στην οποία ανήκει, όσο και μεταξύ των άλλων ουσιών από τις διαφορετικές χημικές ομάδες είναι το boscalid. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου δράσης των SDHI's και συγκεκριμένα εκείνης του boscalid. Η χημική αυτή ένωση ανήκει στα νέας γενιάς ευρέος φάσματος μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και την καταπολέμηση μιας σειράς φυτικών παθογόνων μυκήτων σε γεωργικές καλλιέργειες. Έχουν αναφερθεί κυρίως ανθεκτικά στελέχη μυκήτων στο boscalid τα οποία εμφανίζουν μεταλλαγές στην αλληλουχία της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης και μεταλλαγές που πιθανά να αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης του στόχου.

### 3.2 Ευαισθησία των διαφορετικών ειδών *Aspergillus* στο boscalid και φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης στόχου.

Με σκοπό την ανίχνευση της τοξικότητας του boscalid στα διάφορα είδη του γένους *Aspergillus* έγιναν βιοδοκιμές σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MMG. Όλα τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3. Τα είδη στα οποία έγινε ο έλεγχος, εμβολιάστηκαν προηγουμένως σε πλήρες στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (CM) στους 25 °C για 5 ημέρες εκτός από το *Aspergillus glaucus* το οποίο αυξήθηκε σε πλήρες στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με την προσθήκη 1 M NaCl. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι το boscalid είναι αρκετά τοξικό προς τα περισσότερα είδη του γένους *Aspergillus*, περιλαμβάνοντας τον



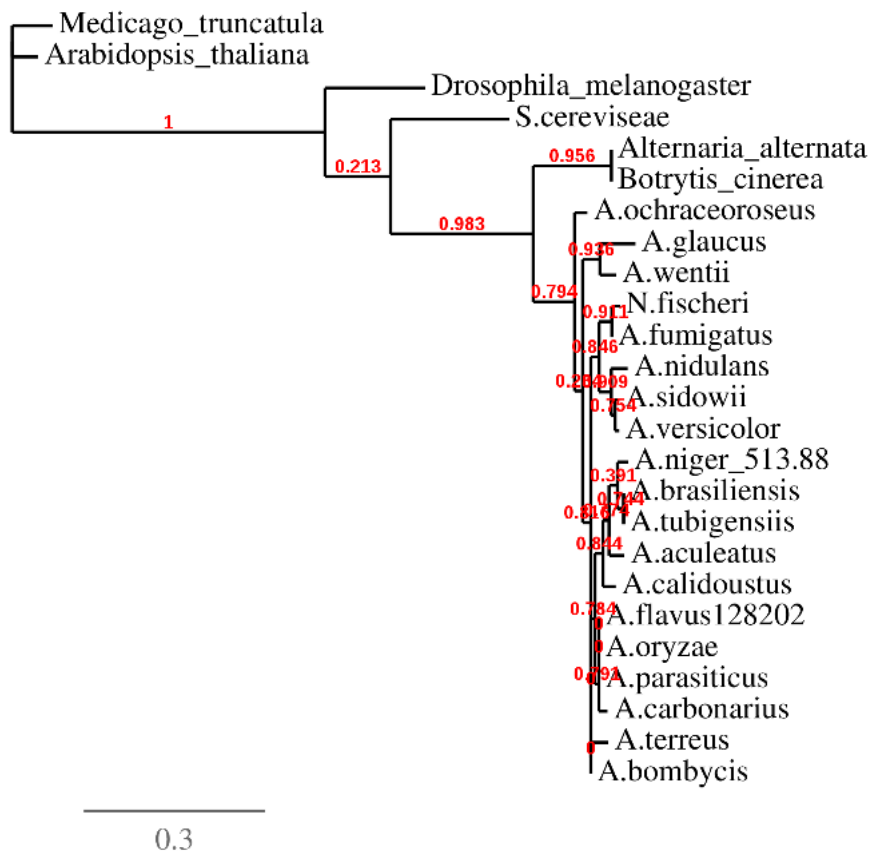
δυσνητικά παθολόγο μύκητα *Aspergillus fumigatus* και τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Aspergillus flavus*. Τέλος, είδη που εμφανίζονται ανθεκτικά στην επίδραση με boscalid είναι τα *A. tubigenis* και *A. carbonarius*.



**Εικόνα 3.2:** Η ανθεκτικότητα των διαφορετικών ειδών *Aspergillus* στο μυκητοκτόνο φυτοφάρμακο boscalid. Οι βιοδοκιμές ανάπτυξης έγιναν σε MMG με προσθήκη  $\text{NO}_3^+$  ως πηγή αζώτου στους  $25^\circ\text{C}$  και pH 6,8. Τα είδη που επέδειξαν τη μέγιστη ανθεκτικότητα ήταν τα *A. tubigenis* και *A. carbonarius*.

Παράλληλα, έγινε φυλογενετική ανάλυση των ειδών *Aspergillus* με σκοπό τη συσχέτιση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης στόχο και της διαφορετικής ανθεκτικότητας που

εμφάνιζαν τα αντίστοιχα στελέχη. Το φυλογενετικό δέντρο παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.3.



**Εικόνα 3.3:** Φυλογενετικό δέντρο των διαφορετικών ειδών *Aspergillus* και οργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν ως εξωμάδες, σύμφωνα με την αλληλουχία της πρωτεϊνικής υπομονάδας και στόχο του φαρμάκου, SdhB.

Για την εύρεση των πιθανών αλληλουχιών που κωδικοποιούν την SdhB, εφόσον δεν υπήρχαν πληροφορίες σχετικά με αυτή στα διάφορα είδη *Aspergillus*, ως αλληλουχία ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε αλληλουχία προερχόμενη από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Botrytis cinerea* στον οποίο το γονίδιο της *sdhB* έχει εντοπιστεί και χαρακτηριστεί. Παράλληλα, ωστόσο, έχουν απομονωθεί αρκετά στελέχη από τον αγρό όπου από αλληλούχηση της *sdhB* υπομονάδας έχουν βρεθεί αλλαγές που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα.

Σύμφωνα με την αλληλούχηση του γονιδιώματος των οργανισμών αυτών και τη στοίχιση των αλληλουχιών της υπό εξέταση πρωτεΐνης στα 15 είδη *Aspergillus*, η ανθεκτικότητα ή

η ευαισθησία των ειδών δε συσχετίζεται απόλυτα με την αλληλουχία της πρωτεΐνης, καθώς σε κανένα από τα είδη που μελετήθηκαν δεν υπήρχε αντικατάσταση κανενός από τα εν λόγω αμινοξέα των οποίων η αντικατάσταση οδηγεί συχνά σε ανθεκτικό φαινότυπο (Εικόνα 3.2.1).

	P225	H272
<i>B.cinerea</i>	ACCSTSCPSYWWN	SLYRCHTILNC
<i>A_glaucus</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_aculeatu</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A.nidulans</i>	fCCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_sydowii</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_versicol</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_wentii</i>	ACCSTSCPSYWWN	SmYRCHTILNC
<i>A_zonatus</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_clavatus</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_fumigatu</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>N_fischeri</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_terreus</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_oryzae</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_flavus</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_carbonar</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_brasilie</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_tubingen</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_kawachii</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC
<i>A_acidus</i>	ACCSTSCPSYWWN	SVYRCHTILNC

**Εικόνα 3.2.1:** Η πολλαπλή στοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών του γονιδίου *sdhB* των ειδών του γένους *Aspergillus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Τα μαύρα βέλη δείχνουν από αριστερά προς τα δεξιά την Προλίνη 225 και την Ιστιδίνη 272 (αρίθμηση κατά *B.cinerea*), αμινοξέα κλειδιά στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών έναντι στο boscalid και άλλους αναστολείς της ηλεκτρικής αφυδρογονάσης (SDHIs).

Ακόμη, είναι ξεκάθαρο ότι οι οργανισμοί εξωομάδες, δηλαδή αυτοί που δεν ανήκουν στο Βασίλειο των μυκήτων και ο *S. cerevisiae*, ομαδοποιούνται ξεχωριστά στο φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε εκτός του κλάδου των μυκήτων του γένους *Aspergillus*. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στο Παράρτημα Ι.

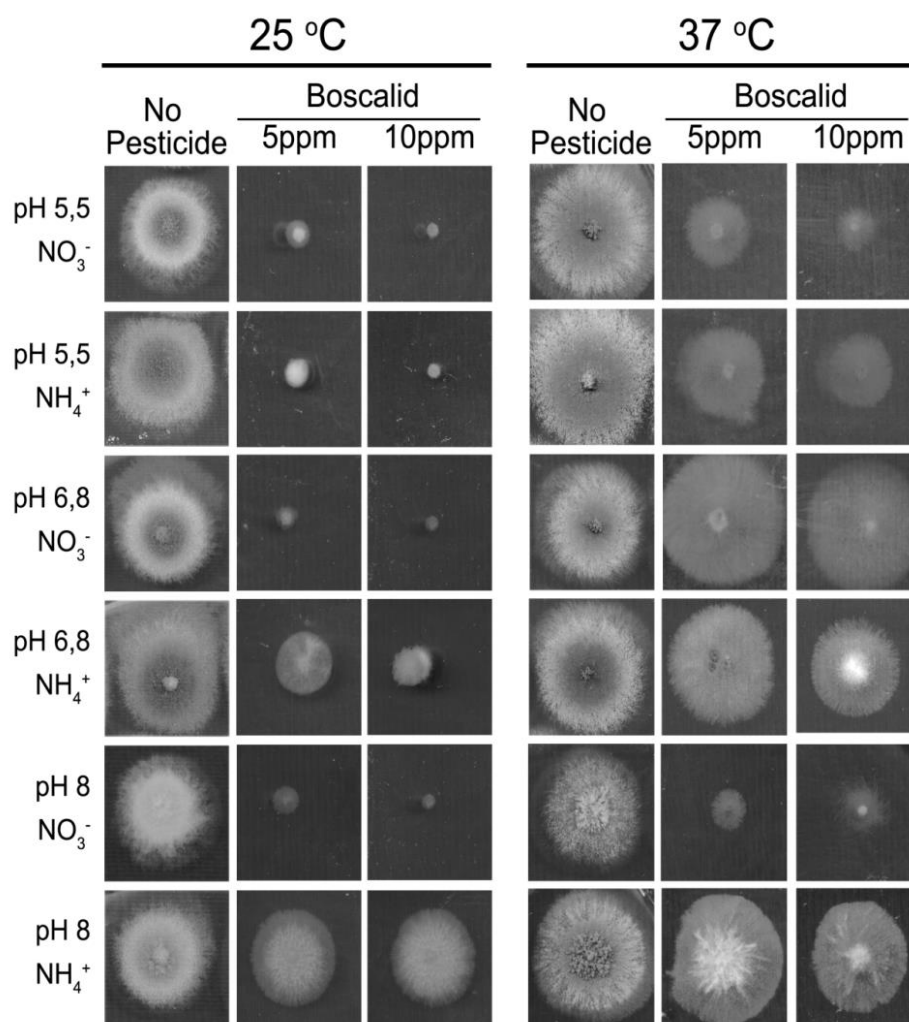
### 3.3 Η κυτταροτοξικότητα του boscavid εξαρτάται από τις φυσιολογικές συνθήκες που επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης των μεταφορέων

Η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν οι μύκητες πολλές φορές εξαρτάται από τις φυσιολογικές συνθήκες σύμφωνα με τις οποίες εξελίσσεται το πείραμα, ειδικότερα από τη δράση των μεταφορέων. Αυτό είναι σημαντικό καθώς η *de novo* έκφραση των μεταφορέων μπορεί να αλλάξει ως απόκριση στην πηγή άνθρακα και στην πηγή αζώτου που χρησιμοποιείται στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης. Ορισμένοι από τους μεταφορείς που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά δευτερογενών πηγών αζώτου ή γλυκόζης υπόκεινται σε αναστολή ή είναι ανενεργοί παρουσία αμμωνιακών ιόντων και γλουταμίνης ή γλυκόζης, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η λειτουργία των μεταφορέων εξαρτάται από τα επίπεδα του pH και από τη θερμοκρασία. Ο πρώτος παράγοντας επιδρά στη συμεταφορά πρωτονίων ( $H^+$ ), ενώ ο δεύτερος στη ρευστότητα των μεμβρανών και κατ' επέκταση στη σταθερότητα των μεταφορέων.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στην περίπτωση που μια ουσία με αντιμυκητιακές ιδιότητες μεταφέρεται με τη βοήθεια μεταφορέων, αυτό θα πρέπει να αντικατοπτρίζεται στα διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας που εξαρτώνται από τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των μεταφορέων. Αντίθετα, αν ένα αντιμυκητιακό φάρμακο μεταφέρεται μέσω απλής διάχυσης, η διαδικασία αυτή θα εξαρτάται μόνο από τη θερμοκρασία του πειράματος. Με στόχο να εξεταστεί η κυτταροτοξικότητα του boscavid έγιναν πλήθος δοκιμών τοξικότητας υπό διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτών των δοκιμών παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4. Οι δοκιμές αύξησης έγιναν σε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη και την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος για τη ρύθμιση του επιθυμητού pH.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4 προκύπτει ότι η δράση του boscavid εξαρτάται από την πηγή αζώτου, καθώς επίσης από το pH του θρεπτικού υποστρώματος και τη θερμοκρασία ανάπτυξης των στελεχών. Πιο συγκεκριμένα, το boscavid εμφανίζει υψηλή τοξικότητα και στις δύο θερμοκρασίες, σε όλα τα pH που δοκιμάστηκαν όταν μοναδική πηγή αζώτου τα νιτρικά ιόντα. Στους 37 °C η διαφορά

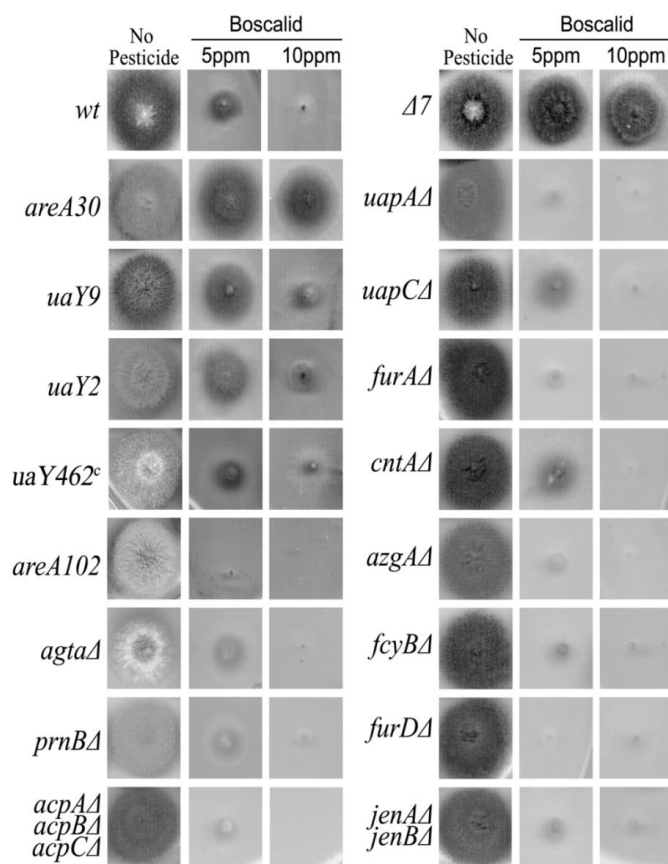
τοξικότητας του boscalid στις διαφορετικές πηγές αζώτου δεν είναι τόσο μεγάλη όσο είναι στη θερμοκρασία των 25 °C. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο pH 8 τόσο στους 37 °C όσο και στους 25 °C τη μέγιστη ευαισθησία εμφανίζει το στέλεχος αγρίου τύπου *Aspergillus nidulans*, όταν μοναδική πηγή αζώτου είναι τα νιτρικά ιόντα υπό μορφή  $\text{NaNO}_3$ . Υπάρχει, ωστόσο, μια ένδειξη ότι σε pH 6,8 το boscalid συσσωρεύεται περισσότερο στους 25 °C.



**Εικόνα 3.4:** Βιοδοκιμές αύξησης στο αγρίου τύπου στέλεχος *Aspergillus nidulans* παρουσία boscalid σε θρεπτικά υποστρώματα που εμπεριέχουν είτε νιτρικά είτε αμωνιακά ιόντα σαν μοναδική πηγή αζώτου, σε διαφορετικές τιμές pH και σε θερμοκρασίες 25 και 37. Υπογραμμίζεται ότι η μέγιστη διαφορά μεταξύ  $\text{NO}_3^-$  και  $\text{NH}_4^+$  ως μοναδικές πηγές αζώτου παρατηρήθηκε στο pH 8.

### 3.4 Στελέχη με επιλεγμένες μεταλλάξεις και απαλοιφές σε γονίδια του *Aspergillus nidulans* αποκαλύπτουν τον τρόπο δράσης του boscalid

Όλα τα μέχρι τώρα στοιχεία προτείνουν ότι οι μεταφορείς που σχετίζονται με μεταφορά αζώτου στο κύτταρο έχουν μεγάλη πιθανότητα να εμπλέκονται στη συσσώρευση του boscalid στο κύτταρο του μύκητα. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η βιωσιμότητα στελεχών στα οποία είχε γίνει απαλοιφή επιλεγμένων μεταφορέων παρουσία boscalid. Παράλληλα, ελέγχθηκαν και γενετικά τροποποιημένα στελέχη των οποίων οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την έκφραση μεταφορέων πηγών αζώτου σε απόκριση στην παρεχόμενη πηγή αζώτου.



**Εικόνα 3.5:** Η ευαισθησία στο boscalid εξαρτάται από τη μεταγραφική ρύθμιση και λειτουργία των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων. Βιοδοκιμές αύξησης στελεχών με μεταλλάξεις στα γονίδια των μεταγραφικών παραγόντων *areA* και *uaY* και των επιλεγμένων μεταφορέων έγιναν σε MMG με  $\text{NO}_3^+$  ως μοναδική πηγή αζώτου σε pH 8, 37°C. Τα στελέχη  $\Delta 7$  και *areA30* εμφανίζουν σημαντική ανθεκτικότητα στο boscalid σε σύγκριση με το αγρίου τύπου.



Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν στελέχη στα οποία δεν εκφράζονται μεταφορείς που σχετίζονται με τη μεταφορά νουκλεοτιδικών βάσεων, νουκλεοσιδίων και αλλαντοΐνης. Οι μεταφορείς αυτοί είναι οι UapA, UapC, AzgA, FcyB, FurD, CntA και FurA. Παράλληλα, δοκιμάστηκε και στέλεχος το οποίο είχε διαγραμμένους και τους επτά αυτούς μεταφορείς, το Δ7. Επιπλέον, για τη διερεύνηση πιθανής διαμεσολάβησης του μεταφορέα προλίνης PrnB ή του μεταφορέα ασπαρτικού AgtA χρησιμοποιήθηκε στέλεχος με διεγραμμένα τα γονίδια αυτά. Τέλος, έγιναν δοκιμές αύξησης σε στελέχη που είχαν πλήρη απαλοιφή των γονιδίων των μεταφορέων μονοκαρβοξυλικών πηγών άνθρακα. Αυτοί οι μεταφορείς είναι οι JenA, JenB, AcpA, AcpB and AcpC. Παράλληλα, ελέγχθηκαν και στελέχη με μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας ή μετατροπής λειτουργίας των μεταγραφικών παραγόντων ArgA και UaY, οι οποίοι ρυθμίζουν όλα τα αναγκαία γονίδια για την έκφραση όλων των μεταφορέων νουκλεοτιδικών βάσεων και νουκλεοσιδίων. Οι γονότυποι των στελεχών αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.3. Χρησιμοποιήθηκε ελάχιστο θρεπτικό υπόστρωμα για τις δοκιμές αύξησης με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη με τη χρήση του διαλύματος αλάτων φαρμάκων και την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος για τη ρύθμιση του pH 8. Τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτών αποτυπώνονται στην Εικόνα 3.5

Το στέλεχος Δ7, στο οποίο έχουν διαγραφεί και οι 7 μεταφορείς πουρινών, πυριμιδινών και αλλαντοΐνης, εμφανίζει ισχυρή ανθεκτικότητα και στις δύο συγκεντρώσεις φαρμάκων που δοκιμάστηκαν στα 5ppm και στα 10ppm. Ακόμη, το στέλεχος *areA30*, το οποίο φέρει σημειακή μεταλλαγή στο μεταγραφικό παράγοντα *areA* (Leu683Met) ο οποίος ρυθμίζει την πρόσληψη δευτερογενών πηγών αζώτου, επίσης φαίνεται να έχει υψηλή ανθεκτικότητα στο boscalid ακόμα και στην υψηλή συγκέντρωση. Από τα στελέχη στα οποία έχει διαγραφεί μόνο ένας από τους επτά μεταφορείς του στελέχους Δ7, παρατηρείται ήπια ανθεκτικότητα στη χαμηλή συγκέντρωση του boscalid 5ppm., μόνο σε αυτά με διαγραμμένα τα *uapC* και *cntA* γονίδια. Αντίθετα, στελέχη με απαλοιφή των μεταφορέων μονοκαρβοξυλικών πηγών αζώτου και αμινοξέων δεν έδειξαν ανθεκτικότητα.

### 3.5 Πέντε μεταφορείς νουκλεοβάσεων σχετίζονται με την τοξικότητα του boscalid.

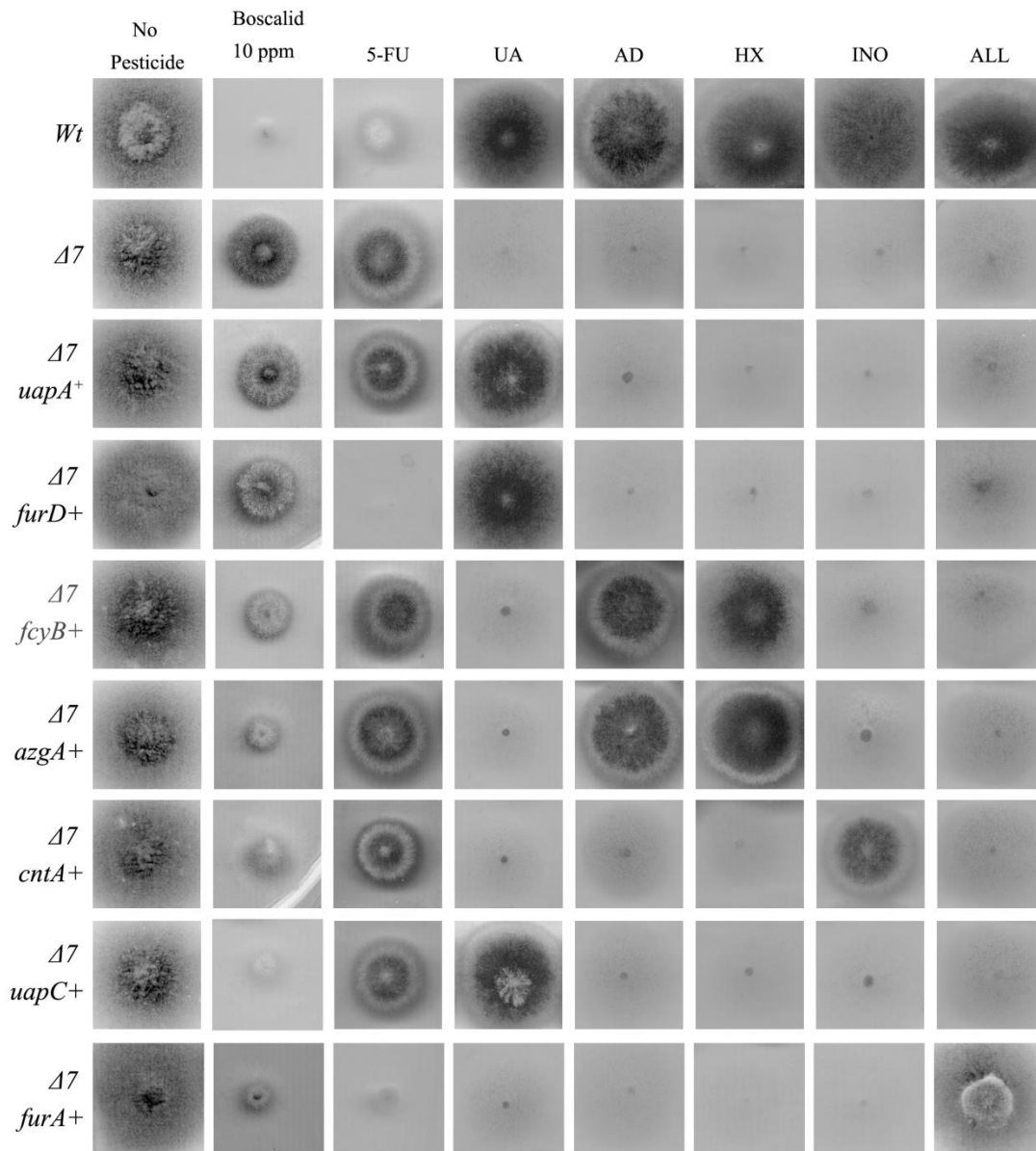
Με σκοπό την ταυτοποίηση των μεταφορέων εκείνων που σχετίζονται με τη συσσώρευση του boscalid και επίσης τον έλεγχο της πιθανότητας η ανθεκτικότητα στο boscalid να οφείλεται σε κάποια κρυφή μεταλλαγή, εισήχθησαν με μετασχηματισμό, κάθε ένα από τα γονίδια των 7 μεταφορέων πουρινών, πυριμιδινών και αλλαντοΐνης υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή, στο ίδιο ισογενετικό υπόβαθρο στελέχους Δ7. Τα αποτελέσματα του μετασχηματισμού για τη δημιουργία των στελεχών φαίνονται στη Εικόνα 3.6.

Το ουρικό οξύ (UA) αποτελεί υπόστρωμα για τους μεταφορείς UapA, UapC και FurD. Αντίστοιχα, η αδενίνη (AD) και η υποξανθίνη αποτελούν υποστρώματα για τους μεταφορείς FcyB και AzgA. Το νουκλεοσίδιο ινοσίνη (INO) αποτελεί υποστρώματα για τον μεταφορέα νουκλεοσιδίων CntA. Τέλος, η αλλαντοΐνη (ALL) αποτελεί υπόστρωμα για τον μεταφορέα αλλαντοΐνης FurA. Η πρόσληψη των υποστρωμάτων αυτών προσφέρει εναλλακτική πηγή αζώτου όταν απουσιάζουν από το θρεπτικό υπόστρωμα είτε τα νιτρικά ιόντα είτε τα αμμωνιακά ιόντα, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της Εικόνας 3.6. Αναλυτικότερα, μόνο τα στελέχη Δ7:: UapA<sup>+</sup>, Δ7:: UapC<sup>+</sup> και Δ7:: FurD<sup>+</sup> αυξάνονται σε ελάχιστο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (MMG) παρουσία ουρικού οξέος ως μοναδική πηγή αζώτου. Αντίστοιχα και τα στελέχη Δ7:: fcyB<sup>+</sup> και Δ7:: azgA<sup>+</sup> αυξάνονται σε ελάχιστο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (MMG) παρουσία αδενίνης ή υποξανθίνης ως μοναδική πηγή αζώτου. Τέλος, τα στελέχη Δ7:: cntA<sup>+</sup> και Δ7:: furA<sup>+</sup> αυξάνονται παρουσία ινοσίνης και αλλαντοΐνης αντίστοιχα σε ελάχιστο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (MMG) ως μοναδικές πηγή αζώτου ανα περίπτωση.

Στην Εικόνα 3.6 γίνεται ξεκάθαρο ποιοι από τους μεταφορείς εμπλέκονται στη συσσώρευση του boscalid στα κύτταρα του μύκητα. Πέντε από τους μεταφορείς εμπλέκονται στην τοξικότητα που εμφανίζει το boscalid. Είναι εμφανές ότι οι μεταφορείς FurA, AzgA και UapC όταν υπερεκφράζονται σε ισογενετικό υπόβαθρο Δ7, οδηγούν σε φαινότυπο απώλειας ανθεκτικότητας, ενώ ενδιάμεσους φαινοτύπους προκαλεί με φθίνουσα σειρά η υπερεκφραση των μεταφορέων CntA και FcyB. Άρα, σχηματικά

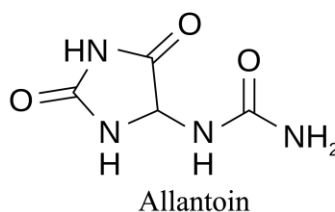
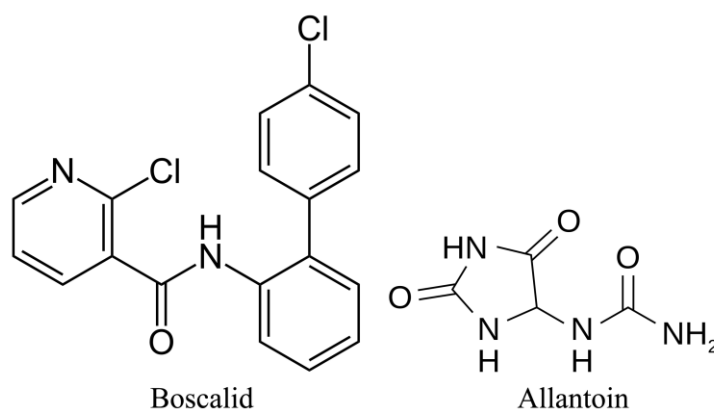


συνοψίζεται ότι η ικανότητα με την οποία εκτελείται η μεταφορά του boscalid είναι  $FurA, AzgA, UapC > CntA > FcyB$ . Αντίθετα, οι μεταφορείς *UapA* και *FurD* δεν εμπλέκονται στη διαδικασία συσσώρευσης του boscalid.



**Εικόνα 3.6:** Δοκιμές αύξησης στελεχών *Aspergillus nidulans* αγρίου τύπου (wt),  $\Delta 7$  και στελεχών με υπερεκφρασμένους του μεταφορείς *UapA*, *UapC*, *FurD*, *FcyB*, *AzgA*, *CntA* και *FurA* σε  $\Delta 7$  ισογενετικό υπόβαθρο σε ουρικό οξύ (UA), αδερίνη (AD), υποξανθίνη (HX), ινοσίνη (INO) και αλλαντοΐνη (ALL) ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η παρουσία 5 φθορο-ουρακίλη και boscalid στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MMG με  $NO_3^-$  ως μοναδική πηγή αζώτου στους  $37^\circ C$  και pH 8.

Είναι ενδιαφέρον ότι, οι τέσσερις από τους πέντε μεταφορείς του boscalid (AzgA, uapC, CntA, FcyB,) είναι αρκετά **μη** ειδικό ως προς το υπόστρωμα και είναι σε θέση να αναγνωρίζουν αρκετές πουρίνες, πυριμιδίνες ή όλα τα νουκλεοτίδια, ενώ ο πέμπτος, ο FurA, είναι ειδικός για αλλαντοΐνη, μια ένωση με δομική ομοιότητα στο boscalid όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8.2.



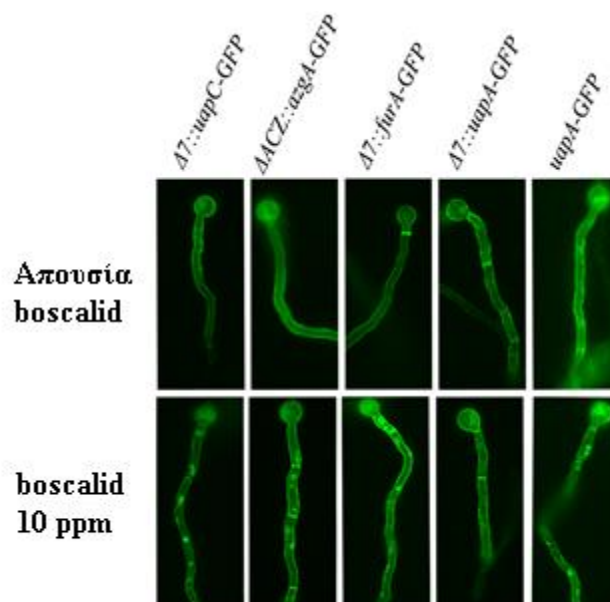
**Εικόνα 3.8.2:** Οι δομές των ουσιών Αλαντοΐνη και boscalid.

Αντιθέτως, οι δύο μεταφορείς που δε συμμετέχουν στην πρόσληψη του boscalid είναι εξαιρετικά ειδικό μεταφορείς υποστρωμάτων, ο UapA για ουρικό οξύ και ξανθίνη και ο FurD για ουρακίλη.

### 3.6 Ενδοκύττωση των μεταφορέων παρουσία boscalid

Το αρχικό σήμα για την ενδοκύττωση των μεταφορέων από το υπόστρωμά τους, είναι γενικότερα αποδεκτό, ότι προκαλείται όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος πλησιάσει τα όρια τοξικότητας. Η ρύθμιση της ποσότητας του μεταφορέα στη μεμβράνη, πιθανώς αποτελεί διαχειριστικό μηχανισμό για το κύτταρο, ώστε το φυσικό υπόστρωμα του μεταφορέα να μην φτάσει σε επίπεδα που να αποτελεί τοξική ουσία για το ίδιο το κύτταρο. Σε αυτή την περίπτωση τα επίπεδα συγκέντρωσης του υποστρώματος θα καθορίζουν και την ποσότητα του μεταφορέα στη μεμβράνη με ένα μηχανισμό που δεν είναι ακόμη γνωστός.

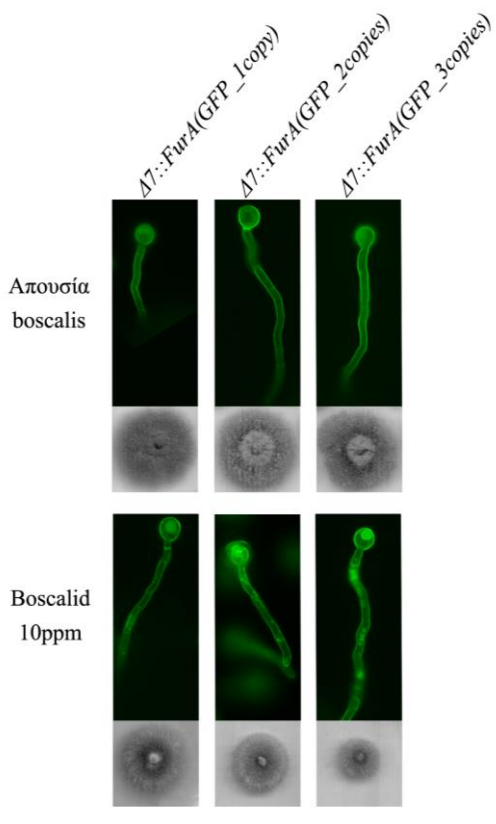
Μελετήθηκε η ενδοκύττωση των μεταφορέων UapA, UapC, AzgA και FurA που είναι και οι σημαντικότεροι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Παραγράφου 3.5 παρουσία boscaldid 10 ppm, με το οποίο έγινε επίδραση σε καλλιέργεια 15 ωρών για 2 ώρες, και τα δείγματα μελετήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού. Το θρεπτικό υπόστρωμα περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.19 σε pH 8 παρουσία νιτρικών και των απαραίτητων αυξοτροφιών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.7.



**Εικόνα 3.7:** Παρατηρούμενη ενδοκύττωση των μεταφορέων UapA, AzgA, UapC και FurA παρουσίας boscaldid. Τα δείγματα καλλιιεργήθηκαν στους 37 °C για 15 ώρες σε MicM (§2.1.19) pH 8, NO<sub>3</sub><sup>+</sup>. Έγινε επίδραση με boscaldid 10 ppm για 2 ώρες και παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού.

Είναι φανερό ότι σε στελέχη με γενετικό υπόβαθρο Δ7 ή ΔACZ (*ΔuapA*, *ΔUapC* και *ΔAzgA*), στα οποία κάθε φορά εκφράζεται σημασμένος με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη ο επιθυμητός μεταφορέας, γίνεται συσσώρευση του boscaldid στο κύτταρο και ο μεταφορέας ενδοκυττώνεται παρουσία του υποστρώματός του. Οι μεταφορείς που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.7 (σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Παραγράφου 3.5) είναι οι βασικοί στη συσσώρευση του boscaldid και είναι οι UapC, AzgA και FurA, ενώ ο

UapA δεν σχετίζεται με την πρόσληψη του φαρμάκου. Έτσι στα στελέχη  $\Delta 7::uapC^+$ ,  $\Delta ACZ::azgA^+$  και  $\Delta 7::furA^+$  παρουσία boscavid 10 ppm εμφανώς οι σημασμένοι μεταφορείς ενδοκυττώνονται. Αντίθετα, στο στέλεχος  $\Delta 7::uapA^+$  δεν παρατηρείται ενδοκύττωση παρουσία boscavid. Παρόλα αυτά, σε στέλεχος χωρίς  $\Delta 7$  ( $uapA-GFP$ ) γενετικό υπόβαθρο με σημασμένο τον μη σχετιζόμενο με boscavid μεταφορέα UapA παρατηρείται μέτρια ενδοκύττωση του μεταφορέα.

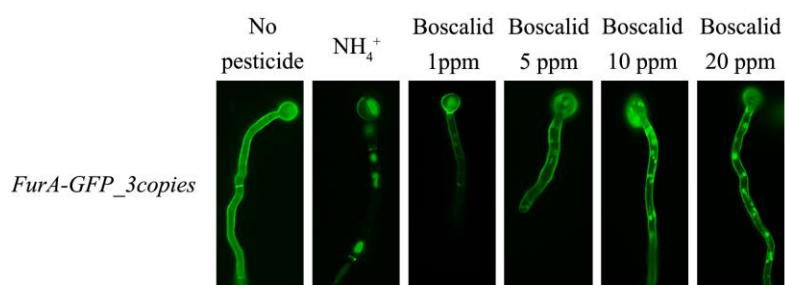


**Εικόνα 3.8:** Ενδοκύττωση του μεταφορέα FurA παρουσία boscavid, και συσχέτιση της ενδοκύττωσης με τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου. Τα δείγματα καλλιεργήθηκαν στους 37 °C για 15 ώρες σε MicM (§2.1.19) pH 8,  $NO_3^-$ . Έγινε επίδραση με boscavid 10 ppm για 2 ώρες και παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού.

Παράλληλα, φαίνεται ότι η υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση του φαρμάκου λόγω λειτουργίας όλων των σχετιζόμενων με boscavid μεταφορέων, προκαλεί αυξημένη κυτταρική καταπόνηση.

Επιπλέον, έγινε προσπάθεια να συσχετιστούν ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου *furA* με την ένταση του φαινομένου της ενδοκύττωσης, ενός από τους μεταφορείς που σχετίζεται με τη συσσώρευση του boscalid στα κύτταρα του *A. nidulans*. Παρατηρήθηκε ότι η διάμετρος της αποικίας στο στέλεχος, όπου υπάρχει ένα αντίγραφο του γονιδίου *furA*, ήταν 11 mm και στα στελέχη με 2 και 3 αντίγραφα των γονιδίων η διάμετρος ήταν 15 mm και 20 mm αντίστοιχα. Γίνεται αντιληπτό ότι η αύξηση της ποσότητας ενός μεταφορέα, ο οποίος σχετίζεται με τη συσσώρευση του boscalid, αυξάνει το φαινότυπο της τοξικότητας του φαρμάκου στο κύτταρο με αποτέλεσμα τη μειωμένη διάμετρο της αποικίας σε σχέση με τον αριθμό των αντιγράφων του μεταφορέα FurA, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8. Παράλληλα, διεξήχθη μικροσκοπική παρατήρηση των στελεχών σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού, όπου φαίνεται ότι η αύξηση των αντιγράφων του μεταφορέα σε ίδια συγκέντρωση boscalid 10 ppm προκαλεί και εντονότερο φαινόμενο ενδοκύττωσης.

Τέλος, με σκοπό τη μελέτη του φαινομένου της ενδοκύττωσης στο στέλεχος  $\Delta 7::furA^+$  με τρία αντίγραφα του γονιδίου σε κλιμακωτά αυξανόμενη συγκέντρωση boscalid, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.9.



**Εικόνα 3.9:** Παρατήρηση του στελέχους  $\Delta 7:: FurA$  με 3 αντίγραφα σε θρεπτικό υπόστρωμα MicM παρουσία νιτρικών ως τη μοναδική πηγή αζώτου και γλυκόζη ως μοναδική πηγή άνθρακα σε pH 8. Στο στέλεχος αυτό έγινε κλιμακούμενη αύξηση της ποσότητας boscalid με την οποία έγινε επίδραση ύστερα από 15 ώρες αύξηση στους 37 °C. Η επίδραση με boscalid έγινε για 2 ώρες μετά το πέρας των 15 ωρών όπως και η επίδραση με την αμμωνία.

Η αύξηση του στελέχους αυτού χωρίς την επίδραση με boscalid είναι απολύτως φυσιολογική. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.9, παρατηρούνται μεγάλα πρώιμα ενδοσώματα για την ανακύκλωση και την καταστροφή του μεταφορέα FurA. Παράλληλα, κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του αντιμυκητιακού boscalid φαίνεται να εντείνεται το φαινόμενο της ενδοκύττωσης. Η διαφορά από το 1 ppm συγκέντρωσης boscalid στα 20 ppm είναι διακριτή, όπως και η βαθμιαία αύξηση σε όλες τις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις. Τα πρώιμα ενδοσώματα, τα οποία οδηγούν τον μεταφορέα για ανακύκλωση και καταστροφή, στη συνέχεια στα χυμοτόπια είναι εμφανή σε όλες τις συγκεντρώσεις του φυτοφαρμάκου.

### **3.7 Βελτιστοποίηση της ανίχνευσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου Minos και χρήση αυτού για τη μελέτη νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας ουσιών με αντιμυκητιακή δράση.**

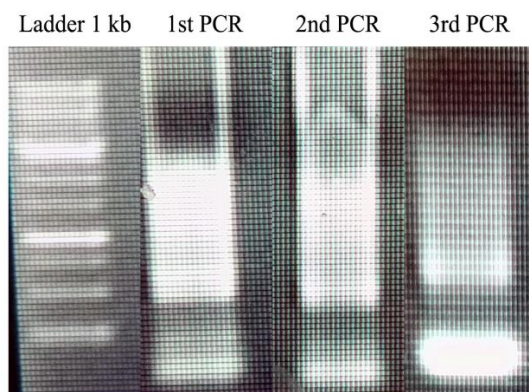
Τα μεταθετά στοιχεία χρησιμοποιούνται για μεταλλαξηγέννεση και την κατασκευή στελεχών με επιθυμητές ιδιότητες με τη χρήση κατάλληλης χημικής ουσίας επιλογής, ως περιοριστικό παράγοντα στο τρυβλίο. Ο τρόπος αυτός μεταλλαξηγέννεσης έχει περισσότερα πλεονεκτήματα σε σχέση με την κλασική UV μεταλλαξηγέννεση. Αφενός μπορεί να οδηγήσει σε φαινότυπο από απώλεια λειτουργίας γονιδίου (loss of function mutation), αφετέρου η ένθεση του μεταθετού στοιχείου στον υποκινητή ενός γονιδίου μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση φαινοτύπου από υπερέκφραση το εν λόγω γονίδιο.

Στην κλασική UV μεταλλαξηγέννεση το τελευταίο δεν είναι δυνατό να συμβεί. Για την ειδοποιό αυτή διαφορά επιλέχθηκε στέλεχος που εμπεριείχε το μεταθετό στοιχείο Minos (Evangelinos *et al.* 2015). Ο τρόπος της επιλογής των επιθυμητών στελεχών και η εύρεση της θέσης ένθεσης παρουσιάζονται αναλυτικά στην Παράγραφο 2.6.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας ανίχνευσης της θέσης ένθεσης. Χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Sau3A, το οποίο έχει επιπλέον πλεονέκτημα με βάση τη θέση που αναγνωρίζει για να πέσει το DNA, εφόσον χρειάζεται μόνο τέσσερα νουκλεοτίδια για να αναγνωρίσει θέση κοπής, τα 5'-GATC-3'. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πιθανότητα ύπαρξης περισσότερων θέσεων κοπής κατά το μήκος του γενωμικού DNA και την ευκολότερη και

ταχύτερη απολίπωση, σε αντίθεση με την κοπή του γενωμικού DNA με ένα ενζύμο το οποίο θα απαιτούσε πέντε ή έξι νουκλεοτίδια για την αναγνώριση της θέσης κοπής.

Η ανίχνευση της θέσης ένθεσης έγινε ακολουθώντας μια διαφορετική διαδικασία που περιελάμβανε και στην παρούσα εργασία μια ακολουθία αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης. Αντί να γίνει μια ακολουθία 2 αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης (PCR), έγινε μια ακολουθία 3 αντιδράσεων, όπου τα προϊόντα της προηγούμενης αποτελούν το DNA μήτρα για την επόμενη αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Ακόμη αξίζει να αναφερθεί ότι αντί για το ίδιο ζεύγος εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά και είναι οι primer 18 & primer 19 (Evangelinos *et al.* 2015), στη μέθοδο που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητικών μορίων με το δεύτερο ζεύγος εσωτερικού του πρώτου, γεγονός που ενισχύει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Το πρώτο ζεύγος είναι τα εκκινητικά μόρια Minos\_External\_New και Minos\_End\_F, ενώ το δεύτερο είναι τα εκκινητικά μόρια Minos\_PCR1\_F (23) και Minos\_PCR1\_F (24) (§2.6). Στην Εικόνα 3.10 παρουσιάζονται τα προϊόντα των αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης και πως αυτά φαίνονται ύστερα από την ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 1%.



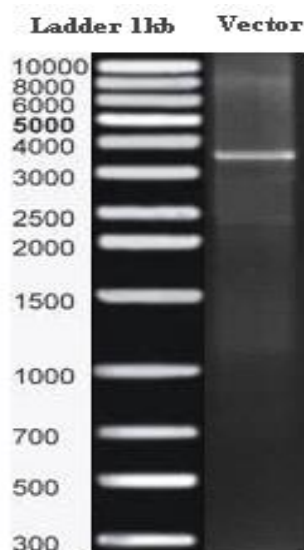
**Εικόνα 3.10:** Τα προϊόντα των τριών αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης και κατά την ακολουθία κλωνοποίησης της περιοχής ένθεσης για την αλληλούχηση αυτής

Γίνεται, φανερό ότι κατά την πορεία που ακολουθήθηκε από στάδιο σε στάδιο ελαχιστοποιούνται τα μη ειδικά προϊόντα και η εικόνα είναι προοδευτικά πιο καθαρή. Επιπρόσθετα, αντί της χρήση της ίδιας πολυμεράσης Kara Taq σε όλες τις αντιδράσεις



αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε στην προηγούμενη μέθοδο, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιούνται δύο είδη πολυμερασών. Στην πρώτη και τη δεύτερη αντίδραση χρησιμοποιείται η Kara Taq, ενώ στην τρίτη αντίδραση της οποίας το προϊόν προορίζεται για κλωνοποίηση χρησιμοποιείται Phusion πολυμεράσης. Η τελευταία, σε αντίθεση με την πρώτη, δεν επιτρέπει τη δημιουργία άκρων ΑΤ στα άκρα των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η κλωνοποίηση του προϊόντος σε φορείς με μη κολλώδη άκρα (blunt vector) .

Τέλος, μετά το μετασχηματισμό *E.coli* με φορέα κλωνοποίησης που εμπεριέχει το προϊόν της τρίτης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, ο φορέας απομονώνεται και αποστέλλεται για αλληλούχηση ως καθαρό προϊόν χωρίς μη ειδικά παραπροϊόντα (Εικόνα 3.11) .Το αποτέλεσμα αυτό επιτυγχάνεται με την επιλογή της κατάλληλης αποικίας ύστερα από PCR,όπως αυτό περιγράφεται στην παράγραφο 2.6.



**Εικόνα 3.11:** Ηλεκτροφόρηση του φορέα κλωνοποίησης με μη κολλώδη άκρα, που αποστέλλεται για αλληλούχηση.

### 3.8 Εύρεση γονιδίων που πιθανότατα συμβάλλουν στην ανθεκτικότητα σε αντιμυκητιακές ενώσεις.

Με τη χρήση του μεταθετού στοιχείου Minos, όπως κατασκευάστηκε για το είδος *Aspergillus nidulans* (Evangelinos *et al.* 2015), στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια



να βρεθούν νέοι μηχανισμού ανθεκτικότητας έναντι ορισμένων αντιμυκητιακών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται τόσο στον τομέα της υγείας, όσο και της φυτοπροστασίας. Η πρώτη αντιμυκητιακή ένωση που ελέγχθηκε για τον σκοπό αυτό ήταν η ιτρακοναζόλη. Μέχρι στιγμής δύο είναι οι τρόποι που τα παθογόνα γνωρίζουμε ότι αποκτούν ανθεκτικότητα στις τριαζόλες, όπως είναι η ιτρακοναζόλη. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με τροποποίηση του στόχου του φαρμάκου, που στην προκειμένη περίπτωση είναι η 14α διμεθυλάση της στερόλης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cyp51A*, είτε με την αύξηση των επιπέδων μεταγραφής ABC μεταφορέων εκροής, οι οποίοι απομακρύνουν την τοξική για το κύτταρο ουσία στο περιβάλλον με σκοπό τη διάσωσή του, όπως εκτενώς αναλύθηκε στο κεφάλαιο 1 της Εισαγωγής.

### 3.8.1 Στελέχη με ανθεκτικότητα στην Ιτρακοναζόλη

Με τη βελτιστοποιημένη μέθοδο που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.6, βρέθηκαν δύο νέα στελέχη τα οποία παρουσιάζουν ελαφρά ανθεκτικότητα στην ιτρακοναζόλη σε συγκέντρωση 8 µg/ml. Οι αλληλουχίες που βρέθηκαν είναι οι εξής:

Στέλεχος *itz\_2811\_10*

GTAGACGCGTTAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGG  
 ATCCACTAGTAACGGCCCGCCAGTGTGCTGGAATTCAGGGTTTTGCTCTATTTTC  
 CAACAACAACAAAAATATGAGTAATTTATTCAAACGGTTTGCTTAAGAGATAAGAA  
 AAAAGTGACCACTATTAATTCGAACGCGGCGTAA TGTGATTTACTATCATACTTA  
 AAACAATAATTTAATTAATATTAGAATTTGTGTAACGTCCCGCGGTGGCGGCC  
 GCTCTAGAACTAGTGGATCGCCAGACTCAGTGGGACTTAGGTGCGAACCAAA  
 GGACCGCAGTGTTAGACTCGAAAGATACCGGCAGCGTGGCATTGTTCGCGAAT  
 ACAGGATGGGAATGAGATTAGCCGTCAATCGTACCAAACCGGCCGATAAAG  
 ATTTGACGGGGAAGAGTATATTGGCTCTTGGCTTGACGCTAGAACTATACCA  
 GAATCATAAGATTACGAGCCCCAACCCTATTAATTCGAACAGCATGTTTTTTT  
 TTGCAGTGCGCAATGTTTAAACACACTATATTATCAATACTACTAAAGATAACA  
 CATACCAATGCATTTTCGTCTCAAAGAG CCTGAATTCTGCAGATATCCATCACA  
 CTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAG  
 TCGTATTACAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCC  
 TGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGC  
 GTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT  
 ATACGTACGGCAGTTTAAGGTTTACACCTATAAAAAGAGAGAGCCGTTATCGT  
 CTGTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCGGGGCGACGGATGG  
 TGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTCAGATAAAGTCTCCCGTGAACCTT  
 TACCCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCCCT

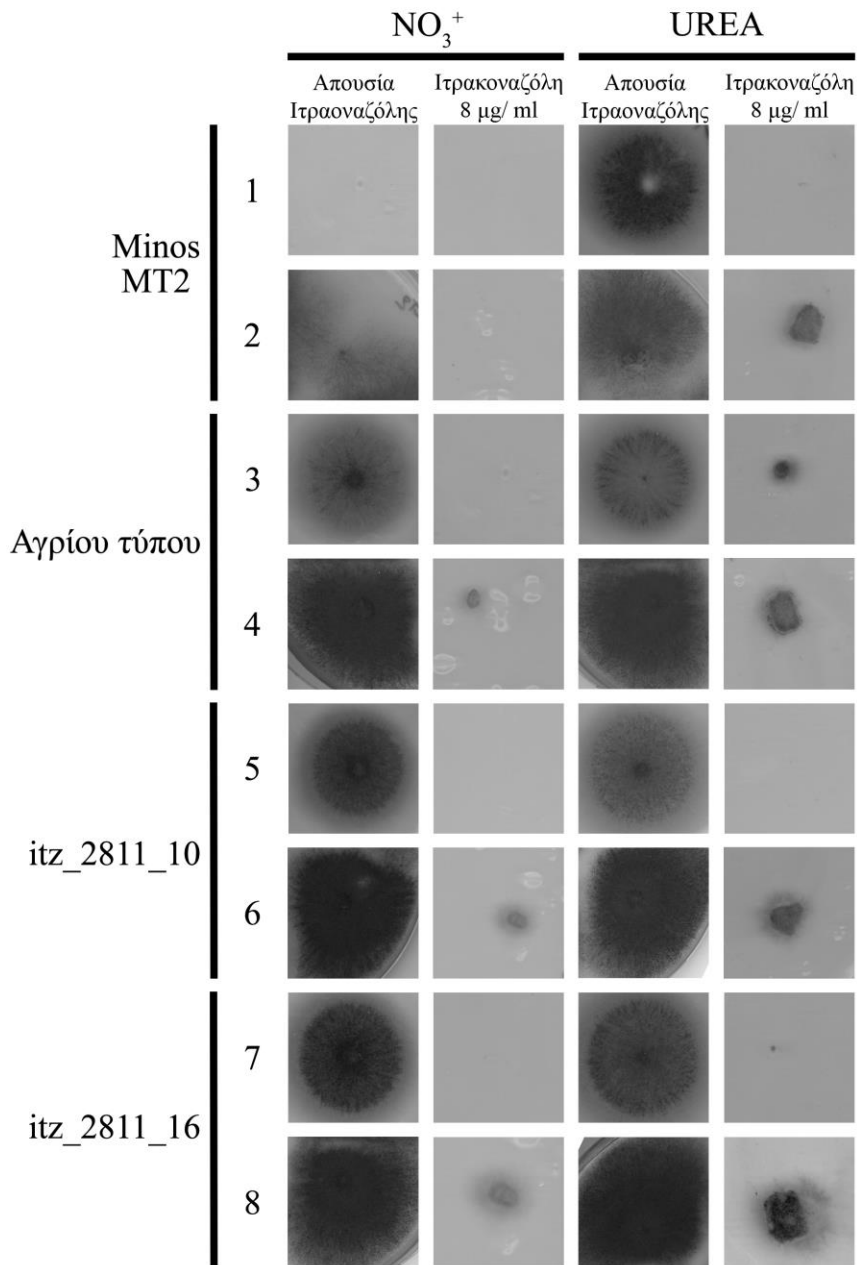
Στέλεχος *itz\_2811\_16*

CCAGAAATCAGGTTAATGGGTTTTGAAGTCATTTTCGCGGTGGCTGGATCAGC  
 CACTTCTTCCCCGAAACGGAGACCGGCACTGGCCAATCGGTGGTCATCATGC  
 GCCAGCTTTCATCCCCGATTGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTAT  
 CTGACAGCAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCATCCGTCGCCCCGGCGT  
 GTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATAACGGCTCTCTCTTT  
 TATAGGTGTA AACCTTAAACTGCCGTACGTATAGGCTGCGCAACTGTTGGGA  
 AGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGA  
 TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCCGACG  
 TTGTA AACCGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTG  
 GGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGA  
 ATTCAGG GTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAATATGAGTAATTTATTC  
 AAACGTTTGCTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACCACTATTAATTCGAACGCG  
 GCGTAATGTGATTTACTATCATACTTAAACAATAATTTAATT AATATTAGAA  
 TTGTGTA ACTCCCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCTGACCATCC  
 AGGAGTTGTTGTTCTCGATGAGCTCATCGTCACCCAGGTACCAGGGACGGT  
 AGAGTCGTCGACGAGGCCGACGGCGTTCGATCTGCGGGGCCCCGAT ACGAGCCC  
 CAACCACTATTAATTCGAACAGCATGTTTTTTTTGCAGTGCGCAATGTTAAC  
 AACTATATTATCAATACTACTAAAGATAACACATACCAATGCATTTTCGTCTC  
 AAAGAG CCTGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTC  
 GGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTAACGCGCCTA

Με το κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες του φορέα στον οποίο κλωνοποιήθηκε τμήμα του γονιδιώματος από την θέση στην οποία είχε εντεθεί το μεταθετό στοιχείο. Με το γαλάζιο παρουσιάζονται τα τμήματα των αλληλουχιών (IRs) του μεταθετού στοιχείου ενώ υπογραμμισμένα είναι τα τμήματα του γενωμικού DNA, που μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Sau3A* παρέμειναν ενωμένα με τα IRs και ενισχύθηκαν μέσω της μεθόδου εύρεσης της ένθεσης. Στον Πίνακα 3.8.1 παρουσιάζεται αναλυτικά η θέση ένθεσης του μεταθετού στοιχείου για κάθε στέλεχος. Στην Εικόνα 3.12 φαίνονται οι δοκιμασίες αύξησης για τα στελέχη που απομονώθηκαν με τη χρήση του μεταθετού στοιχείου και διαθέτουν ήπια ανθεκτικότητα στην ιτρακοναζόλη.

**Πίνακα 3.8.1** : Θέση ένθεσης του μεταθετού στοιχείου σε στελέχη με ήπια ανθεκτικότητα στην ιτρακοναζόλη.

Στέλεχος	Χρωμόσωμα	Αύξων αριθμός νουκλεοτιδίων που απομονώθηκαν	Θέση ένθεσης
<i>itz_2811_10</i>	VIII	2.387.855-2.388.073	-405 bp του γονιδίου AN0818
<i>itz_2811_16</i>	VI	1.453.506-1.453.604	+442bp εντός του δεύτερου εσωνίου του γονιδίου AN9524

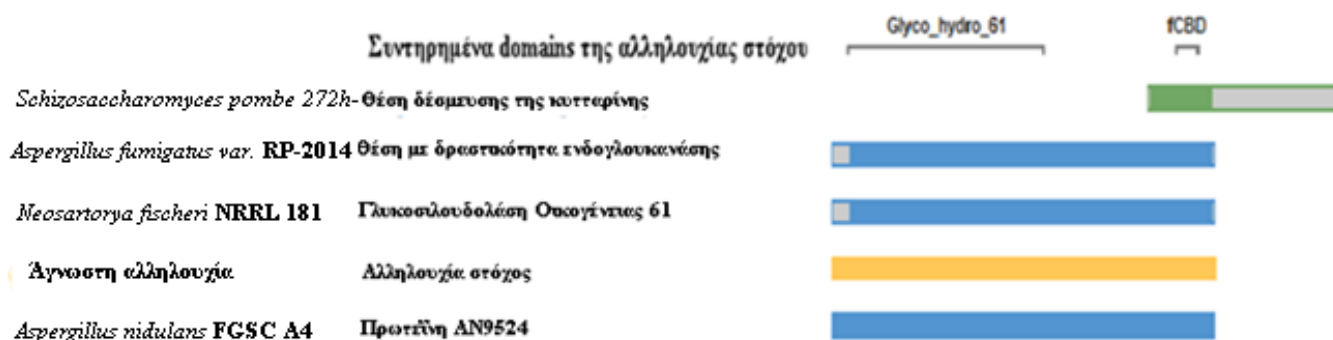


**Εικόνα 3.12:** Οι δοκιμές αύξησης των στελεχών με ήπια ανθεκτικότητα στην ιτρακοναζόλη. Στις σειρές 1,3,5,7 ο εμβολιασμός έγινε με τη χρήση οδοντογλυφίδας ενώ στις σειρές 2,4,6,8 ο εμβολιασμός έγινε με τη χρήση τμήματος μυκηλίου. Το στέλεχος itz\_2811\_16 φαίνεται να διατηρεί την ανθεκτικότητά του στην έναντι της ιτρακοναζόλης κατά την περίπτωση του εμβολιασμού με τη χρήση τμήματος μυκηλίου σε θρεπτικό υπόστρωμα MMG. Όλες οι δοκιμές έγιναν στους 37 °C, pH 6,8 και η πηγή αζώτου κάθε φορά φαίνεται στην εικόνα.

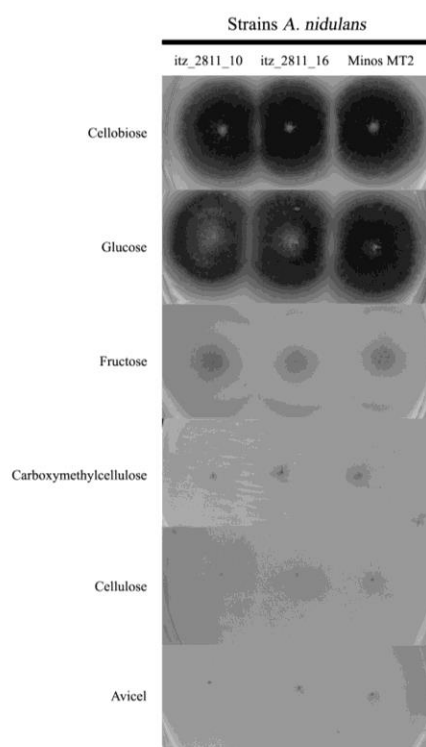
Το στέλεχος *itz\_2811\_16* φάνηκε να διατηρεί την ανθεκτικότητα του στην ιτρακοναζόλη κατά την περίπτωση του εμβολιασμού με τη χρήση τμημάτων μυκηλίου σε θρεπτικό υπόστρωμα MMG. Από την ανάλυση της αλληλούχησης και την εύρεση της θέσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου για το στέλεχος *itz\_2811\_16* η ένθεση έγινε, όπως αναφέρεται και στον Πίνακα 3.8.1 +442bp, από το νουκλεοτίδιο έναρξης της μεταγραφής εντός του δεύτερου εσωνίου του γονιδίου *AN9524*, και πιθανά ο ήπιος φαινότυπος να οφείλεται στη θέση της ένθεσης αυτής.

Το γονίδιο αυτό πιθανότατα κωδικοποιεί, χωρίς αυτό να έχει αποδειχθεί πειραματικά ώστε να έχει τελικά χαρακτηριστεί η πρωτεΐνη μια β-1,4-ενδογλοκανάση, ένζυμο που διασπά τους β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς της κυτταρίνης. Από τη χρήση του προγράμματος Blast NCBI και την εύρεση πρωτεϊνών με παρόμοια αλληλουχία και πιθανότατα όμοια λειτουργία φάνηκε ότι η πρωτεΐνη διαθέτει αρκετά συντηρημένες πρωτεϊνικές δομές. Είναι μια καθαρά μυκητιακή πρωτεΐνη και διαθέτει μυκητιακή δομή για τη δέσμευση της κυτταρίνης (fungal Cellulose Binding Domain) σύμφωνα με χαρακτηρισμένο γονίδιο του *Schizosaccharomyces pombe*. Η πιθανή ενεργότητα του ενζύμου είναι ενδογλοκανάσης/ κυτταρινάσης σύμφωνα με πρόσφατες μεταγονιδιωματικές αναλύσεις (Coutinho *et al.* 2009) και με χαρακτηρισμένο γονίδιο με αντίστοιχο domain στον *Aspergillus fumigatus*. Τέλος, ανήκει στην οικογένεια 61 γλυκοσυλ-υδρολασών σύμφωνα με χαρακτηρισμένο γονίδιο με αντίστοιχο domain στον *Aspergillus fischeri*. Στην Εικόνα 3.13 επισημαίνονται οι ομοιάζουσες περιοχές της υπό μελέτη πρωτεΐνης με άλλες χαρακτηρισμένες αλληλουχίες πρωτεϊνών κατατεθειμένες στη Βάση Δεδομένων UniProt. Από τα βιοπληροφορικά προγράμματα που εφαρμόστηκαν προτείνεται ισχυρά ότι είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη.

Αποτελείται από 402 αμινοξέα και διαθέτει ένα εξώνιο εντός του γονιδίου. Προβλέπεται ότι αποτελείται από δύο μέχρι τρεις διαμεμβρανικές περιοχές με το αμινοτελικό άκρο εντός της κυτταρικής μεμβράνης και το καρβοξυτελικό εκτός αυτής, όπου στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται το fCBD κι έτσι εξυπηρετείται η δέσμευση της κυτταρίνης από τον μύκητα.



**Εικόνα 3.13:** Η ανάλυση των ομόλογων χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών που διέθεταν τα χαρακτηριστικά που αποδίδονται στην πρωτεΐνη AN9524, με πιθανό ρόλο ενδογλουκανάσης.



**Εικόνα 3.14:** Δοκιμές αύξησης παρουσία σελλοβιόζης (Cellulobiose), γλυκόζης (glucose), φρουκτόζης (fructose), άμορφης κυτταρίνης (Carboxymethylcellulose), κυτταρίνης (cellulose) και κρυσταλλικής μορφής κυτταρίνη (Avicel). Όλες οι δοκιμές έγιναν σε Minimal Media με μοναδική πηγή αζώτου τα αμμωνιακά ιόντα στους 37 °C σε pH 6,8.

Στην προσπάθεια εύρεσης φυσιολογικής λειτουργίας στην πρωτεΐνη αυτή έγιναν δοκιμές αύξησης σε διάφορες πηγές άνθρακα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.14. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν παρουσία σελλοβιόζης (Cellulobiose), γλυκόζης (glucose),

φρουκτόζης (fructose), άμορφης κυτταρίνης (Carboxymethylcellulose), κυτταρίνης (cellulose) και κρυσταλλικής μορφής κυτταρίνη (Avicel). Δε φαίνεται το στέλεχος itz\_2811\_16 να εμφανίζει ξεχωριστό φαινότυπο παρουσία οποιασδήποτε από τις πηγές άνθρακα που ελέγχθηκαν (Εικόνα 3.14) .

### 3.8.1 Στελέχη με ανθεκτικότητα στο boscalid

Η δεύτερη αντιμυκητιακή ένωση που ελέγχθηκε για την εύρεση νέων ανθεκτικών στελεχών με τη χρήση του μεταθετού στοιχείου Minos ήταν το φυτοφάρμακο boscalid. Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί από τον αγρό στελέχη από διάφορα είδη μυκήτων, τα οποία εμφανίζουν ανθεκτικότητα λόγω μεταλλαγής του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη SdhB, δομικό και λειτουργικό στοιχείο του συμπλέγματος II στην αναπνευστική αλυσίδα. Με τη χρήση του μεταθετού στοιχείου, πέραν της συνεισφοράς των μεταφορέων νουκλεοβάσεων, νουκλεοσιδίων και αλλαντοΐνης στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών, φάνηκε ότι ένα γονίδιο του *A. nidulans* με ρόλο αισθητήρα σε υψηλές συγκεντρώσεις καλίου στον εξωκυττάριο χώρο υπάρχει πιθανότητα να εμπλέκεται σε ήπια ανθεκτικότητα έναντι του boscalid. Η πρωτεΐνη wscB κωδικοποιείται από το γονίδιο AN6927 (Πίνακας 3.8.2) και έχει χαρακτηριστεί από τους (Futagami *et al.* 2011).

Πίνακα 3.8.2: Θέση ένθεσης του μεταθετού στοιχείου σε στελέχη με ήπια ανθεκτικότητα στο boscalid

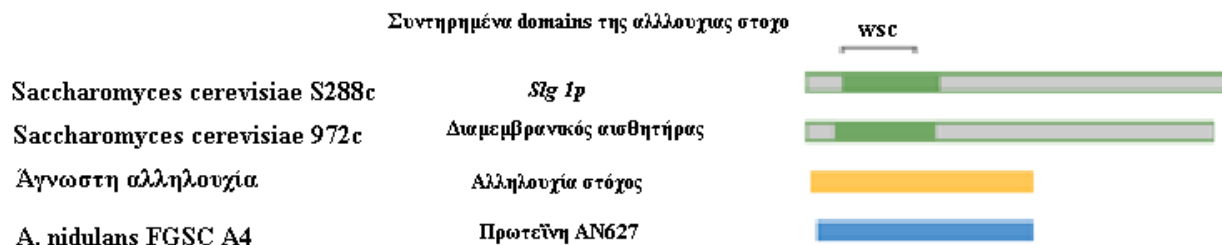
Στέλεχος	Χρωμόσωμα	Αύξων αριθμός νουκλεοτιδίων που απομονώθηκαν	Θέση ένθεσης
Boscalid_st24	I	3.603.528-3.603.540	-23 bp του γονιδίου AN6927, εντός του υποκινητή

Με το κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται οι αλληλουχίες του φορέα στον οποίο κλωνοποιήθηκε τμήμα του γονιδιώματος από τη θέση στην οποία είχε εντεθεί το μεταθετό στοιχείο. Με το γαλάζιο παρουσιάζονται τα τμήματα των αλληλουχιών (IRs) του μεταθετού στοιχείου ενώ υπογραμμισμένα είναι τα τμήματα του γενωμικού DNA, που μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο Sau3A παρέμειναν ενωμένα με τα IRs και ενισχύθηκαν μέσω της μεθόδου εύρεση της ένθεσης. Στον Πίνακα 3.8.2 παρουσιάζεται αναλυτικά η θέση της ένθεσης. Το AN6927 ανήκει στην ομάδα κυτταρικών αισθητήρων

wsc. Στην Εικόνα 3.15 παρουσιάζεται κλαδόγραμμα που επισημαίνει τις ομοιάζουσες περιοχές της υπό μελέτη πρωτεΐνης με άλλες χαρακτηρισμένες αλληλουχίες πρωτεϊνών κατατεθειμένες στην Βάση Δεδομένων Uniprot.

*Boscalid\_st24*

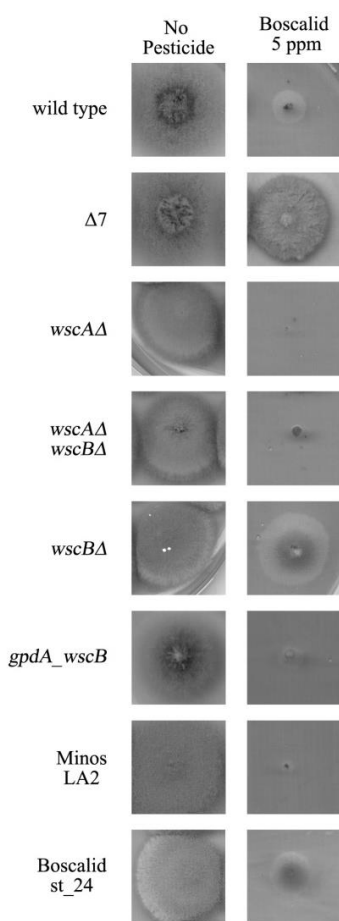
```
GCCAGCTTTCATCCCCGATTGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTAT
CTGACAGCAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCATCCGTCGCCCCGGCGT
GTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATAACGGCTCTCTCTT
TATAGGTGTAAACCTTAAACTGCCGTACGTATAGGCTGCGCAACTGTTGGGA
AGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGA
TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCCGACG
TTGTA AAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTG
GGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGA
ATTCAGG GTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAATATGAGTAATTTATTC
AAACGTTTGCTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACCACTATTAATTCGAACGCG
GCGTAATGTGATTTACTATCATACTTAAACAATAATTTAATTGAGAAAAAAGT
GAACGAGCCCCAACCACTATTAATTCGAACAGCATGTTTTTTTTGCAGTGCGC
AATGTTTAACACACTATATTAATCAATACTACTAAAGATAACACATACCAATGC
ATTCGTCTCAAAGAG CCTGAATTCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTGG
ATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTAACGCGCCTA
```



**Εικόνα 3.15:** Η ανάλυση των ομόλογων χαρακτηρισμένων πρωτεϊνών που διέθεταν τα χαρακτηριστικά που αποδίδονται στην πρωτεΐνη AN6927 με ρόλο διαμεμβρανικού υποδοχέα Wsc.

Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια καθαρά μυκητιακή πρωτεΐνη και συναντάται ως επί το πλείστον τα γένη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium*. Σύμφωνα με τη βιοπληροφορική ανάλυση που έγινε στην αλληλουχία της πρωτεΐνης, βρέθηκε ότι υπάρχει σε αυτή ένα διαμεμβρανικό τμήμα που αποτελείται από α-έλικα με υψηλό βαθμό εμπιστοσύνης πρόβλεψης.

Στο *Aspergillus nidulans* έχουν χαρακτηριστεί δύο ορθόλογα γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια Wsc, τα *wscA* και *wscB*. Με το *wscA* να εμφανίζει φαινότυπο σε υψηλή συγκέντρωση καλίου, στελέχη που έχουν υποστεί απαλοιφή του *wscA* γονίδιο εμφανίζουν μειωμένη ανάπτυξη σε υψηλή συγκέντρωση καλίου (0,6 M) (Futagami *et al.* 2011).

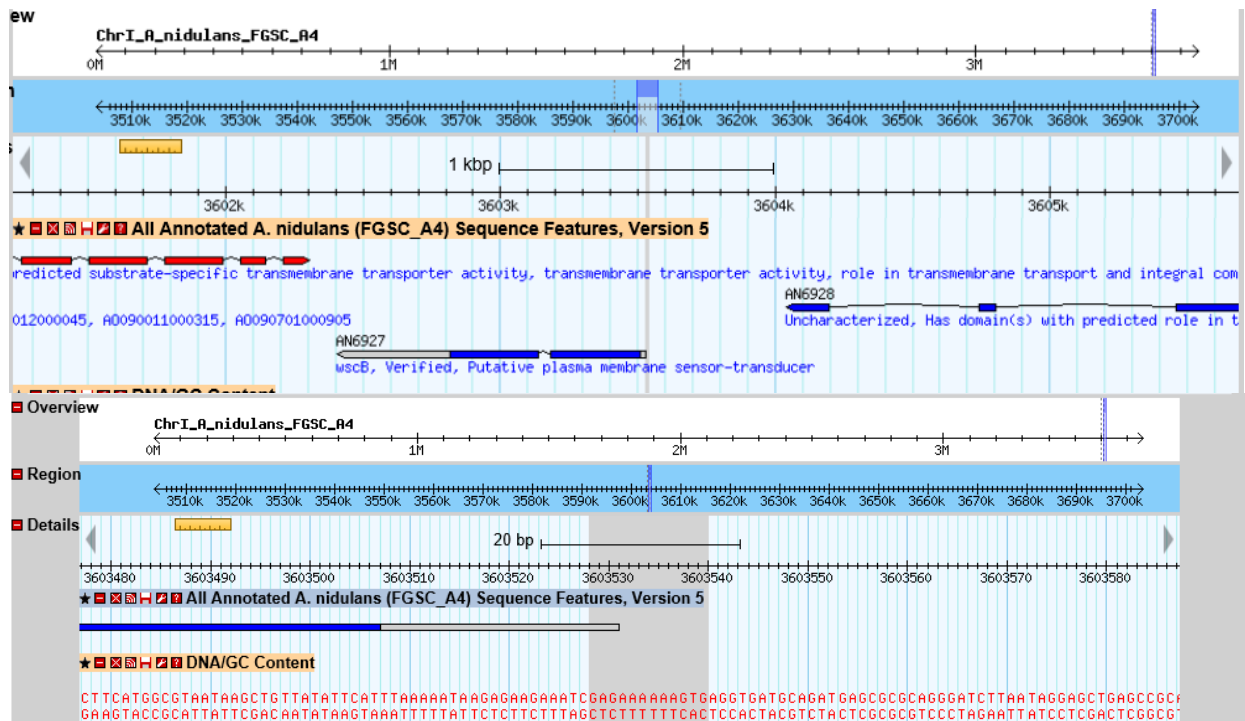


**Εικόνα 3.14:** Δοκιμασίες αύξησης για την ανθεκτικότητα σε boscalid 5 ppm σε στελέχη που έχει γίνει απαλοιφή και υπερέκφραση του γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της οικογένειας Wsc.

Στην Εικόνα 3.14 φαίνεται το στέλεχος Δ7 που έχει ήδη επιβεβαιωθεί για την ανθεκτικότητα που εμφανίζει στο boscalid και χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας ανθεκτικότητα, ενώ τα στελέχη αγρίου τύπου (wild type) και Minos LA2 ως αρνητικοί μαρτυράς ευαισθησίας. Τα στελέχη *wscBΔ* και *Boscalid\_st\_24* εμφανίζουν ήπια ανθεκτικότητα, η οποία δεν είναι απόλυτα επαναλήψιμη. Αντιθέτως τα στελέχη *wscAΔ*



και *wscABΔ* δεν εμφανίζουν ανθεκτικότητα. Τέλος επειδή, η ένθεση έγινε στον υποκινητή του γονιδίου και επειδή είναι γνωστό ότι εκτός από απενεργοποίηση με την ένθεση, ένα μεταθετό στοιχείο μπορεί να προκαλέσει και υπερέκφραση του γονιδίου αν εισαχθεί στον υποκινητή (Εικόνα 3.15) του γονιδίου κατασκευάστηκε ισογενετικό με το *wscBΔ* που υπερεκφράζει το γονίδιο *wscB*, το στέλεχος *grpA-wscB* υπό τον έλεγχο ισχυρού υποκινητή *grpA* σε πλασμίδιο.



**Εικόνα 3.15:** Η ένθεση του μεταθετού στοιχείου Minos στο στέλεχος *boscalid\_st24*, -23 bp του γονιδίου AN6927, εντός του υποκινητή.

Το στέλεχος *grpA-wscB* δε φαίνεται να παρουσιάζει καμία ανθεκτικότητα σε σχέση με αυτό του αγρίου τύπου από το οποίο προήλθε, γεγονός που επιβεβαιώνει την υποψία ότι η ήπια ανθεκτικότητα που παρατηρείται οφείλεται σε μειωμένη έκφραση του γονιδίου αυτού και όχι σε περαιτέρω ενεργοποίησή του.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

## 4.1 Νέος μηχανισμός ανθεκτικότητας στο boscalid

Στην παρούσα μελέτη συντελέστηκε προσπάθεια να βρεθούν πιθανοί νέοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας του *Aspergillus nidulans* σε αντιμυκητιακά φάρμακα. Μετά τις δοκιμές αύξησης που πραγματοποιήθηκαν σε διαφόρους τύπους χημικών ομάδα αντιμυκητιακών ουσιών, που χρησιμοποιούνται στην καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων, έγινε φανερή η αποτελεσματικότητα των περισσότερων από αυτά απέναντι στο αγρίου τύπου στέλεχος *Aspergillus nidulans*. Από τις νεότερες και πολλά υποσχόμενες χημικές ομάδες στην ταχεία και ειδική καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως έχει δείχτει και φάνηκε και στην παρούσα μελέτη, είναι οι αναστολείς της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (SDHs). Για το λόγο αυτό ακολουθήθηκε περαιτέρω αναζήτηση πιθανών νέων μηχανισμών ανθεκτικότητας έναντι των ουσιών που ανήκουν στην ομάδα αυτή και ειδικότερα σε ένα από τα πιο καινούρια μέλη της ομάδας αυτής, το boscalid.

Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα του boscalid απέναντι στα διαφορετικά είδη *Aspergillus* φάνηκε κλιμάκωση στην τοξικότητα του φαρμάκου. Η τοξικότητα του boscalid φάνηκε να κατανέμεται σε 3 επίπεδα. Στα πολύ ευαίσθητα είδη ανήκουν οι *A. nidulans*, *A. foetidus*, *A. brasiliensis*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. aculeatus*, *A. versicolor*, *A. fischeri*, *A. wentii* και *A. flavus*. Στα μέτριας ευαισθησίας είδη ανήκουν οι *A. sidowii*, *A. terreus* και *A. glaucus*, ενώ στα ανθεκτικότερα οι *A. tubigenis* και *A. carbonarius*. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι παρόλο που τα αμινοξέα τα οποία αποτελούν στόχο για το φυτοφάρμακο στην υπομονάδα SdhB της αναπνευστικής αλυσίδας έχουν συντηρημένη αλληλουχία σε όλα τα είδη των *Aspergillus*, τα επίπεδα τοξικότητας του διαφέρουν εμφανώς. Φαίνεται, λοιπόν, πως η ανθεκτικότητα στο boscalid, παρόλο που ο στόχος είναι ίδιος σύμφωνα με την αλληλούχηση των γονιδιωμάτων των οργανισμών του εξετάστηκαν, δεν οφείλεται σε τροποποιημένο στόχο του φαρμάκου. Παράλληλα γίνεται σαφές ότι η διάχυση δεν αποτελεί το βασικό τρόπο εισόδου του φαρμάκου στο κύτταρο, εφόσον η ρευστότητα επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και όλοι οι οργανισμοί δοκιμάστηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH θα έπρεπε να έχουν την ίδια ευαισθησία στο boscalid γεγονός που δεν συμβαίνει.

Στη φυλογενετική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για την πρωτεΐνη SdhB του συμπλέγματος Π χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες από οργανισμούς στόχους του φαρμάκου και μη. Σύμφωνα με την επιστημονική ομάδα του Yin (Yin *et al.* 2011), αλλαγές κοντά στο αμινοτελικό άκρο προκαλούν ανθεκτικότητα στο φυτοφάρμακο στον οργανισμό *B. cinerea*. Η πιο συνηθισμένη είναι η αντικατάσταση του αμινοξέος **H** (Ιστιδίνη)272 σε **Y** (Τυροσίνη) ή **R** (Αργινίνη) ( H272Y/R), όπως επίσης και μια πιο σπάνια μεταλλαγή η οποία οδηγεί στην αντικατάσταση του αμινοξέος **P** (Προλίνη) 225 σε **F** (Φαινιλαλανίνη) (P225F). Τα φυτικά είδη των οποίων το ομόλογο γονίδιο της υπομονάδας SdhB δεν αποτελεί στόχο για το boscalid ήταν τα *Medicago truncatula* και *Arabidopsis thaliana*. Επίσης, δεν αποτελούν στόχο για το boscalid οι οργανισμοί *Drosophila melanogaster* και *Saccharomyces cerevisiae*. Οι παραπάνω μη μυκητιακοί αντιπρόσωποι, εκτός του *S. cerevisiae*, αποτελούν ξεχωριστούς κλάδους απομακρυσμένους από αυτό των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου. Δε φαίνεται φυλογενετικός συσχετισμός της αλληλουχίας της πρωτεΐνης SdhB με την ευαισθησία στο boscalid των ειδών του γένους *Aspergillus* που δοκιμάστηκαν. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει για ακόμη μια φορά την ύπαρξη και άλλου μηχανισμού ανθεκτικότητας πέραν της τροποποίησης του στόχου, όπως γνωρίζαμε μέχρι τώρα για το boscalid (Avenot and Michailides 2010; Sierotzki and Scalliet 2013).

Στη συνέχεια, από τις *in vivo* δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες για το αγρίου τύπου στέλεχος καταλήγουμε, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4, ότι η δράση του boscalid εξαρτάται από την πηγή αζώτου, καθώς επίσης από το pH του θρεπτικού υποστρώματος και δευτερευόντως από τη θερμοκρασία ανάπτυξης των στελεχών. Πιο συγκεκριμένα, το boscalid εμφανίζει υψηλή τοξικότητα στους 25 °C σε όλα τα pH που δοκιμάστηκαν όταν ως μοναδική πηγή αζώτου χρησιμοποιήθηκαν, τα νιτρικά ιόντα. Σε αντίθεση με τους 37 °C, η τοξικότητα του boscalid μειώνεται κυρίως, όταν ως μοναδική πηγή αζώτου είναι τα αμωνιακά ιόντα με τη μέγιστη τοξικότητα στο pH 8 παρουσία νιτρικών ιόντων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η κυτταρική συσσώρευση του boscalid είναι αυξημένη :

- i. Παρουσία μιας δευτερογενούς πηγής αζώτου όπως είναι τα νιτρικά ιόντα, η οποία δεν προκαλεί καταστολή στην έκφραση αρκετών μεταφορέων (non-repressing), σε αντίθεση με τα αμμωνιακά ιόντα, που η παρουσία τους προκαλεί τέτοια φαινόμενα καταστολής.
- ii. Σε υψηλά pH, όπως φάνηκε στις βιοδοκιμές σε pH 8 στους 37 °C.

Η επίδραση της θερμοκρασίας φαίνεται να είναι αρκετά πιο σύνθετη, μόνο που η παρατήρηση αυτή είναι δευτερευούσης σημασίας μιας και ο *Aspergillus nidulans* παρουσιάζει υψηλότερο ρυθμό αύξησης στους 37 °C σε σχέση με τους 25 °C. Συμπερασματικά η συσσώρευση του boscalid εξαρτάται από τη διαμεσολάβηση μεταφορέων, των οποίων η έκφραση επηρεάζεται από την παρουσία ανάλογης πηγής αζώτου. Στα χαμηλότερα επίπεδα pH η συσσώρευση φαίνεται να εξαρτάται τόσο από τη διαμεσολάβηση μεταφορέων όσο και από τη διάχυση.

Όλα τα μέχρι τώρα στοιχεία συνιστούν, ότι μεταφορείς που σχετίζονται με τη μεταφορά αζώτου στο κύτταρο, έχουν μεγάλη πιθανότητα να εμπλέκονται στη συσσώρευση του boscalid στο κύτταρο του μύκητα *A.nidulans*. Αυτό που αξίζει να σχολιαστεί και να υπογραμμιστεί στα αποτελέσματα της Εικόνας 3.5 είναι ότι τη μέγιστη ανθεκτικότητα εμφανίζουν δύο στελέχη ακόμα και στην υψηλότερη συγκέντρωση 10 ppm. Πρόκειται για τα *areA30* και *Δ7*. Ο *areA* μεταγραφικός παράγοντας έχει αποδειχτεί ότι ελέγχει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό δευτερογενών πηγών αζώτου αναγνωρίζοντας περιοχές GATA στους υποκινητές των γονιδίων συνήθως σε παλίνδρομα, όπως συμβαίνει με τους μεταφορείς που έχουν διαγραφεί στο στέλεχος *Δ7*. Στο στέλεχος *areA30*, ο μεταγραφικός παράγοντας *areA* έχει υποστεί σημειακή μεταλλαγή (Leu683Met) και προτιμά AGATAR και CGATAR περιοχές για τη σύνδεση στον υποκινητή κατά την έναρξη της μεταγραφής, ενώ στο στέλεχος *areA102* έχει υποστεί σημειακή μεταλλαγή (Leu683Val) και προτιμά TGATAR, για τη σύνδεση του στον υποκινητή. Τα δύο στελέχη παρουσιάζουν προτίμηση σε GATA περιοχές “mirror-image”. Συγκεκριμένα, όποια περιοχή για τη μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη προκαλεί ισχυρότερη δέσμευση του μεταλλαγμένου μεταγραφικού παράγοντα για τον άλλο μεταγραφικό παράγοντα, αποτελεί περιοχή αδύναμης δέσμευσης (Abreu *et al.* 2010). Σύμφωνα με τους (Amillis *et al.* 2004) σε στέλεχος *area102* ενισχύεται η έκφραση των

γονιδίων που κωδικοποιούν τους μεταφορείς UapC και AzgA, ενώ καταστέλλεται η έκφραση του UapA. Προφανώς και σε στέλεχος *areA30* ισχύουν ακριβώς τα αντίθετα. Επίσης, σύμφωνα με (Vlanti and Diallinas 2008) ισχύει ότι η έκφραση των μεταφορέων FcyB και FurD καταστέλλεται σε στέλεχος *areA102* και ενισχύεται σε στέλεχος *areA30*. Τέλος, αναφορικά με τους μεταφορείς CntA και FurA δεν έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά ο έλεγχος από τον *areA* μεταγραφικό παράγοντα. Παρόλα αυτά στον υποκινητή και πλησιέστερα στη θέση έναρξης της μεταγραφής υπάρχουν αλληλουχίες TAGAR και θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι υφίσταται αρνητική ρύθμιση η έκφραση του υπό την επίδραση του *areA30*, και θετική υπό την επίδραση του *areA102*, αρκεί μόνο να επιβεβαιωθεί. Συμπερασματικά λοιπόν, στο στέλεχος *areA30* οι μεταφορείς των οποίων η έκφραση ενισχύεται είναι οι UapA, FcyB και FurD ενώ καταστέλλεται η έκφραση των UapC, AzgA και πιθανά των CntA και FurA. Το αντίθετο ισχύει για το στέλεχος *areA102*, το οποίο είναι εντελώς ευαίσθητο υπό την επίδραση με boscalid.

Από τους επτά μεταφορείς που ελέγχθηκαν για την εμπλοκή τους στην τοξικότητα του boscalid οι πέντε προσλαμβάνουν το boscalid. Τελικά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας 3.6, σχηματικά με σειρά φθίνουσας ευαισθησίας του στελέχους στο οποίο εκφράζονται, στη μεταφορά του boscalid εμπλέκονται οι FurA, AzgA, UapC > CntA > FcyB, ενώ δε φαίνεται να εμπλέκονται στη μεταφορά του φαρμάκου οι UapA και FurD. Είναι επίσης ενδιαφέρον, ότι τέσσερις από τους πέντε μεταφορείς που μεταφέρουν το boscalid (AzgA, UapC, CntA, FcyB,) είναι μη ειδικοί ως προς το υπόστρωμα και αναγνωρίζουν πολλές πουρίνες, πυριμιδίνες ή όλα τα νουκλεοτίδια. Αντίθετα, ο πέμπτος μεταφορέας Fura, είναι ειδικός για την αλλαντοΐνη, μια ένωση με κάποια δομική ομοιότητα με boscalid. Ωστόσο, οι δύο μεταφορείς που δεν συμμετέχουν στην πρόσληψη του boscalid είναι εξαιρετικά ειδικοί μεταφορείς υποστρώματος, ο UapA για ουρικό οξύ και ξανθίνη και ο FurD για ουρακίλη.

Αν τα αποτελέσματα αυτά συσχετιστούν με τον ανθεκτικό φαινότυπο του *areA30* όπου οι UapC, AzgA και πιθανά οι CntA και FurA μεταφορείς έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης, οι άλλοι δύο, UapA και FurD, που ενισχύεται η έκφρασή τους, δεν μεταφέρουν το φάρμακο και το στέλεχος Δ7::FcyB<sup>+</sup> έχει τη χαμηλότερη ευαισθησία σε

σχέση με τα υπόλοιπα ευαίσθητα στελέχη. Επομένως η εμπλοκή αυτών των μεταφορέων που αναφέραμε επιβεβαιώνεται ισχυρά.

## 4.2 Ενδοκύττωση των μεταφορέων παρουσία boscavid

Οι μεταφορείς UapC, AzgA και FurA έχει αποδειχθεί ότι ενδοκυττώνονται παρουσία του υποστρώματός τους (Gournas *et al.* 2010). Στην παρούσα μελέτη έγινε σαφές ότι οι τρεις αυτοί βασικοί μεταφορείς ενδοκυττώνονται παρουσία boscavid, γεγονός που ενισχύει την άποψή μας για την εμπλοκή τους στη μεταφορά του εντός του κυττάρου σε στελέχη  $\Delta 7::uapC^+$ ,  $\Delta 7::azgA^+$  και  $\Delta 7::furA^+$  με σημασμένους τους μεταφορείς με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Αντίθετα, στο στέλεχος  $\Delta 7::uapA^+$  δεν παρατηρείται ενδοκύττωση. Παρόλα αυτά σε στέλεχος χωρίς  $\Delta 7$  γενετικό υπόβαθρο με σημασμένο τον μη σχετιζόμενο με boscavid μεταφορέα UapA παρατηρείται χαμηλή ενδοκύττωση του μεταφορέα. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι η υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση του φαρμάκου λόγω λειτουργίας όλων των σχετιζόμενων με boscavid μεταφορέων, προκαλεί αυξημένη κυτταρική καταπόνηση και γενικότερη ενδοκύττωση στο κύτταρο με σκοπό την αποτοξικοποίηση του και την πιθανή διάσωση του. Είναι ακόμη πιθανό ότι ο μεταφορέας UapA συμπαρασύρεται σε ενδοκύττωση από άλλους μεταφορείς, που ενδοκυττώνονται παρουσία του φαρμάκου, καθώς βρίσκονται στο παρόν στέλεχος άπαντες σε λειτουργία

Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η προοδευτική αύξηση των αντιγράφων του γονιδίου *furA* σε γενετικό υπόβαθρο  $\Delta 7$  προκαλεί και αύξηση της ενδοκύττωσης του μεταφορέα αυτού σε σταθερή συγκέντρωση boscavid 10 ppm. Βιβλιογραφικά, τόσο το υπόστρωμα του συγκεκριμένου μεταφορέα που είναι η αλλαντοΐνη, όσο και η παρουσία αμμωνιακών ιόντων προκαλεί την ενδοκύττωση του μεταφορέα (Kryotou *et al.* 2015 β). Παράλληλα η προοδευτική αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου προκαλεί και εντονότερη ενδοκύττωση στο στέλεχος με το μέγιστο αριθμό αντιγράφων του μεταφορέα. Όλα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ορισμένοι από τους μεταφορείς πουρινών πυριμιδινών και αλλαντοΐνης εμπλέκονται στην πρόσληψη του boscavid.

### 4.3 Αποτελεσματική και η νέα μέθοδος εύρεσης ένθεσης του μεταθετού στοιχείου *Minos* στον *Aspergillus nidulans*.

Κατά τη διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Sau3A, το οποίο έχει ως πλεονέκτημα χρειάζεται μόνο τέσσερα νουκλεοτίδια για να αναγνωρίσει θέση κοπής και είναι τα 5'-GATC-3'.

Για την ανίχνευση της θέσης ένθεσης ακολουθήθηκε μια διαφορετική διαδικασία που περιελάμβανε και στην παρούσα εργασία μια ακολουθία αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης. Η ακολουθία των τριών αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης καθώς και η κλωνοποίηση του ενισχυμένου τμήματος συμβάλουν στην απόδοση και βελτιστοποίηση της μεθόδου με αποτέλεσμα τα προϊόντα που αποδίδονται προς αλληλούχηση να είναι αυξημένης καθαρότητας. Το μόνο ίσως μειονέκτημα που μπορεί να έχει η συγκεκριμένη μέθοδος είναι το γεγονός ότι οι συχνές θέσεις κοπής μπορούν να δημιουργήσουν και πολύ μικρά θραύσματα με αποτέλεσμα τα τμήματα του γενωμικού DNA που κλωνοποιούνται να μην ανιχνεύονται βιοπληροφορικά σε μοναδική θέση μέσα στο γονιδίωμα και έτσι να γίνεται δύσκολη η εύρεση ένθεσης τελικά του μεταθετού στοιχείου *Minos*. Το τελευταίο υπερκεράζεται από το γεγονός ότι έχει πραγματοποιηθεί μεταγονιδιωματική ανάλυση στο γονιδίωμα του *Aspergillus nidulans* και έχουν ανακαλυφθεί πιθανές λειτουργίες σύμφωνα με τη δομή και τα domains της κάθε πρωτεΐνης, γεγονός που πρέπει να επιβεβαιωθεί και πειραματικά στη συνέχεια ανάλογα με τον τύπο της ένθεσης.

Με τη χρήση του μεταθετού στοιχείου και την εφαρμογή της βελτιστοποιημένης μεθόδου, που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, απομονώθηκαν στελέχη με ανθεκτικότητα σε αντιμυκητιακές ενώσεις και ταυτοποιήθηκε η ένθεση του μεταθετού στοιχείου. Το πρώτο φάρμακο στο οποίο έγινε επιλογή ανθεκτικών στελεχών ήταν η ιτρακοναζόλη. Απομονώθηκαν δύο στελέχη με πιθανή ανθεκτικότητα αλλά μόνο το ένα διατήρησε τον φαινότυπο αυτό κατά την ανακαλλιέργια των στελεχών. Οι ενθέσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8.1. Το στέλεχος *itz\_2811\_16* διατήρησε την ήπια ανθεκτικότητα του. Στο στέλεχος αυτό η ένθεση του μεταθετού στοιχείου εντός του δεύτερου εσωνίου του γονιδίου AN9524, απενεργοποιεί το γονίδιο. Το γονίδιο αυτό έχει πιθανά ενεργότητα κυτταρινάσης, ενώ ο ήπιος φαινότυπος πιθανότατα οφείλεται στην



ύπαρξη περισσότερων γονιδίων με παρόμοια λειτουργία, τα οποία δεν μπορούν απενεργοποιηθούν ταυτόχρονα με το μεταθετό στοιχείο ώστε να γίνει πιο έντονος ο φαινότυπος. Η πρωτεΐνη αυτή με τη δομή που διαθέτει, αποτελείται από τρία μέχρι δύο διαμεμβρανικά τμήματα, με το αμινοτελικό άκρο εντός του κυττάρου πιθανότατα για μεταγωγή σήματος και το καρβοξυτελικό άκρο διαθέτει θέση δέσμευσης της κυτταρίνης (fCBD). Φαίνεται επίσης, να καταλαμβάνει και βοηθητικό ρόλο στην υδρόλυση της κυτταρίνης χωρίς ο φαινότυπος αυτός να γίνεται ορατός καθώς ο *A. nidulans* διαθέτει και άλλα γονίδια με παρόμοια λειτουργία. Ο ρόλος πάντως του αισθητήρα μπορεί να συσχετιστεί πιο εύκολα με την ήπια ανθεκτικότητα σε αντιμυκητιακές ενώσεις όπως έχει συμβεί και με άλλες αντιμυκητιακές ενώσεις στο παρελθόν.

Η δεύτερη κατά σειρά ένωση που ελέγχθηκε με τη βοήθεια μεταθετού στοιχείου για την εύρεση νέων πιθανών μηχανισμών ανθεκτικότητας ήταν το boscalid. Στο στέλεχος *Boscalid\_st24* η ένθεση είναι -23bp από τη θέση έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου AN6927, γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη wscB. Η πρωτεΐνη wscB διαθέτει ένα διαμεμβρανικό τμήμα και έχει χαρακτηριστεί από τους (Futagami *et al.* 2011) μαζί με το ορθόλογο του γονιδίου *wscA*. Φαινότυπο μειωμένης αύξησης σε συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης μεταλλικών ιόντων κυρίως κάλιο παρουσιάζουν τα στελέχη *wscAD* και *wscABD*, ενώ στο στέλεχος *wscBD* δε φάνηκε κάποια διαφορά. Τα στελέχη *Boscalid\_st24* και *wscBD* φάνηκε να έχουν ήπια ανθεκτικότητα στο boscalid. Στέλεχος που υπερεκφράζει την πρωτεΐνη wscB το *gpdA-wscB* δεν παρουσιάζει αλλαγή στην ευαισθησία του φαρμάκου. Το *wscABD* στέλεχος ωστόσο, πιθανότατα να είναι ευαίσθητο λόγω ότι η συγκέντρωση ιόντων  $\text{Na}^+$  είναι υψηλότερη από το σύνθετο, με αποτέλεσμα το στέλεχος να έχει καθυστερημένη ανάπτυξη λόγω της εγγενούς διαγραφής αυτών των γονιδίων όπου σε συνδυασμό με το γενικότερο stress που προκαλείται από το boscalid η ανάπτυξη του να καθυστερεί ακόμη περισσότερο. Το ίδιο πιθανά να ισχύει και για το στέλεχος *wscAD*. Τελικώς ο ρόλος του wscB είναι αισθητήρα τόσο για αντίληψη του οσμωτικού stress, όπως συμβαίνει και με το ομόλογο του γονιδίου *slg1* στον *Saccharomyces cerevisiae*, όσο και πιθανότατα για την μεταγωγή σήματος και ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται ελαφρά με την πρόσληψη του boscalid, γεγονός που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Εν κατακλείδι αλληλουχήθηκαν μερικά ακόμα στελέχη που δε διατήρησαν την ανθεκτικότητα τους έναντι του boscalid, των οποίων η μικρή αλληλουχία της θέσης ένθεσης που κλωνοποιήθηκε δεν κάνει δυνατή την εύρεση της θέσης ένθεσης. Οι αλληλουχίες αυτές παρουσιάζονται στο Παράρτημα II. Για το στέλεχος *Boscalid\_st24* υπήρχαν και άλλες υποψήφιες θέσης ένθεσης, όμως μόνο αυτή στο χρωμόσωμα I στη θέση -23bp από το γονίδιο AN6927 μπορεί να συσχετιστεί με την ήπια ανθεκτικότητα στο boscalid, καθώς στις υπόλοιπες των περιπτώσεων η ένθεση υποδεικνύεται σε διαγονιδιακή περιοχή μακριά από κάποιο γονίδιο γνωστής ή άγνωστης λειτουργίας. Τέλος, είναι απολύτως λογικό ότι οι φαινότυποι που επιτύχαμε σε όλες τις περιπτώσεις είναι ήπιας ανθεκτικότητας εφόσον για το boscalid ταυτοποιήθηκαν πέντε μεταφορείς που σχετίζονται με την πρόσληψη του φαρμάκου και μόνο όταν σε στελέχη που η πλειονότητα τους δεν εκφράζεται, τα στελέχη αυτά είναι ανθεκτικά. Το ίδιο, πιθανότητα να συμβαίνει και με την ιτρακοναζόλη ενώ πιστεύεται ότι εισέρχεται όπως και οι υπόλοιπες αζόλες στο κύτταρο μέσω διάχυσης.

## 5.ΒΙΒΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abreu, C., M. Sanguinetti, S. Amillis, and A. Ramon. 2010. UreA, the major urea/H<sup>+</sup> symporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 47 (12):1023-1033.
- Ackrell, B. A. 2000. Progress in understanding structure–function relationships in respiratory chain complex II. *FEBS letters* 466 (1):1-5.
- Alexander, S. 2011. Transporters are an under-developed therapeutic target. Discuss. *British Journal of Pharmacology* 164 (7):1751-1752.
- Amillis, S., G. Cecchetto, V. Sophianopoulou, M. Koukaki, C. Scazzocchio, and G. Diallinas. 2004. Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. *Mol Microbiol* 52 (1):205-216.
- Amillis, S., Z. Hamari, K. Roumelioti, C. Scazzocchio, and G. Diallinas. 2007. Regulation of expression and kinetic modeling of substrate interactions of a uracil transporter in *Aspergillus nidulans*. *Mol Membr Biol* 24 (3):206-214.
- Apostolaki, A., Z. Erpapazoglou, L. Harispe, M. Billini, P. Kafasla, D. Kizis, M. A. Penalva, C. Scazzocchio, and V. Sophianopoulou. 2009. AgtA, the dicarboxylic amino acid transporter of *Aspergillus nidulans*, is concertedly down-regulated by exquisite sensitivity to nitrogen metabolite repression and ammonium-elicited endocytosis. *Eukaryot Cell* 8 (3):339-352.
- Avenot, H., D. Morgan, and T. Michailides. 2008a. Resistance to pyraclostrobin, boscalid and multiple resistance to Pristine®(pyraclostrobin+ boscalid) fungicide in *Alternaria alternata* causing alternaria late blight of pistachios in California. *Plant pathology* 57 (1):135-140.
- Avenot, H. F., and T. J. Michailides. 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 29 (7):643-651.
- Avenot, H. F., A. Sellam, G. Karaoglanidis, and T. J. Michailides. 2008β. Characterization of mutations in the iron-sulphur subunit of succinate dehydrogenase correlating with Boscalid resistance in *Alternaria alternata* from California pistachio. *Phytopathology* 98 (6):736-742.
- Axelrod, D., M. Gealt, and M. Pastushok. 1973. Gene control of developmental competence in *Aspergillus nidulans*. *Developmental biology* 34 (1):9-15.
- Beadle, G. W., and E. L. Tatum. 1941. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *proceedings of the National Academy of Sciences* 27 (11):499-506.
- Brown, G. D., D. W. Denning, and S. M. Levitz. 2012. Tackling human fungal infections. *Science* 336 (6082):647.
- Bruggeman, J., A. J. Debets, P. J. Wijngaarden, J. A. GM deVisser, and R. F. Hoekstra. 2003. Sex slows down the accumulation of deleterious mutations in the homothallic fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 164 (2):479-485.
- Carvajal, E., H. B. van den Hazel, A. Cybularz-Kolaczowska, E. Balzi, and A. Goffeau. 1997. Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes. *Mol Gen Genet* 256 (4):406-415.
- Casselton, L., and M. Zolan. 2002. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nature Reviews Genetics* 3 (9):683-697.

- Cecchetto, G., S. Amillis, G. Diallinas, C. Scazzocchio, and C. Drevet. 2004. The AzgA purine transporter of *Aspergillus nidulans*. Characterization of a protein belonging to a new phylogenetic cluster. *J Biol Chem* 279 (5):3132-3141.
- Choi, Y. H., and A. M. Yu. 2014. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr Pharm Des* 20 (5):793-807.
- Coste, A. T., M. Karababa, F. Ischer, J. Bille, and D. Sanglard. 2004. TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2. *Eukaryot Cell* 3 (6):1639-1652.
- Coutinho, P. M., M. R. Andersen, K. Kolenova, P. A. vanKuyk, I. Benoit, B. S. Gruben, B. Trejo-Aguilar, H. Visser, P. van Solingen, T. Pakula, B. Seiboth, E. Battaglia, G. Aguilar-Osorio, J. F. de Jong, R. A. Ohm, M. Aguilar, B. Henrissat, J. Nielsen, H. Stalbrand, and R. P. de Vries. 2009. Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* 46 Suppl 1:S161-s169.
- de Koning, H., and G. Diallinas. 2000. Nucleobase transporters (review). *Mol Membr Biol* 17 (2):75-94.
- Diallinas, G. 2014. Understanding transporter specificity and the discrete appearance of channel-like gating domains in transporters. *Front Pharmacol* 5:207.
- DiFrancesco, J. C., and D. DiFrancesco. 2015. Dysfunctional HCN ion channels in neurological diseases. *Front Cell Neurosci* 6:174.
- Dunkel, N., J. Blass, P. D. Rogers, and J. Morschhauser. 2008. Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Mol Microbiol* 69 (4):827-840.
- Escribano, P., T. Pelaez, P. Munoz, E. Bouza, and J. Guinea. 2013. Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? *Antimicrob Agents Chemother* 57 (6):2815-2820.
- Evangelinos, M., G. Anagnostopoulos, I. Karvela-Kalogeraki, P. M. Stathopoulou, C. Scazzocchio, and G. Diallinas. 2015. Minos as a novel Tc1/mariner-type transposable element for functional genomic analysis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 81:1-11.
- Ferreira, M. E., A. L. Colombo, I. Paulsen, Q. Ren, J. Wortman, J. Huang, M. H. Goldman, and G. H. Goldman. 2005. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 43 Suppl 1:S313-319.
- Fling, M. E., J. Kopf, A. Tamarkin, J. A. Gorman, H. A. Smith, and Y. Koltin. 1991. Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. *Mol Gen Genet* 227 (2):318-329.
- Flowers, S. A., K. S. Barker, E. L. Berkow, G. Toner, S. G. Chadwick, S. E. Gyax, J. Morschhauser, and P. D. Rogers. 2012. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 11 (10):1289-1299.

- Fraczek, M. G., M. Bromley, A. Buied, C. B. Moore, R. Rajendran, R. Rautemaa, G. Ramage, D. W. Denning, and P. Bowyer. 2013. The *cdr1B* efflux transporter is associated with non-*cyp51a*-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 68 (7):1486-1496.
- Futagami, T., S. Nakao, Y. Kido, T. Oka, Y. Kajiwara, H. Takashita, T. Omori, K. Furukawa, and M. Goto. 2011. Putative stress sensors *WscA* and *WscB* are involved in hypo-osmotic and acidic pH stress tolerance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 10 (11):1504-1515.
- Gouaux, E., and R. Mackinnon. 2005. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310 (5753):1461-1465.
- Goudela, S., U. Reichard, S. Amillis, and G. Diallinas. 2008. Characterization and kinetics of the major purine transporters in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 45 (4):459-472.
- Goudela, S., H. Tsilivi, and G. Diallinas. 2006. Comparative kinetic analysis of *AzgA* and *Fcy21p*, prototypes of the two major fungal hypoxanthine-adenine-guanine transporter families. *Mol Membr Biol* 23 (4):291-303.
- Gournas, C., S. Amillis, A. Vlanti, and G. Diallinas. 2010. Transport-dependent endocytosis and turnover of a uric acid-xanthine permease. *Mol Microbiol* 75 (1):246-260.
- Gulshan, K., and W. S. Moye-Rowley. 2007. Multidrug resistance in fungi. *Eukaryot Cell* 6 (11):1933-1942.
- Hagerhall, C. 1997. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta* 1320 (2):107-141.
- Hamari, Z., S. Amillis, C. Drevet, A. Apostolaki, C. Vagvolgyi, G. Diallinas, and C. Scazzocchio. 2009. Convergent evolution and orphan genes in the *Fur4p*-like family and characterization of a general nucleoside transporter in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* 73 (1):43-57.
- Horsefield, R., V. Yankovskaya, G. Sexton, W. Whittingham, K. Shiomi, S. Ōmura, B. Byrne, G. Cecchini, and S. Iwata. 2006. Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *Journal of Biological Chemistry* 281 (11):7309-7316.
- Huang, L.-s., G. Sun, D. Cobessi, A. C. Wang, J. T. Shen, E. Y. Tung, V. E. Anderson, and E. A. Berry. 2006. 3-nitropropionic acid is a suicide inhibitor of mitochondrial respiration that, upon oxidation by complex II, forms a covalent adduct with a catalytic base arginine in the active site of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 281 (9):5965-5972.
- Jain, S. S., D. K. Shah, A. A. Khot, N. R. T, A. R. Gharat, and P. M. Rathi. 2012. Pseudomelanosis Duodeni of Undetermined Etiology. *Gastroenterology Res* 5 (4):171-173.
- Jund, R., E. Weber, and M. R. Chevallier. 1988. Primary structure of the uracil transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 171 (1-2):417-424.
- Kaback, H. R. 2015. A chemiosmotic mechanism of symport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112 (5):1259-1264.
- Kaback, H. R., I. Smirnova, V. Kasho, Y. Nie, and Y. Zhou. 2011. The alternating access transport mechanism in *LacY*. *J Membr Biol* 239 (1-2):85-93.

- Kapoor, K., M. Rehan, A. M. Lynn, and R. Prasad. 2010. Employing information theoretic measures and mutagenesis to identify residues critical for drug-proton antiport function in Mdr1p of *Candida albicans*. *PLoS One* 5 (6):e11041.
- Katzmann, D. J., T. C. Hallstrom, Y. Mahe, and W. S. Moye-Rowley. 1996. Multiple Pdr1p/Pdr3p binding sites are essential for normal expression of the ATP binding cassette transporter protein-encoding gene PDR5. *J Biol Chem* 271 (38):23049-23054.
- Kell, D. B., P. D. Dobson, E. Bilslund, and S. G. Oliver. 2013. The promiscuous binding of pharmaceutical drugs and their transporter-mediated uptake into cells: what we (need to) know and how we can do so. *Drug Discov Today* 18 (5-6):218-239.
- Keniya, M. V., R. D. Cannon, A. Nguyen, J. D. Tyndall, and B. C. Monk. 2013. Heterologous expression of *Candida albicans* Pma1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 13 (3):302-311.
- Kovalchuk, A., and A. J. Driessen. 2010. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. *BMC Genomics* 11:177.
- Kryptou, E., and G. Diallinas. 2014. Transport assays in filamentous fungi: kinetic characterization of the UapC purine transporter of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 63:1-8.
- Kryptou, E., T. Evangelidis, J. Bobonis, A. A. Pittis, T. Gabaldon, C. Scazzocchio, E. Mikros, and G. Diallinas. 2015 $\alpha$ . Origin, diversification and substrate specificity in the family of NCS1/FUR transporters. *Mol Microbiol* 96 (5):927-950.
- Kryptou, E., G. Lambrinidis, T. Evangelidis, E. Mikros, and G. Diallinas. 2014. Modelling, substrate docking and mutational analysis identify residues essential for function and specificity of the major fungal purine transporter AzgA. *Mol Microbiol* 93 (1):129-145.
- Kryptou, E., C. Scazzocchio, and G. Diallinas. 2015 $\beta$ . Functional characterization of NAT/NCS2 proteins of *Aspergillus brasiliensis* reveals a genuine xanthine-uric acid transporter and an intrinsically misfolded polypeptide. *Fungal Genet Biol* 75:56-63.
- Kudla, B., M. X. Caddick, T. Langdon, N. M. Martinez-Rossi, C. F. Bennett, S. Sibley, R. W. Davies, and H. N. Arst, Jr. 1990. The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *Embo j* 9 (5):1355-1364.
- Lanthaler, K., E. Bilslund, P. D. Dobson, H. J. Moss, P. Pir, D. B. Kell, and S. G. Oliver. 2011. Genome-wide assessment of the carriers involved in the cellular uptake of drugs: a model system in yeast. *BMC Biol* 9:70.
- Lettner, T., U. Zeidler, M. Gimona, M. Hauser, M. Breitenbach, and A. Bito. 2010. *Candida albicans* AGE3, the ortholog of the *S. cerevisiae* ARF-GAP-encoding gene GCS1, is required for hyphal growth and drug resistance. *PLoS One* 5 (8):e11993.
- Liang, W. J., D. Johnson, and S. M. Jarvis. 2001. Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol Membr Biol* 18 (1):87-95.
- Loewen, S. K., A. M. Ng, N. N. Mohabir, S. A. Baldwin, C. E. Cass, and J. D. Young. 2003. Functional characterization of a H<sup>+</sup>/nucleoside co-transporter (CaCNT)



- from *Candida albicans*, a fungal member of the concentrative nucleoside transporter (CNT) family of membrane proteins. *Yeast* 20 (8):661-675.
- Miazzi, M., and M. McGrath. 2008. Sensitivity of *Podosphaera xanthii* to registered fungicides and experimentals in GA and NY, USA, in 2007. *J Plant Pathol* 90 (Suppl 2):90.
- Mirza, O., L. Guan, G. Verner, S. Iwata, and H. R. Kaback. 2006. Structural evidence for induced fit and a mechanism for sugar/H<sup>+</sup> symport in LacY. *Embo j* 25 (6):1177-1183.
- Mooney, J. L., and L. N. Yager. 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes & Development* 4 (9):1473-1482.
- Morschhauser, J., K. S. Barker, T. T. Liu, B. W. J. Bla, R. Homayouni, and P. D. Rogers. 2007. The transcription factor Mrr1p controls expression of the MDR1 efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 3 (11):e164.
- Nakanishi, T., I. Tamai, A. Takaki, and A. Tsuji. 2000. Cancer cell-targeted drug delivery utilizing oligopeptide transport activity. *Int J Cancer* 88 (2):274-280.
- Natto, M. J., L. J. Wallace, D. Candlish, M. I. Al-Salabi, S. E. Coutts, and H. P. de Koning. 2005. *Trypanosoma brucei*: expression of multiple purine transporters prevents the development of allopurinol resistance. *Exp Parasitol* 109 (2):80-86.
- Niero, E. L., B. Rocha-Sales, C. Lauand, B. A. Cortez, M. M. de Souza, P. Rezende-Teixeira, M. S. Urabayashi, A. A. Martens, J. H. Neves, and G. M. Machado-Santelli. 2014. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *J Exp Clin Cancer Res* 33:37.
- Ōmura, S., and K. Shiomi. 2007. Discovery, chemistry, and chemical biology of microbial products. *Pure and applied chemistry* 79 (4):581-591.
- Otto, S. P., and I. M. Hastings. 1998. Mutation and selection within the individual. In *Mutation and Evolution*: Springer, 507-524.
- Pantazopoulou, A., and G. Diallinas. 2007 $\alpha$ . Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiology Reviews* 31 (6):657-675.
- Pantazopoulou, A., and G. Diallinas. 2007 $\beta$ . Fungal nucleobase transporters. *FEMS Microbiol Rev* 31 (6):657-675.
- Pantazopoulou, A., N. D. Lemuh, D. G. Hatzinikolaou, C. Drevet, G. Cecchetto, C. Scazzocchio, and G. Diallinas. 2007. Differential physiological and developmental expression of the UapA and AzgA purine transporters in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 44 (7):627-640.
- Papageorgiou, I., H. P. De Koning, K. Soteriadou, and G. Diallinas. 2008. Kinetic and mutational analysis of the *Trypanosoma brucei* NBT1 nucleobase transporter expressed in *Saccharomyces cerevisiae* reveals structural similarities between ENT and MFS transporters. *Int J Parasitol* 38 (6):641-653.
- Paul, S., D. Diekema, and W. S. Moye-Rowley. 2013. Contributions of *Aspergillus fumigatus* ATP-Binding Cassette Transporter Proteins to Drug Resistance and Virulence. *Eukaryotic Cell* 12 (12):1619-1628.
- Paul, S., and W. S. Moye-Rowley. 2014. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Front Physiol* 5:143.



- Pavlopoulos, A., S. Oehler, M. G. Kapetanaki, and C. Savakis. 2007. The DNA transposon Minos as a tool for transgenesis and functional genomic analysis in vertebrates and invertebrates. *Genome biology* 8 (1):1.
- Pound, M. W., M. L. Townsend, V. Dimondi, D. Wilson, and R. H. Drew. 2011. Overview of treatment options for invasive fungal infections. *Med Mycol* 49 (6):561-580.
- Prasad, R., P. De Wergifosse, A. Goffeau, and E. Balzi. 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, CDR1, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* 27 (4):320-329.
- Prasad, R., and A. Goffeau. 2012. Yeast ATP-binding cassette transporters conferring multidrug resistance. *Annu Rev Microbiol* 66:39-63.
- Qiao, J., W. Liu, and R. Li. 2010. Truncated Afyap1 attenuates antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole and confers adaptation of the fungus to oxidative stress. *Mycopathologia* 170 (3):155-160.
- Rajendran, R., E. Mowat, E. McCulloch, D. F. Lappin, B. Jones, S. Lang, J. B. Majithiya, P. Warn, C. Williams, and G. Ramage. 2011. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob Agents Chemother* 55 (5):2092-2097.
- Rank, G. H., and N. T. Bech-Hansen. 1973. Single nuclear gene inherited cross resistance and collateral sensitivity to 17 inhibitors of mitochondrial function in *S. cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 126 (2):93-102.
- Rank, G. H., J. H. Gerlach, and A. J. Robertson. 1976. Some physiological alterations associated with pleiotropic cross resistance and collateral sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG* 144 (3):281-288.
- Rask-Andersen, M., S. Masuram, and H. B. Schioth. 2014. The druggable genome: Evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 54:9-26.
- Ren, Q., K. Chen, and I. T. Paulsen. 2007. TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Res* 35 (Database issue):D274-279.
- Ren, Q., K. H. Kang, and I. T. Paulsen. 2004. TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res* 32 (Database issue):D284-288.
- Rognon, B., Z. Kozovska, A. T. Coste, G. Pardini, and D. Sanglard. 2006. Identification of promoter elements responsible for the regulation of MDR1 from *Candida albicans*, a major facilitator transporter involved in azole resistance. *Microbiology* 152 (Pt 12):3701-3722.
- Rudnick, G. 2013. How do transporters couple solute movements? *Mol Membr Biol* 30 (7):355-359.
- Sa-Pessoa, J., S. Amillis, M. Casal, and G. Diallinas. 2015. Expression and specificity profile of the major acetate transporter AcpA in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 76:93-103.
- Saneja, A., V. Khare, N. Alam, R. D. Dubey, and P. N. Gupta. 2014. Advances in P-glycoprotein-based approaches for delivering anticancer drugs: pharmacokinetic perspective and clinical relevance. *Expert Opin Drug Deliv* 11 (1):121-138.

- Saunders, G. W., and G. H. Rank. 1982. Allelism of pleiotropic drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Genet Cytol* 24 (5):493-503.
- Saxena, R., and U. Sinha. 1973. Conidiation of *Aspergillus nidulans* in submerged liquid culture. *The Journal of General and Applied Microbiology* 19 (2):141-146.
- Scazzocchio, C. 2006. *Aspergillus* genomes: secret sex and the secrets of sex. *Trends in genetics* 22 (10):521-525.
- Scazzocchio, C., N. Sdrin, and G. Ong. 1982. Positive regulation in a eukaryote, a study of the *uaY* gene of *Aspergillus nidulans*: I. Characterization of alleles, dominance and complementation studies, and a fine structure map of the *uaY--oxpA* cluster. *Genetics* 100 (2):185-208.
- Sierotzki, H., and G. Scalliet. 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology* 103 (9):880-887.
- Stahl, S. M., C. Lee-Zimmerman, S. Cartwright, and D. A. Morrissette. 2013. Serotonergic drugs for depression and beyond. *Curr Drug Targets* 14 (5):578-585.
- Stammler, G., H. Brix, A. Glättli, M. Semar, and U. Schoefl. 2007. Biological properties of the carboxamide boscalid including recent studies on its mode of action. Paper read at Proc. XVI Intional Plant Protection Congress, Glasgow.
- Suarez, T., M. V. de Queiroz, N. Oestreicher, and C. Scazzocchio. 1995. The sequence and binding specificity of *UaY*, the specific regulator of the purine utilization pathway in *Aspergillus nidulans*, suggest an evolutionary relationship with the PPR1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo j* 14 (7):1453-1467.
- Suarez, T., N. Oestreicher, J. Kelly, G. Ong, T. Sankarsingh, and C. Scazzocchio. 1991. The *uaY* positive control gene of *Aspergillus nidulans*: fine structure, isolation of constitutive mutants and reversion patterns. *Mol Gen Genet* 230 (3):359-368.
- Sun, F., X. Huo, Y. Zhai, A. Wang, J. Xu, D. Su, M. Bartlam, and Z. Rao. 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121 (7):1043-1057.
- Tavoularis, S., C. Scazzocchio, and V. Sophianopoulou. 2001. Functional expression and cellular localization of a green fluorescent protein-tagged proline transporter in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 33 (2):115-125.
- Timberlake, W. E. 1993. Translational Triggering and Feedback Fixation in the Control of Fungal Development. *The Plant Cell* 5 (10):1453.
- Tran, Q. M., R. A. Rothery, E. Maklashina, G. Cecchini, and J. H. Weiner. 2006. The quinone binding site in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase is required for electron transfer to the heme b. *J Biol Chem* 281 (43):32310-32317.
- Valdez-Taubas, J., G. Diallinas, C. Scazzocchio, and A. L. Rosa. 2000 $\alpha$ . Protein Expression and Subcellular Localization of the General Purine Transporter *UapC* from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 30 (2):105-113.
- Valdez-Taubas, J., G. Diallinas, C. Scazzocchio, and A. L. Rosa. 2000 $\beta$ . Protein expression and subcellular localization of the general purine transporter *UapC* from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 30 (2):105-113.
- Vlanti, A., and G. Diallinas. 2008. The *Aspergillus nidulans* *FcyB* cytosine-purine scavenger is highly expressed during germination and in reproductive

- compartments and is downregulated by endocytosis. *Mol Microbiol* 68 (4):959-977.
- Weber, E., C. Rodriguez, M. R. Chevallier, and R. Jund. 1990. The purine-cytosine permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*: primary structure and deduced protein sequence of the FCY2 gene product. *Mol Microbiol* 4 (4):585-596.
- Wong, K., J. Ma, A. Rothnie, P. C. Biggin, and I. D. Kerr. 2014. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends Biochem Sci* 39 (1):8-16.
- Yamaguchi, I., and M. Fujimura. 2005. Recent topics on action mechanisms of fungicides. *Journal of pesticide science* 30 (2):67-74.
- Yanase, Y., Y. Yoshikawa, J. Kishi, and H. Katsuta. 2007. The History of Complex II Inhibitors and the Discovery of Penthiopyrad. In *Pesticide Chemistry*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 295-303.
- Yin, Y. N., Y. K. Kim, and C. L. Xiao. 2011. Molecular characterization of boscalid resistance in field isolates of *Botrytis cinerea* from apple. *Phytopathology* 101 (8):986-995.
- Zhang, C. Q., Y. H. Liu, X. Y. Ma, Z. Feng, and Z. H. Ma. 2009. Characterization of sensitivity of *Rhizoctonia solani*, causing rice sheath blight, to mepronil and boscalid. *Crop Protection* 28 (5):381-386.
- Zhou, Q., Y. Zhai, J. Lou, M. Liu, X. Pang, and F. Sun. 2011. Thiabendazole inhibits ubiquinone reduction activity of mitochondrial respiratory complex II via a water molecule mediated binding feature. *Protein Cell* 2 (7):531-542.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### Παράρτημα I

>Alternaria alternata sdhB

```
MAALRTGARSARAIFAASRPARTQMRTMASVDSVPESPTVSPSRPVESASKTSTVKEPAADSE
SLIKTFNIYRWNPDPTSKPRMQSYTLNKTGPMMLDALIRIKNEVDPTLTFRRSCREGICGSC
AMNIDGVNTLACLCPRIPRDAKHETKIYPLPHTYVVKDIPDLTQFYKQYKSIKPYLQHTDPAPEG
KEYLQSKEDRKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKKEERKA
ALDNSMSLYRCHTILNCSRTCPKGLNPGLAIAEIKKEMAF
```

>A.nidulans sdhB

```
MASLRRTSRLVASSRSLFRPATFARSYATVESAQEPAPQMKKFQVYRWNPDKPSEKPKMQTYELD
LKKTGPMMLDALIRIKNEIDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCPRIPTDTTKESRIYP
LPHTYVVKDLVPDLTQIYKQYKSIKPYLQRDTKTEDGLENRQSPEDRKKLDGLYECILCFCSTCS
CPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKTAERKHAIDNSMSVYRCHTILNCTRTPKGLNPA
RAISEIKKMLAAH
```

>A.niger 513.88 sdhB

```
MAALRTSRLFASSKPLFRPGAFSRSYATVDALSQVSASGHASSKTIPEKTSNVQDPSMMLDA
LIRIKNEIDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCPRIPTDTTKESRIYPLPHTYVVKDLV
PDLTQIYKQYKSIKPYLQRDPTADGLENRQSPERKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNSEEY
LGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKAALDNSMSVYRCHTILNCSRTCPKGLNPARAIAEIKKMMT
AH
```

>A.sidowii sdhB

```
MASLRRTSRLVASSRSLFRPATLARSYATVESGIQEPAAKVKKFQVYRWNPDAPEKPKMQTYEL
DLNKTGPMMLDALIRIKNEIDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCPRIPTDTAKE
SRIYPLPHTYVVKDLVPDLTQFYKQYKSIKPYLQRDTKTEDGLENRQSPEDRKKLDGLYECILCACCST
SCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKTEERKHAMDNSMSVYRCHTILNCTRTPKGLNP
ARAIAEIKKMMATH
```

>A.terreus sdhB

```
MSALRTSRLFASSRPLFRPAAFARSYATVEAQSQDPVPSAQPRMKTFFHVYRWNPDKPAEKPTMQ
AYSIDLNKTGPMMLDALIRIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCPRIPTDTAKE
SRIYPLPHTYVVKDLVPDLTQFYKQYKSIKPYLQNDTKPEDGLEQRQSPEDRKKLDGLYECILCA
CCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDLKTAERKAALDNSMSVYRCHTILNCSRTCPK
GLNPARAIAEIKKMAAH
```

>A.flavus128202 sdhB

```
MAALRSTSRLVASSKPLFRPAVFARSYATVDAQAQDPNPSETPRTKTFHIYRWNPDPTEKPKMQ
SYSIDLNKTGPMMLDALIRIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCPRIPTDTAKE
SRIYPLPHTYVVKDLVPDLTQFYKQYKSIKPYLQRETKTEDGLEQRQSPERKKLDGLYECILCA
CCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKHALDNSMSVYRCHTILNCSRTCPK
GLNPARAIAEIKKLMAAH
```

>N.fischeri sdhB

MAALRSTSRVLVASTRPLFRPAVFARSYATVDPATGVGRTGSAEAKVTPETRTSDVQDPNPSQSPR  
IKKFHVYRWNPDQPTEKPKMQTYSLDLNKTGPMLLDALIRIKNEIDPTLTFRRSCREGICGSCAM  
NIDGINTLACLCRIPDTTKQESRIYPLPHTYVVKDLVDPDLTYFYKQYKSIKPYLQRDTKTEDGLE  
HRQSPEDRKKLDGLYECILCACCCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKHAL  
DNSMSVYRCHTILNCSRTCPKGLNPARAIAEIKKMLAAH

>A.brasiliensis sdhB

MAALRTTSRRLFASSKPLFRPAAFARSYATVDALSQVSASGHASSKTVPEKTSNVQDPNPSEQPR  
VKTFHVYRWNPDQPTEKPKMQTYSLDLNKTGPMLLDALIRIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAM  
NIDGVNTLACLCRIPDTTAKESRIYPLPHTYVVKDLVDPDLTYFYKQYKSIKPYLQRDPTADGLE  
NRQSPPEERKKLDGLYECILCACCCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKAAL  
DNSMSVYRCHTILNCSRTCPKGLNPARAIAEIKKMMTAH

>A.glaucus sdhB

MAALRTASRRLFASSRPLFRPAVFARSYATVERDNPTTATGYANPKTVPETQTSVDAEPKPSDDAR  
MKTFFHVYRWNPDQPTEKPKMQSYQLDLNKTGPMLLDALIRIKNELDPTLTFRRSCREGICGSCAM  
NIDGVNTLACLCRIPDETQQSRIYPLPHMYVVKDLVDPDLTHFYKQYKSIKPYLQRDPTEDGLE  
YRQSPEDRKKLDGLYECILCACCCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDERKAERKAAL  
DNSMSVYRCHTILNCSRTCPKGLNPALAIQAIKKELAAP

>A.aculeatus sdhB

MSALRSTSRFLFAASKPLFRPAVFARSYATVDPVAQVSATGHATTSITPESKTSTVQEPTPSEQPR  
IKKFQVYRWNPDTPSEKPKMQTYELDLNKTGPMLLDALIRIKNEIDPTLTFRRSCREGICGSCAM  
NIDGVNTLACLCRIPDTAKDSRIYPLPHTYVVKDLVDPDLTYFYKQYKSIKPYLQRDPTEDGLE  
YRQSPPEERKKLDGLYECILCACCCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWMADSRDEKTAERKAAL  
DNSMSVYRCHTILNCSRTCPKGLNPARAIAEIKKMAAH

>A.versicolor sdhB

MASLRTTSRVLVASSRSLFRPATLARSYATVESGIQEPAPKVKKFQVYRWNPDAPTEKPKMQTYEL  
DLTKTGPMLLDALIRIKNEIDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCRIPDTTAKESRIY  
PLPHTYVVKDLVDPDLTQFYKQYKSIKPYLQRDTKTEDGLENRQSPEDRRKKLDGLYECILCACCCST  
SCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKTEERKHAI DNSMSVYRCHTILNCTRTPKGLNP  
ARAIAEIKKMMATH

>A.wentii sdhB

MSALRSTSRLLIASSRPLFRPAAFARSYATVETAAQEPSPSENPRKTFHVYRWNPDQPTEKPKMQ  
SYQLDLNKTGPMLLDALIRIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCRIPDETTE  
SRIYPLPHTYVVKDLVDPDLTYFYKQYKSIKPYLQRDTKTEDGLEHRQSPEDRRKKLDGLYECILCA  
CCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKQALDNSMSMYRCHTILNCSRTCPK  
GLNPALAIQAIKMLATN

>A.tubigeniis sdhB

MAALRTSRLFASSKPLFRPAAFTRSYATVDALSQVSASGHASSKTIPEKTSNVQDPNPSEQPR  
VKTFHVYRWNPDPTEKPKMQSYSLDLNKTGPMMLDALIRIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAM  
NIDGVNTLACLCRIPDTTAKESRIYPLPHTYVVKDLVDPDLTYFYKQYKSIKPYLQRDPTADGLE  
NRQSPPEERKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKAAL  
DNSMSVYRCHTILNCSRTCPKGLNPARAIAEIKKMMTAH

>A.carbonarius sdhB

MSALRTSRLFASSKPLFRPATFARSYATVDALSQVSASGHASSKTIPEKTSNVQDPTPSEQPR  
TKTFHVYRWNPDPTEKPKMQTYSLDLNKTGPMMLDALIRIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAM  
NIDGVNTLACLCRIPDTTAKESRIYPLPHTYVVKDLVDPDLTYFYKQYKSIKPYLQRETCTEDGLE  
YRQSPPEERKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKAAL  
DNSMSVYRCHTILNCSRTCPKGLNPARAIAEIKKMMASH

>A.fumigatus sdhB

MAALRSTSRVLVASTRPLFRPAVFARSYATVDPATGVGRTGSAEAKVTPETRTSNVQDPSPSQAPR  
IKKFHVYRWNPDKPTEKPKMQTYSLDLNKTGPMMLDALIRIKNEIDPTLTFRRSCREGICGSCAM  
NIDGVNTLACLCRIPDTTKQESRIYPLPHTYVVKDLVDPDLTYFYKQYKSIKPYLQRDCTEDGLE  
NRQSPEDRKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKHAL  
DNSMSVYRCHTILNCSRTCPKGLNPARAIAEIKKMLATH

>Medicago truncatula sdhB

MASTMLKRAINSISSSPTSRLTLLRAHASEAQAQQVSPKARDTTVLKKFQIYRWNPDPSPKPELK  
EYEINLKECGPMVLDALIKIKNDIDPSLTFRRSCREGICGSCAMNIDGCNGLACLTKIPDAGTDS  
TITPLPHMFVIKDLVVDMTNFYNQYKSIIEPWLKRKSPAEEEDGKEIRQSKKDRAKLDGMYECILCA  
CCSTSCPSYWWNPESYLGPAALLHANRWISDSRDEYTKERLEAINDEFKLYRCHTILNCARCPK  
GLNPGKQIAHIKSLQPKA

>Arabidopsis thaliana sdhB

MASGLIGRLVGTKPSKLATVARLIPVRWTSTGAEAEKASSGGGRGSNLKTFQIYRWNPDPNGKP  
ELQNYQIDLKDCGPMVLDALIKIKNEMDPSLTFRRSCREGICGSCAMNIDGCNGLACLTKIQDEA  
SETTITPLPHMFVIKDLVVDMTNFYNQYKSIIEPWLKRKTPASVPAKEILQSKKDRAKLDGMYECI  
LCACFSTSCPSYWWXPESYLGPAALLHANRWISDSRDEYTKERLEAIDDEFKLYRCHTILNCARA  
CPKGLNPGKQITHIKQLQR

>Drosophila melanogaster sdhB

MLATEARQILSRVGSVARNQMRAISNGTAQLEQQAQPKEAQEPQIKKFEIYRWNPDNAGEKPYM  
QTYEVDLRECGPMVLDALIKIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIGGTNTLACISKIDINTSK  
SLKVYPLPHMYVVRDLVDPDMNNFYEQYRNIQPWLQRKNEAGEKKGKAQYLQSVEDRSKLDGLYEC  
ILCACCSTSCPSYWWNAEKYLGPAVLMQAYRWIIDSRSNDAERLNKLDKDPFSVYRCHTIMNCTR  
TCPKGLNPGRAIAEIKKLLSGLASKPAPKLETAALHK

>S.cerevisiae sdhB

MLNVLLRRKAFCLVTKKGMATATTAATHTPRLKTFKVYRWNPDEPSAKPHLQSYQVDLNDGPM  
VLDALLKIKDEQDSTLTFRRSCREGICGSCAMNIGGRNTLACICKIDQNESKQLKIYPLPHMFIV  
KDLVDPDLTNFYQQYKSIQPYLQRSSFPKDGTEVLQSIEDRKKLDGLYECILCACCSTSCPSYWWN

QEQYLGPAVLMQAYRWLIDSRDQATKTRKAMLNNSMSLYRCHTIMNCTRTPKGLNPGLAIAEIK  
KSLAFA

>*A.calidoustus* *sdhB*

MASLRRTSRL LASSRPLFRPATFARTYATVESGVQEPAPKVKKFQVYRWNPDTPSEKPKMQTYEL  
DLNKTGPMMLDALIRIKNEIDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCRIPDTTAKESRIY  
PLPHTYVVKDLVPDLTQFYKQYKSIKPYLQRDTPSEDGLEYRQSPPEERKKLDGLYECILCACCS  
TSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLVDSRDEKTAERKHALDNSMSVYRCHTILNCTRTPKGLNP  
ARAI AEIKKMAAH

>*A.ochraceoroseus* *sdhB*

MAALRSTSRLVAASKPLFRPAAFARSYATVDAGLQEPVPKVKKFQIYRWNPDQPSEKPKMQTYEL  
DLNKTGPMMLDALIRIKNELDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCRIPDTTAKESRIY  
PLPHTYVVKDLVPDLTHFYKQYKSIKPYLQRDTPQTEDALEHRQSPEDRKKLDGLYECILCACCS  
TSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLVDSRDEKTAERKQALDNSMSVYRCHTILNCSRTCPKGLNP  
GRAIAEIKMMASH

>*A.parasiticus* *sdhB*

MAALRSTSRLVASSKPLFRPAVFARSYATVDAAAQDPNPSATPRTKTFHVYRWNPDQPTEKPKMQ  
SYSLDLNKTGPMMLDALIRIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCRIPDTTAK  
ESRIYPLPHTYVVKDLVPDLTQFYKQYKSIKPYLQRETCTEDGLEYRQSPPEERKKLDGLYECILCA  
CCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKHALDNSMSVYRCHTILNCSRTCPK  
GLNPARAIAEIKKMAAH

>*A.bombycis* *sdhB*

MAALRSTSRLVASSKPLFRPAVFARSYATVDAAAQDPNPSETPRTKTFHVYRWNPDQPTEKPKMQ  
SYSLDLNKTGPMMLDALIRIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCRIPDTTAK  
ESRIYPLPHTYVVKDLVPDLTQFYKQYKSIKPYLQRDTPKTEDGLEYRQSPEDRKKLDGLYECILCA  
CCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKHALDNSMSVYRCHTILNCSRTCPK  
GLNPARAIAEIKKLMATH

>*A.oryzae* *sdhB*

MAALRSTSRLVASSKPLFRPAVFARSYATVDAAAQDPNPSETPRTKTFHIYRWNPDQPTEKPKMQ  
SYSLDLNKTGPMMLDALIRIKNEMDPTLTFRRSCREGICGSCAMNIDGVNTLACLCRIPDTTAK  
ESRIYPLPHTYVVKDLVPDLTQFYKQYKSIKPYLQRETCTEDGLEYRQSPPEERKKLDGLYECILCA  
CCSTSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDEKTAERKHALDNSMSVYRCHTILNCSRTCPK  
GLNPARAIAEIKKLMAAH

>*Botrytis cinerea* *sdhB*

MAALRTGARSARAI FAASRP AFRTQMRTMASVDSVPESPTVSPSRPVESASKTSTVKEPAADSE  
SLIKTFNIYRWNPEPTSKPRMQSYTLDLNKTGPMMLDALIRIKNEVDPTLTFRRSCREGICGSC  
AMNIDGVNTLACLCRIPRDAKHETKIYPLPHTYVVKDIVPDLTQFYKQYKSIKPYLQHTDPAPEG  
KEYLQSKEDRKKLDGLYECILCACCS TSCPSYWWNSEEYLGPAILLQSYRWLADSRDQKKEERKA  
ALDNSMSLYRCHTILNCSRTCPKGLNPGLAIAEIKKEMAF

## Παράρτημα II

itz\_2811\_10

GTAGACGCGTTAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAAC  
GGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCAGGGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAATATGAGTAAT  
TTATTCAAACGGTTTGCTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACCACTATTAATTCGAACGCGGGCTAA  
TGTGATTTACTATCATACTTAAAACAATAATTTAATTAATATTAGAATTGTGTAACGTCCCAGCGG  
TGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCGCCAGACTCAGTGGGACTTAGGTGCGAACCAGGACC  
GCAGTGTAGACTCGAAAGATACCGGCAGCGTGGCATTGTGCGAATACAGGATGGGAATGAGAT  
TAGCCGTCAATCGTACCAAACCGGCCGATAAAGATTTGACGGGGAAAGAGTATATTGGCTCTTGGC  
TTGACGCTAGAACTATACCAGAATCATAAGATTACGAGCCCCAACCCTATTAATTCGAACAGCA  
TGTTTTTTTTTGCAGTGCGAATGTTTAAACACACTATATTATCAATACTACTAAAGATAACACATA  
CCAATGCATTTTCGTCTCAAAGAGCCTGAATTTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAG  
CATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCCTGGCCGTCGTTTT  
ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTT  
TCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTA  
TACGTACGGCAGTTTAAAGGTTTACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGT  
ACAGAGTGATATTATTGACACGCCGGGGCGACGGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGC  
TGTCAGATAAAGTCTCCCGTGAACCTTACCCGGTGGTGCATATCGGGGATGAAAGCTGGCCCT

itz\_2811\_16

CCAGAAATCAGGTTAATGGGTTTTGAAGTCATTTTCGCGGTGGCTGGATCAGCCACTTCTTCCCC  
GAAACGGAGACCGGCACTGGCCAATCGGTGGTCATCATGCGCCAGCTTTCATCCCCGATTGCACC  
ACCGGGTAAAGTTTACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGACGTGCACTGGCCAGGGGGATCACCAT  
CCGTGCCCCGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCCACAAACAGACGATAACGGCTCTCTC  
TTTTATAGGTGTAAACCTTAAACTGCCGTACGTATAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCG  
GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTG  
GGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCCGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTTGTAATACGACTC  
ACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGAGTGTGATGGATATCTGC  
AGAATTCAGGGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAATATGAGTAATTTATCAAACGTTTG  
CTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACCACTATTAATTCGAACGCGGCGTAATGTGATTTACTATCAT  
ACTTAAAACAATAATTTAATTAATATTAGAATTGTGTAACCTCCCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAA  
CTAGTGGATCTGACCATCCAGGAGTTGTTGTTCTCGATGAGCTCATCGTCACCCAGGTACCAGG  
GACGGTAGAGTTCGTGACGAGGCCGACGGCGTTCGATCTGCGGGCCCCGATACGAGCCCCAACAC  
TATTAATTCGAACAGCATGTTTTTTTTTGCAGTGCGAATGTTTAAACACACTATATTATCAATACT  
ACTAAAGATAACACATACCAATGCATTTTCGTCTCAAAGAGCCTGAATTCAGCACACTGGCGGCC  
GTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTAACGCGCCTA

Boscalid\_st12

KKCKMTTATAGKKGMMGCGTTAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCC  
ACAGTAACGGCCGCCAGTGWGCTGGAATTCAGGGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAATA  
TGAGTAATTTATTCAAACGTTTGCTTAAGAGATAAGAAAAAAGTGACCACTATTAATTCGAACGC  
GGCGTAATGTGATTTACTATCATACTTAAAACAATAATTTAATTCGCCGAGTTTGAATACGAGCC  
CCAACCCTATTAATTCGAACAGCATGTTTTTTTTTGCAGTGCGAATGTTTAAACACACTATATTA  
TCAATACTACTAAAGATAACACATAACCAATGCATTTTCGTCTCAAAGAGCCTGAATTTCTGCAGATA  
TCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGT  
ATTACAATTCCTGGCCGTCGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTT  
AATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCG  
CCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTATACGTACGGCAGTTTAAAGGTTTACACCTATAAAAGAGAGA



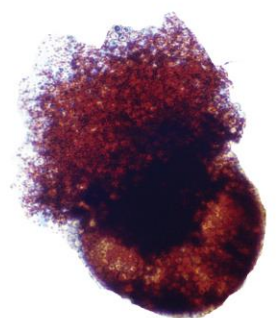
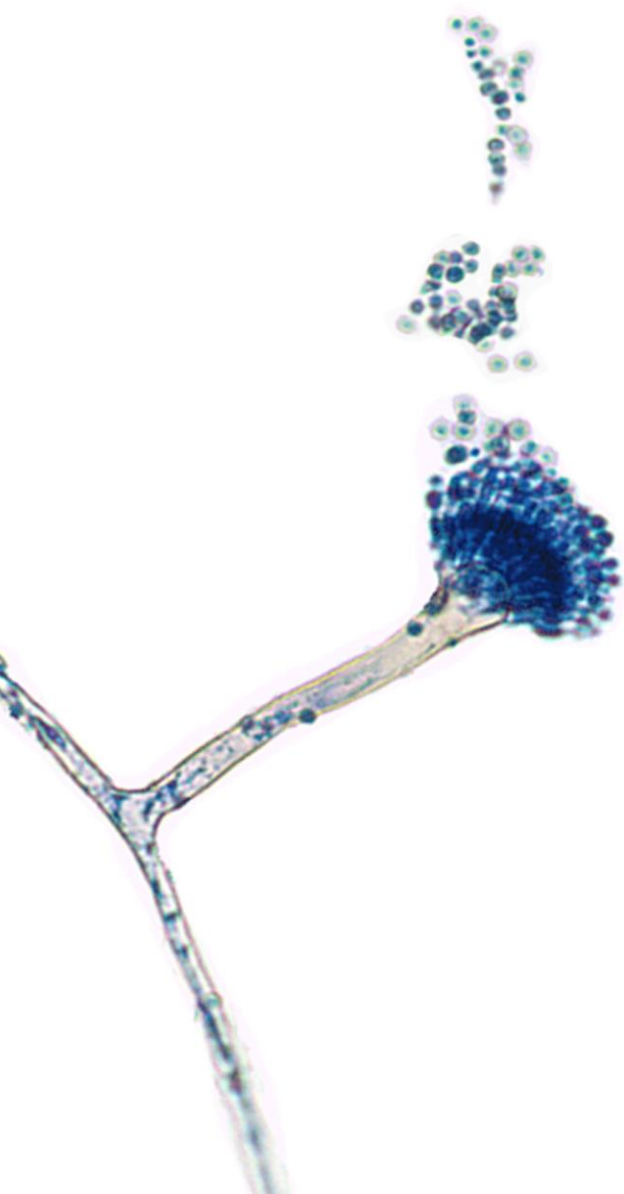
GCCGTTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCGGGGCGACGGATGGTG  
 ATCCCCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTGATGATAAAGTCTCCCGTGAACCTTTACCCGGTGGTGCA  
 TATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATWTGGCCAGTKTGCCGGTCTCCGTTATCG  
 GGGAGAAGTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAAATGACATCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTT  
 TGGGGAATWAAATGTCAGGCATGAAATTATCAAAAAGGATCTTTCMCCTAAATCC

Boscalid\_st21

AGKKGAMGCGTTAGAATACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAA  
 CGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCAGGGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAAATATGGGTAA  
 TTTATTCAAACGGTTTTGCTTAAGAGATAAGAAAAAGTGACCACTATTAATTCGAACGCGGCGTA  
 ATGTGATTTACTATCATAATCTTGCTTTTTTTAGCGTACGAGCCCCAACCCTATTAATTCGAACA  
 GCATGTTTTTTTTGTCAGTGCAGCAATGTTTAAACACACTATATTATCAATACTACTAAAGATAACAC  
 ATACCAATGCATTTTCGTCTCAAAGAGAATTTTTATCTCTTCACGACGAAAAAAAAAGTTTTGCTC  
 TATTTCCAACAACAACAAAAATATGAGTAATTTATTCAAACGGTTTGCTTAAGAGATAAGAAAA  
 AGTGACCACTATTAATTCGAACAGCATGTTTTTTTTGTCAGTGCAGTGAATTCTGCAGATATCCA  
 TCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTTCGTATTA  
 CAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTTAATC  
 GCCTTGCAGCACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCT  
 TCCCAACAGTTGCGCAGCCTATACGTACGGCAGTTTAAAGTTTACACCTATAAAAAGAGAGAGCCG  
 TTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCGGGGCGACGGATGGTGATCC  
 CCCTGGCCAGTGCACGTCTGCTGTGATGATAAAGTCTCCCGTGAACCTTTACCCGGTGGTGCATATC  
 GGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATATGGCCAGTGTGCCGGTCTCCGTTA

Boscalid\_st24

GCCAGCTTTCATCCCCGATTGCACCACCGGGTAAAGTTCACGGGAGACTTTATCTGACAGCAGAC  
 GTGCACTGGCCAGGGGGATCACCATCCGTCGCCCGGGCGTGTCAATAATATCACTCTGTACATCC  
 ACAAACAGACGATAACGGCTCTCTCTTTTATAGGTGTAACCTTAAACTGCCGTACGTATAGGCT  
 GCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGG  
 GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCCGACGTTGTAAAACGA  
 CGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGC  
 GGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCAGGGTTTTGCTCTATTTCCAACAACAACAAAA  
 TATGAGTAATTTATTCAAACGTTTGCTTAAGAGATAAGAAAAAGTGACCACTATTAATTCGAAC  
 GCGGCGTAATGTGATTTACTATCATACTTAAAACAATAATTTAATTGAGAAAAAGTGAACGAGC  
 CCCAACCACTATTAATTCGAACAGCATGTTTTTTTTGTCAGTGCAGCAATGTTTAAACACACTATAT  
 ATCAATACTACTAAAGATAACACATACCAATGCATTTTCGTCTCAAAGAGCCTGAATTCAGCACA  
 CTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGATGCATAGCTTGAGTATTCTAA  
 CGCGCCTA



**ΑΘΗΝΑ 2017**