

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
(Ι.Μ.Β.Β.)

Υπερέκφραση του μεταφορέα $Sng2p$ ή μιας πρωτεΐνης ομολόγου της οικογένειας της αναγωγάσης της γλουταθειόνης προσφέρει ανθεκτικότητα σε κερκοσπορίνη και άλλους φωτοενεργοποιητές στον *Saccharomyces cerevisiae*

Εργασία Μεταπτυχιακού Τίτλου Ειδίκευσης
Φωτεινή Δαβράζου

Υπεύθυνος καθηγητής : Νικόλαος Πανόπουλος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 1998

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή Ν. Πανόπουλο για την ευκαιρία που μου έδωσε να έρθω σε επαφή με το παρόν αντικείμενο. Επίσης ευχαριστώ τον ερευνητή Φ. Βερβερίδη για την πολύτιμη καθοδήγησή του στον τρόπο σκέψης και πειραματικής εφαρμογής καθ' όλο το διάστημα της εκτέλεσης της παρούσας εργασίας καθώς και τον ερευνητή Γ. Διαλλινά για τις εξίσου πολύτιμες συμβουλές του. Τέλος ευχαριστώ τον αδελφό μου για την πολύτιμη βοήθειά του στη χρήση του υπολογιστή και τους γονείς μου για την υποστήριξη και την κατανόηση που δείχνουν ως προς τις επιθυμίες μου.

Οκτώβριος 1998

Η εργασία αυτή αποτελεί το κύριο μέρος επιστημονικού άρθρου που έχει σταλεί (Οκτώβριος 1998) προς δημοσίευση στο περιοδικό *Molecular Microbiology* με τίτλο "Overexpression of either the SNQ2 transporter or a homologue of the glutathione reductase family confers resistance to cercosporin and other photosensitizers in *Saccharomyces cerevisiae*"

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	σελ.1
II. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ.2
1. Κερκοσπορίωση : συμπτώματα-περιγραφή-βιολογία-οικονομική σημασία.	σελ.2
2. Επιλογή συστήματος-μοντέλου του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> για τη μελέτη της αυτοπροστασίας από την κερκοσπορίνη.	σελ.8
3. FAD-εξαρτώμενες δισουλφιδικές οξειδοαναγωγάσες.	σελ.12
4. Πρωτεΐνες μεμβρανικοί μεταφορείς στον <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : υπερικογενείες μεταφορέων MFS και ABC.	σελ.14
a) Μεταφορείς MFS (Major Facilitator Superfamily transporters).	σελ.14
b) Μεταφορείς ABC (ATP-Binding Cassette transporters).	σελ.17
5. Το γονίδιο PDR5.	σελ.19
6. Το γονίδιο SNQ2.	σελ.20
7. Οι μεταγραφικοί παράγοντες PDR1 και PDR3.	σελ.22
8. Το γονίδιο HOL1.	σελ.24
9. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> για μετασηματισμό δικοτυλήδων φυτών-Μοριακός μηχανισμός.	σελ.24

III. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

σελ.29

1. Βακτηριακά στελέχη <i>Escherichia coli</i> και <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	σελ.29
2. Μυκητιακά στελέχη <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	σελ.29
3. Πλασμιδιακοί φορείς-κατασκευές.	σελ.30
4. Κατασκευές της παρούσας εργασίας.	σελ.32
5. Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης.	σελ.33
6. Γενικές μέθοδοι.	σελ.35
a) Μικρής κλίμακας αλκαλική απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i> .	σελ.35
b) Μεσαίας κλίμακας αλκαλική απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i> .	σελ.36
c) Μετασηματισμός δεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων <i>Escherichia coli</i> .	σελ.36
d) Μετασηματισμός κυττάρων ζύμης.	σελ.36

e) Μέτρηση της ενεργότητας β -γαλακτοσιδάσης σε καλλιέργεια ζύμης-ποσοτικός προσδιορισμός (lacZ assay).	σελ.37
f) Επιβοηθούμενη τριμερής βακτηριακή σύζευξη (triparental conjugation).	σελ.38
g) Έλεγχος σταγόνων διαδοχικής αραίωσης (spot test).	σελ.38
h) Σύνδεση μεταξύ συμπληρωματικών άκρων DNA (ligation of cohesive termini).	σελ.39
i) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR=Polymerase Chain Reaction).	σελ.39
j) Επαγωγή γονιδίων στη ζύμη μετά από επίδραση φαρμάκου.	σελ.39
k) Απομόνωση ολικού RNA ζύμης με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης (hot acid phenol protocol).	σελ.40
l) Υβριδισμός Northern (Northern hybridization)	σελ.40
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ.42
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ.57
VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1	σελ.61
VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2	σελ.65
VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.66

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτοπαθογόνα είδη του γένους *Cercospora* παράγουν κερκοσπορίνη, μία φωτοενεργοποιούμενη τοξίνη η οποία έχει πρωτεύοντα ρόλο στην ικανότητα αυτών των μυκήτων να προσβάλουν υψηλής οικονομικής σημασίας φυτά. Η κερκοσπορίνη ανήκει σε μία κατηγορία ποικιλόμορφων χημικών ενώσεων και μεταβολικών προϊόντων γνωστών ως φωτοενεργοποιητές (photosensitizers), οι οποίες είναι ικανές να απορροφούν την ενέργεια του φωτός και να διεγείρουν το μοριακό οξυγόνο, παράγοντας έτσι εξαιρετικά κυτταροτοξικά παράγωγα οξυγόνου, όπως υπεροξειδίο (O_2^- , superoxide radical) και οξυγόνο "εν τω γεννάσθαι" (1O_2 , singlet oxygen). Ελάχιστες είναι οι γνώσεις που έχουμε μέχρι σήμερα για τους μοριακούς μηχανισμούς που εξηγούν την ικανότητα των ειδών *Cercospora* και άλλων μυκήτων να επιβιώνουν σε τοξικές συγκεντρώσεις κερκοσπορίνης. Στην εργασία αυτή ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται ως σύστημα - μοντέλο για την ταυτοποίηση και κλωνοποίηση γονιδίων των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν στην αποτοξίνωση από την κερκοσπορίνη. Έτσι λοιπόν δύο γονίδια υπερέκφρασμα από πλασμιδιακές κατασκευές πολλαπλών αντιγράφων, επέφεραν ανθεκτικότητα απέναντι στην κερκοσπορίνη σε στελέχη του σακχαρομύκητα. Το ένα γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Snq2p, η οποία είναι ένας χαρακτηρισμένος εξαγωγέας πολλαπλών τοξικών φαρμάκων (MDR, MultiDrug Resistance), και ανήκει στην οικογένεια των ABC μεταφορέων (ATP Binding Cassette transporters). Το άλλο γονίδιο, ένα μέχρι τώρα μη ταυτοποιημένο ORF, είναι το *YNR074c* και κωδικοποιεί μία μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία έχει σημαντική ομολογία με αναγωγάσες της οικογένειας των FAD - επαγόμενων δισουλφιδικών οξειδοαναγωγασών. Υπερέκφραση οποιουδήποτε από τα δύο αυτά γονίδια έχει σαν αποτέλεσμα την παροχή ανθεκτικότητας και σε άλλους φωτοενεργοποιητές. Η εμπλοκή μιας μεμβρανικής αναγωγάσης και ενός εξαγωγέα πολλαπλών τοξινών στην αποτοξίνωση του σακχαρομύκητα είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα που υποδείκνυαν ότι ανθεκτικότητα των ειδών *Cercospora* στην κερκοσπορίνη επιτυγχάνεται με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει αναγωγή της τοξίνης στις αναπτυσσόμενες μυκηλιακές υφές.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κερκοσπορίωση : συμπτώματα - περιγραφή - βιολογία - οικονομική σημασία

Πρόκειται για ασθένεια των φυτών που προξενείται από τα είδη του γένους *Cercospora* της οικογένειας των *Dermatiaceae* ατελών μυκήτων. Τα είδη *Cercospora* προσβάλλουν ένα ευρύ φάσμα καλλιεργούμενων φυτών μεγάλης οικονομικής σημασίας. Τα είδη αυτά εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς το καλλιεργούμενο φυτικό είδος που παρασιτούν. Έτσι η *Cercospora beticola* προσβάλλει το σαχαρότευτλο (sugar beet), το είδος *Cercospora kikuchii* προσβάλλει τη σόγια (soybean), το *Cercospora nicotiana* τον καπνό (tobacco). Επιπλέον, το καλαμπόκι (corn), το καφεόδεντρο (coffee), η μπανανιά (banana) και η φυστικιά (peanut) συμπεριλαμβάνονται στην κατηγορία των φυτών που προσβάλλονται από το γένος *Cercospora*.

Η μόλυνση του ζαχαρότευτλου ξεκινά από ένα κονίδιο που βλαστάνει επάνω στο φύλλο όταν υπάρχει υγρασία και ζέστη (θερμοκρασία $>17^{\circ}\text{C}$, άριστη 27°C). Το νηματοειδές μυκήλιο εισέρχεται στο εσωτερικό του φύλλου από το άνοιγμα ενός στοματίου και ο μύκητας αναπτύσσεται στο εσωτερικό του παρεγχύματος. Μερικές μέρες μετά τη μόλυνση εκδηλώνεται η ασθένεια με την εμφάνιση στο έλασμα των φύλλων πολυάριθμων κυκλικών γκριζών κηλίδων με κοκκινωπό ή καστανό περιθώριο (εικ.1). Εφ' όσον ο καιρός συνεχίζει να είναι υγρός, στο κέντρο της κηλίδας εμφανίζονται μαύρα στίγματα και γκριζό χνούδι που αντιστοιχούν στους κονιδιοφόρους και στα κονίδια του μύκητα, όργανα αναπαραγωγής.

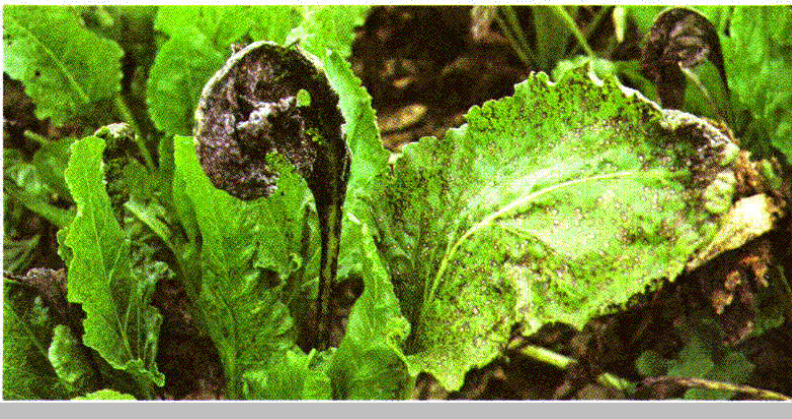


Εικ.1. Φύλλο ζαχαρότευτλου που έχει

Βαθμιαία, με την πρόοδο της προσβολής, οι κηλίδες πολλαπλασιάζονται και προκαλούν την πλήρη ξήρανση των προσβεβλημένων φύλλων (εικ.2). Τα λίγα φυτά που παρουσιάζουν τα πρώτα συμπτώματα λειτουργούν σαν εστίες, τα κονίδια

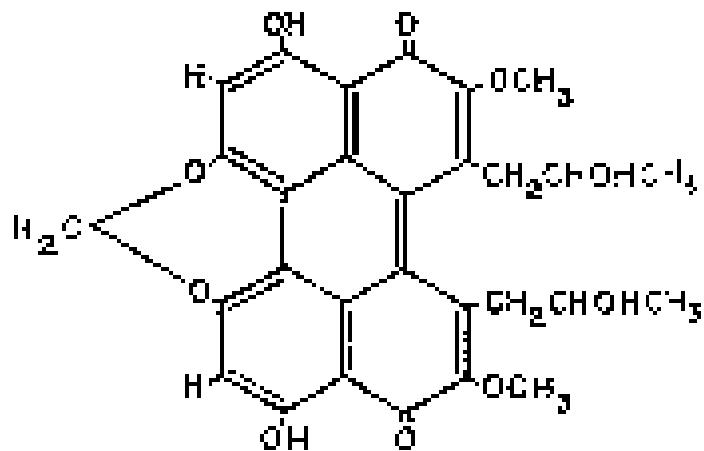
μεταφέρονται με τη βροχή και στα γειτονικά φυτά και έτσι η ασθένεια εξαπλώνεται σ' ολόκληρη την καλλιέργεια.

Σε ισχυρές προσβολές ολόκληρο το φύλλωμα προσβάλλεται και καταστρέφεται. Το φυτό αντιδρά δίνοντας νέο φύλλωμα, το οποίο μπορεί με τη σειρά του να καταστραφεί. Η ξήρανση του φυλλώματος και οι διαδοχικές αναβλαστήσεις μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές απώλειες σε βάρος και ζημιές που μπορεί να φτάσουν στο 40-50% της παραγωγής ζαχάρου στην Ελλάδα (Ελληνική Βιομηχανία Ζάχαρης Α.Ε.).



Εικ.2. Κατεστραμένο φύλλο ζαχαρότευτλου λόγω της ασθένειας της κερκοσπορίωσης

Τα είδη της *Cercospora* θεωρούνται ως μία αρκετά επιτυχημένη ομάδα μυκήτων. Την ικανότητά τους αυτή να παρασιτούν σε διάφορα είδη φυτών οικονομικής σημασίας οφείλουν κυρίως σε μία κόκκινη βιολογικά φωτοεπαγόμενη (photoinduced) και φωτοενεργοποιούμενη (photoactivated) πολυκετιδική λιποδιαλυτή τοξίνη, την κερκοσπορίνη (cercosporin) (σχ.1).

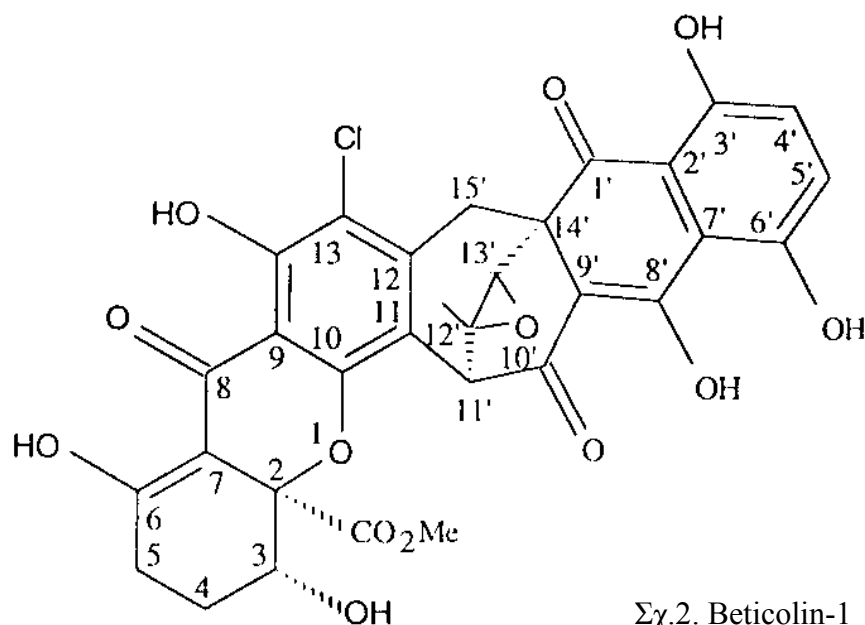


Σχ.1. Ενεργός κερκοσπορίνη

Η τοξική δράση της κερκοσπορίνης είναι γενική (non-host specific toxin) και εκδηλώνεται σε κύτταρα βακτηρίων, μυκήτων, φυτών, ποντικών, ακόμα και ανθρώπινων καρκινικών.

Η κερκοσπορίνη ανήκει σε μία κατηγορία μορίων που ονομάζονται φωτοενεργοποιητές (photosensitizers). Παρουσία φωτός οι κετιδικές ομάδες της τοξίνης απορροφούν την ενέργεια του φωτός και μεταθέτουν το μόριο της κερκοσπορίνης σε μία ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση. Κατόπιν αποδίδουν την επιπλέον αυτή ενέργεια μαζί και ηλεκτρόνια οξειδώνοντας το μοριακό οξυγόνο (O_2) και έτσι σχηματίζονται τα δραστικά παράγωγα «οξυγόνο εν τω γεννάσθαι» 1O_2 (singlet oxygen) και υπεροξειδίο $\cdot O_2^-$ (superoxide radical). Το κύριο προϊόν (dominant species) είναι το 1O_2 (nonradical species) και παράγεται με μηχανισμό άμεσης μεταφοράς ενέργειας (τύπος II μεταφοράς ενέργειας) ενώ το $\cdot O_2^-$ παράγεται μέσω οξείδωσης ενδιάμεσου υποστρώματος (τύπος I μεταφοράς ενέργειας). Επειδή οι ρίζες αυτές είναι πολύ δραστικές αλλά ταυτόχρονα και ασταθείς, δίνουν γρήγορα την ενέργειά τους, αντιδρώντας με άλλα μόρια, στον τόπο παραγωγής τους και μετατρέπονται σε πιο σταθερές δομές. Αποδέκτες της ενέργειας είναι διάφορα κυτταρικά συστατικά όπως λιπαρά οξέα, σάκχαρα, πρωτεΐνες (κυρίως προσβάλλονται τα αμινοξέα κυστεΐνη, ιστιδίνη, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη), και νουκλεϊκά οξέα (κυρίως η γουανίνη), τα οποία και οξειδώνονται. Έτσι επέρχεται ο κυτταρικός θάνατος λόγω καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών, απενεργοποίησης των ενζύμων και βλαβών στο DNA. Το κυτταρικό συστατικό που θα αποτελέσει το στόχο της δράσης εξαρτάται κάθε φορά από τη θέση μέσα στο κύτταρο στην οποία βρίσκεται ο φωτοενεργοποιητής. Η κερκοσπορίνη ως σχετικά μικρό και λιποδιαλυτό μόριο εύκολα διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα και το πλασμαλήμμα. Μελέτες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου της λεπτής υπερδομής φυτικών ιστών που έχουν προσβληθεί από *Cercospora* έχουν δείξει ότι η δράση της κερκοσπορίνης εντοπίζεται στις μεμβράνες (Daub & Briggs, 1983), κυρίως στο πλασμαλήμμα, τον τονοπλάστη αλλά και σε μεμβράνες που συνδέονται με οργανίδια τις οποίες και εκφυλίζει (Steinkamp et al., 1981). Η δράση της κερκοσπορίνης έχει σαν αποτέλεσμα ταχεία διαρροή ιόντων από το φυτικό κύτταρο και τελικά το θάνατο. Μια υπόθεση θεωρεί ότι η διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης έχει σαν αποτέλεσμα την παροχή θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη και τη σπορίωση του μύκητα που παρασιτεί στο φυτό-ξενιστή (Daub & Ehrenschaft, 1993).

Εκτός από την κερκοσπορίνη όμως, η *Cercospora beticola* παράγει και μία ομάδα άλλων τοξικών ουσιών που ονομάζονται Cercospora Beticola Toxins (CBT) ή beticolins και αποτελούνται από οκτακυκλικό σκελετό και ένα άτομο χλωρίου (κύριοι αντιπρόσωποι οι beticolin-1 και beticolin-2) (σχ.2). Σχηματίζουν δραστικό σύμπλοκο με δύο Mg^{2+} και έτσι παρεμποδίζουν τη δράση ενζύμων που χρησιμοποιούν Mg^{2+} ως συνυπόστρωμα (Simon-Plas et al, 1996). Η αλληλεπίδραση αυτή σχετίζεται άμεσα με την ενεργότητα της ATPase (H^+ -ATPase) και συνεπώς τη μεταφορά H^+ και την πρόσληψη K^+ . Πρόκειται για κίτρινες χρωστικές, φωτοενεργοποιούμενες τοξίνες για τα ανώτερα φυτά και με αντιβιοτική δράση για πολλά είδη βακτηρίων. Πιθανόν η δράση τους να είναι παρόμοια με αυτήν της κερκοσπορίνης. Επίσης, μπορούν να δεσμεύσουν και άλλα, βιολογικής σημασίας, μεταλλικά ιόντα, όπως Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} και Fe^{3+} (Jalal et al, 1992; Simon-Plas, 1996). Εν τούτοις φαίνεται ότι η κερκοσπορίνη είναι εκείνη η οποία παίζει το σημαντικότερο ρόλο στην άμεση εκδήλωση της ασθένειας της κερκοσπορίωσης (Daub, 1982). Στην άποψη αυτή



Σχ.2. Beticolin-1

συνηγορεί και το γεγονός ότι μεταλλαγμένα στελέχη της *Cercospora* έχουν χάσει την ικανότητα μαζικής παραγωγής κερκοσπορίνης δεν είναι παθολόγνα και απαιτείται υψηλής έντασης φωτισμός για εμφάνιση φυσιολογικών συμπτωμάτων της ασθένειας (Ehrenshaft & Urchurch, 1991).

Στην κατηγορία των φωτοενεργοποιητών ανήκουν και φυσικές κυτταρικές χρωστικές όπως οι χλωροφύλλες, η ριβοφλαβίνη, οι πορφυρίνες αλλά και μη φυσικές

χρωστικές όπως το κυανούν του μεθυλενίου (methylene blue), το μπλε του τολουιδινίου (toluidin blue), το ροζ της Βεγγάλης (rose bengal) η εοσίνη Y (eosin Y) και το πορτοκαλί της ακριδίνης (acridine orange). Τα κύτταρα που παράγουν τους φυσικούς φωτοενεργοποιητές έχουν αναπτύξει και κατάλληλους μηχανισμούς αυτοάμυνας [συνθέτουν σβεστικές ουσίες (quenchers) π.χ. καροτενοειδή ή διαθέτουν κατάλληλα εκείνα βιολογικά συστήματα - ένζυμα αναγωγής] απέναντι στα δραστικά παράγωγα οξυγόνου.

Η επίδραση φωτός στην *Cercospora* είναι πολύ σημαντική για την παραγωγή της κερκοσπορίνης. Οι καλλιέργειες της *Cercospora* που αναπτύσσονται παρουσία φωτός εμφανίζουν συσσώρευση κερκοσπορίνης 100 φορές μεγαλύτερη από αυτές που αναπτύσσονται στο σκοτάδι και σε επίπεδα παρόμοια με αυτά καροτενοειδών σε φωτιζόμενες καλλιέργειες μυκηλίων *Neurospora crassa* (Goodwin, 1980; Lynch & Geoghegan, 1979; Tan, 1979). Και οι δύο αυτές διαδικασίες ενεργοποιούνται από μικρής διάρκειας παλμούς μπλε μήκους κύματος και χαμηλής έντασης. Το φάσμα ενεργοποίησης για τη βιοσύνθεση της κερκοσπορίνης μοιάζει πολύ με αυτό που απορροφά η κερκοσπορίνη (Lynch & Geoghegan, 1979). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η τοξίνη δρα ως φωτοϋποδοχέας για την ίδια της τη σύνθεση η οποία περιλαμβάνει ένα υψηλά εξελιγμένο (highly evolved) ρυθμιστικό σύστημα. Έτσι η κερκοσπορίνη θα συντεθεί μόνο κάτω από συνθήκες που θα της επιτρέψουν να βρεθεί σε ενεργό μορφή (Daub & Ehrenschaft 1993).

Οι μόνοι γνωστοί οργανισμοί που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην κερκοσπορίνη είναι λίγα βακτήρια, τα είδη του γένους *Cercospora* κάποιοι μύκητες που παράγουν παρόμοιες τοξίνες, καθώς και μία άγρια ποικιλία ρυζιού (Batchvarova et al, 1992). Τα είδη του γένους *Cercospora* συγκεντρώνουν την κερκοσπορίνη σε επίπεδο περίπου 1mM (δηλαδή, 1000 φορές υψηλότερη συγκέντρωση απ' αυτή που είναι θανατηφόρα για την πλειοψηφία των άλλων οργανισμών) και ενώ τα κύτταρα είναι ακόμα ενεργά διαιρούμενα παρουσία φωτός. Η επικρατέστερη υποθετική εξήγηση σήμερα είναι ότι τα είδη *Cercospora* καταφέρνουν και προστατεύονται από την κερκοσπορίνη με αντιστρεπτή απενεργοποίηση ανάγοντας το μόριό της (αναγωγή των κετιδικών ομάδων σε υδροξύλια) και καθιστώντας το ανενεργό αφού δε μπορεί να απορροφήσει πλέον την ενέργεια του φωτός. Στην υπόθεση αυτή συνεισφέρει και η γνώση ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *C. nicotianae* που είναι ευαίσθητα στην τοξίνη, δεν έχουν τη δυνατότητα να την ανάγουν (Jenns & Daub, 1995). Η ανενεργός κερκοσπορίνη εκπέμπει πράσινο φθορίζον χρώμα, βρίσκεται στις υφές του μύκητα,

είναι ελαφρά φωτοενεργοποιούμενη (απορροφά τη μισή ποσότητα φωτός) και μη τοξική (Daub et al, 1992). Κατόπιν η οξειδωση της ανενεργού ανηγμένης μορφής της κερκοσπορίνης συμβαίνει αυθόρμητα, με την εξαγωγή της τοξίνης μακριά από τις υφές του μύκητα, χωρίς να απαιτείται κάποιος εξειδικευμένος μηχανισμός επανενεργοποίησης (Daub et al, 1992). Κρύσταλλοι της ενεργού μορφής της κερκοσπορίνης εκπέμπουν κόκκινο φθορίζον χρώμα και συγκεντρώνονται στο θρεπτικό υλικό κατά τη διάρκεια της αύξησης του μύκητα στην καλλιέργεια (Daub et al, 1992).

Έχει παρατηρηθεί, ότι γενικότερα τα είδη του γένους *Cercospora* είναι ανθεκτικά απέναντι σε πολλούς φωτοενεργοποιητές υπεύθυνους για την παραγωγή $^1\text{O}_2$ εκτός από την κερκοσπορίνη όπως την αιματοπορφυρίνη (hematoporphyrin), το μπλε του μεθυλενίου (methylen blue), το μπλε του τολουιδινίου (toluidine blue) και την εοσίνη Y (eosin Y), όχι όμως και στο ροζ της Βεγγάλης αν και έχει παρόμοια δομή με την εοσίνη Y (Daub & Ehrenshaft 1993). Ελάχιστες είναι οι γνώσεις ως προς τους μοριακούς μηχανισμούς αυτοπροστασίας του μύκητα. Πρόσφατα απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε το γονίδιο *SORI* (Singlet Oxygen Resistance) της *C. nicotianae* το οποίο αποκαθιστά την ανθεκτικότητα μεταλλαγμένων στελεχών του μύκητα σε κερκοσπορίνη και 5 άλλους φωτοενεργοποιητές (hematoporphyrin, rose bengal, eosin Y, methylen blue, toluidine blue). Σε αντίθεση όμως με την υπόθεση ότι η ανθεκτικότητα είναι αποτέλεσμα αναγωγής, το *SORI* δεν εμφανίζει ομολογία με κανένα γονίδιο αναγωγής. Το εντυπωσιακό στοιχείο της υπόθεσης είναι ότι αν και η ανθεκτικότητα σε κερκοσπορίνη και $^1\text{O}_2$ είναι περιορισμένη σε λίγους οργανισμούς, συγκρίνοντας τη *Sor1p* με αλληλουχίες πρωτεϊνών που είναι κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων, αποκαλύφθηκε ότι εμφανίζει υψηλή ομολογία με προϊόντα μη ταυτοποιημένων ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης (ORFs) από τα αρχαιοβακτήρια, ευβακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα (Ehrenshaft et al, 1998).

Ακόμα η ανθεκτικότητα στην κερκοσπορίνη και στο $^1\text{O}_2$ δεν έχει σχέση με την παρουσία καρτενοειδών στην *C. nicotianae* όπως απέδειξαν μελέτες σε μεταλλαγμένα στελέχη του μύκητα όπως επίσης δε σχετίζεται με τη σύσταση της μεμβράνης σε λιπαρά οξέα, την παρουσία αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως αναγωγή του υπεροξειδίου (SOD=SuperOxide Dismutase), καταλάση (catalase) και υπεροξειδάσες (peroxidases) (Ehrenshaft et al, 1995).

Επιλογή συστήματος – μοντέλου του *Saccharomyces cerevisiae* για τη μελέτη της αυτοπροστασίας από την κερκοσπορίνη

Ο *Saccharomyces cerevisiae* θεωρείται ως το καλύτερο σύστημα - μοντέλο για τη μελέτη ομολόγων γονιδίων διαφόρων ευκαρυωτικών συστημάτων για διάφορους λόγους αλλά κυρίως λόγω της γνώσης ολόκληρου του γονιδιώματός του. Έτσι και στην περίπτωση της μελέτης γονιδίων που θα μπορούσαν να προσφέρουν ανθεκτικότητα στην τοξίνη κερκοσπορίνη χρησιμοποιείται ως οργανισμός αναφοράς. Το 1991 οι Ehrenshaft & Urchurh δημιούργησαν μεταλλαγμένα (UV) στελέχη *C. nicotiana* που ήταν ευαίσθητα στην κερκοσπορίνη. Κατόπιν με την τεχνική του αφαιρετικού υβριδισμού (subtractive hybridization strategy) χρησιμοποιώντας μια cDNA βιβλιοθήκη από στέλεχος άγριου τύπου και από μεταλλαγμένο στέλεχος απομονώθηκαν 6 cDNA κλώνοι (*cLE1*, *cLE3-7*) (Ehrenshaft & Urchurh 1991). Μελετώντας την πορεία συσσώρευσης της κερκοσπορίνης σε αγρίου τύπου στέλεχος *C. kikuchii* που μεγάλωνε παρουσία φωτός σε χρονικό διάστημα πέντε ημερών και συγκρίνοντάς την με τη συσσώρευση των ήδη απομονωμένων 6 cDNA κλώνων, παρατηρήθηκε ότι αυτή συμπίπτει με την παραγωγή των μεταγραφικών προϊόντων *cLE6* και *cLE7* τα οποία όπως και η κερκοσπορίνη αυξάνονται σημαντικά μεταξύ της δεύτερης και της τρίτης ημέρας (Ehrenshaft & Urchurh 1991).

Αντίστοιχα αποτελέσματα μελέτης μεταλλαγμένων στελεχών *C. kikuchii* αποκαλύπτουν ότι όταν υπάρχει πλήρης καταστολή της σύνθεσης της κερκοσπορίνης (κατώφλι ανιχνεύσιμης καταστολής τα 5nmol κερκοσπορίνης) η μεταγραφική δραστηριότητα για την παραγωγή των 6 cDNA κλώνων είναι περιορισμένη αλλά όχι μηδενική. Αν όμως κάποιο από αυτά τα γονίδια σχετίζονταν άμεσα με την παραγωγή κερκοσπορίνης, θα περιμέναμε αυτή η πλήρης καταστολή της σύνθεσης της τοξίνης να συνοδεύεται από μεγαλύτερης έκτασης ελάττωση της μεταγραφικής δραστηριότητας των γονιδίων που σχετίζονται με την ενεργοποίηση της βιοσύνθεσής της. Συνεπώς οι 6 cDNA κλώνοι μάλλον σχετίζονται κάπως με το γενικότερο μεταβολισμό της τοξίνης ή ακόμα μπορεί να παίζουν ρόλο σε άλλες σχετικές διαδικασίες όπως τη μετάδοση σήματος με το φως (light-signal transduction) ή την ανθεκτικότητα του ίδιου του μύκητα (self-resistance) στην κερκοσπορίνη (Ehrenshaft & Urchurh 1991).

Λόγω των παραπάνω συσχετίσεων παραγωγής κερκοσπορίνης - συσσώρευσης *cLE6* mRNA, τόσο το γονίδιο *LE6* όσο και οι παρακείμενες αλληλουχίες

κλωνοποιήθηκαν και μελετήθηκε η αλληλουχία τους. Βρέθηκε λοιπόν ότι το γονίδιο *LE6* είναι συντηρημένο σε όλα τα είδη του γένους *Cercospora*. Μεταλλάξεις (disruptions) του *cLE6* δεν είναι θνησιγόνες για το μύκητα αλλά του προκαλούν ευαισθησία σε εξωγενή προσθήκη κερκοσπορίνης (Urchurch abstract, A. Phytopath. Society meeting, 1996). Το προϊόν του *cLE6* γονιδίου είναι μία πρωτεΐνη η οποία δεν εμφανίζει ομολογία με κάποια πολυκετιδική συνθετάση, που θα μπορούσε να είναι συνθετάση της κερκοσπορίνης, αλλά με δύο άλλες πρωτεΐνες.

Η πρώτη είναι το προϊόν του γονιδίου *ToxA* του φυτοπαθογόνου μύκητα *Cochliobolus carbonum*, μια υδρόφοβη πρωτεΐνη 58kDa με 10-13 διαμεμβρανικές περιοχές. Εμφανίζει υψηλή ομολογία (similarity) με κάποιες από τις πρωτεΐνες της ομάδας των MFS (Major Facilitator Superfamily) μεταφορέων και έχει προταθεί η άποψη ότι πρόκειται για μια αντλία (toxin pump) της HC-τοξίνης (Host-selective Cyclic tetrapeptide) παρέχοντας έτσι προστασία στον ίδιο το μύκητα και / ή σχετίζεται με την έκκρισή της στο εξωκυττάριο περιβάλλον (Pitkin et al, 1996).

Η άλλη πρωτεΐνη, με την οποία το προϊόν του *cLE6* κλώνου εμφανίζει 40-60% ομολογία (identity), είναι το προϊόν του γονιδίου *SGE1* του *Saccharomyces cerevisiae*. Το γονίδιο *SGE1* αρχικά αναγνωρίστηκε ως καταστολέας του φαινότυπου αδυναμίας χρησιμοποίησης της γαλακτόζης ως πηγής άνθρακα (Gal⁻ φαινότυπος) από στέλεχος ζύμης που φέρει την *gal11* μεταλλαγή (*SGE1* = Suppresses Gal Eleven) (Amakasu et al, 1993). Το εν λόγω στέλεχος ζύμης με απωλεσθείσα λειτουργικότητα του *SGE1* εμφανίζει πλειοτροπικό φαινότυπο. Εκτός δηλαδή από την αδυναμία μεταβολισμού της γαλακτόζης, εμφανίζει α -στειρότητα και αργή ανάπτυξη σε μη μεταβολιζόμενες πηγές άνθρακα (γλυκερόλη και lactate). Αυτοί οι φαινότυποι δεν αποκαθίστανται μετά την έκφραση του *SGE1* γονιδίου (Amakasu et al, 1993). Μία πρώτη υπόθεση για τη λειτουργικότητα της Sge1p ήταν ότι αλληλεπιδρά με τη Gal4p φτιάχνοντας ένα σύμπλοκο που δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής της έκφρασης ορισμένων *GAL* γονιδίων (όπως π.χ. του *GAL1* που κωδικοποιεί για τη γαλακτοκινάση, του *GAL2* που κωδικοποιεί για την περμεάση της γαλακτόζης κ.α.) όταν λείπει η Gal11p (Amakasu et al, 1993). Το προϊόν του *SGE1* (Sge1p) όμως ταυτοποιήθηκε και βρέθηκε ότι πρόκειται για πρωτεΐνη με 543 αμινοξικά κατάλοιπα με ασυνήθιστα υψηλή υδροφοβικότητα (59.3%) πράγμα το οποίο δημιουργεί υποψία για παρουσία της μάλλον στο εσωτερικό της μεμβράνης (Amakasu et al, 1993). Μια άλλη, έμμεση, προσέγγιση του θέματος οδήγησε στην αναγνώριση του ίδιου γονιδιακού προϊόντος να προσδίδει ανθεκτικότητα σε crystal violet και πιθανά σε

βρωμιούχο αιθύδιο ιδίως όταν βρίσκεται σε υψηλό αριθμό αντιγράφων (Ehrenhofer-Murray et al, 1994). Επίσης παρατηρήθηκε ομολογία (identity) του προϊόντος του *SGE1* γονιδίου με την πρωτεΐνη του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης *YCL069w* μέλος της MFS υπερικογένειας στον *Saccharomyces cerevisiae* αλλά και με άλλα γονιδιακά προϊόντα που προσφέρουν ανθεκτικότητα σε φάρμακα στον *Streptomyces rimosus (tetA)*, *Staphylococcus aureus (norA)*, *Bacillus subtilis (mmr)* και *Nocardia lactamdurans (cmcT)* (Ehrenhofer-Murray et al, 1994).

Τα στοιχεία αυτά επέτρεψαν την κατάταξη του *SGE1* γονιδιακού προϊόντος στην οικογένεια των πρωτεϊνών που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε φάρμακα (MDR = MultiDrug Resistance proteins) της υπερικογένειας MFS. Συνεπώς η Sge1p θα πρέπει να λειτουργεί σαν περμεάση εξόδου (export permease) σε αναλογία με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας (Ehrenhofer-Murray et al, 1994). Εν τούτοις θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι πιθανά η Sge1p λειτουργεί παράλληλα και για την είσοδο της γαλακτόζης στο κύτταρο. Ενδοκυτταρική αύξηση της συγκέντρωσης της γαλακτόζης, λόγω της υπερέκφρασης του *SGE1*, μπορεί να οδηγεί έμμεσα στην αύξηση της έκφρασης των εξαρτώμενων από την Gal4p γονιδίων που ενεργοποιούνται από γαλακτόζη π.χ. με έναν μετα-μεταγραφικό ρυθμιστικό μηχανισμό, και κατά συνέπεια την αποκατάσταση της ικανότητας χρησιμοποίησής της ως πηγή άνθρακα (Ehrenhofer-Murray et al, 1994).

Σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης – σχέσης της κερκοσπορίνης με την Sge1p υπήρξε το στέλεχος YAE65 του *S. cerevisiae*. Το στέλεχος αυτό εμφανίζει απώλεια λειτουργικότητας του γονιδίου *SGE1* (*sge1* null mutant) οπότε και είναι ευαίσθητο σε crystal violet, ενώ παράλληλα φέρει μεταλλαγή σε άγνωστο γονίδιο, επικαλούμενη ως *ise2*, η οποία αυξάνει την ευαισθησία του μύκητα σε κυκλοεξιμίδιο καθώς και σε άλλα φάρμακα [4'-(9-acridinylamino)-methanesulphon-*m*-anisidide ή mAMSA, aphidicolin, camptothecin και πιθανά crystal violet] (Ehrenhofer-Murray et al, 1994; Nitiss & Wang, 1988). Επειδή όμως το YAE65 έχει προκύψει από ένα άλλο στέλεχος (JN127), που με τη σειρά του έχει προέλθει από EMS μεταλλαξογένεση (EthylMethaneSulfonate mutagenesis σε επίπεδα βιωσιμότητας 5%), μετά από πολλαπλές διασταυρώσεις είναι πιθανό να φέρει και άλλες μη ταυτοποιημένες μεταλλαγές.

Αρχικά έγινε η υπόθεση ότι η Sge1p λόγω της ομολογίας της με το προϊόν του *cLE6* έχει κάποια σχέση με το μεταβολισμό της κερκοσπορίνης ή την ανθεκτικότητα της ζύμης στην τοξίνη. Το στέλεχος YAE65 βρέθηκε να είναι εξαιρετικά ευαίσθητο

σε συγκέντρωση κερκοσπορίνης 1 μ M σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό (MYM=Minimal Yeast Medium) και 10 μ M σε πλήρες θρεπτικό υλικό (YCM=Yeast Complete Medium) σε αντίθεση με άλλα στελέχη αγρίου τύπου τα οποία κάτω από τις ίδιες συνθήκες ήταν σημαντικά ανθεκτικότερα (Ververidis et al, abstract Detox. Conference, 1996). Έτσι ακολούθησε έλεγχος της αποκατάστασης της ανθεκτικότητας σε κερκοσπορίνη για το YAE65 όταν το *SGEI* είναι κλωνοποιημένο σε φορείς χαμηλού (lc) ή υψηλού (hc) αριθμού αντιγράφων. Η συμπλήρωση της μεταλλαγής *SGEI* στα στελέχη YAE65 lc *SGEI* και YAE65 hc *SGEI*, ενώ επανέφερε την ανθεκτικότητα του μύκητα στο crystal violet (Ehrenhofer-Murray et al, 1994) δεν ήταν αρκετή για προστασία από την κερκοσπορίνη (Ververidis et al, abstract Detox. Conference, 1996).

Μία διαφορετική προσέγγιση αφορούσε την ακτινοβόληση του στελέχους YAE65 με υπεριώδες φως καθώς και έκθεση στο χημικό μεταλλαξογόνο EMS [με 97-98% επίπεδα θνησιμότητας (lethality rates)] προκειμένου να αποκατασταθεί η ανθεκτικότητα σε κερκοσπορίνη. Έγινε λοιπόν προσπάθεια επιλογής ανθεκτικών μεταλλαγών σε YCM με κερκοσπορίνη 1-5 μ M κάτω από έντονο φως. Σε δύο ανεξάρτητα πειράματα καμία μεταλλαγή ανθεκτικότητας δεν απομονώθηκε (Βερβερίδης κ.α., Βιοχημική εταιρεία, 1998)

Σε μια τρίτη προσέγγιση με στόχο να απομονωθεί τυχόν γονίδιο που προσφέρει ανθεκτικότητα στην κερκοσπορίνη στη ζύμη, το στέλεχος YAE65 μετασχηματίστηκε με γενομική βιβλιοθήκη που έφερε ένθετα DNA από το άγριου τύπου στέλεχος S288C σε υψηλού αριθμού αντιγράφων πλασμιδιακό φορέα. Έτσι απομονώθηκαν 3 κλώνοι οι οποίοι προσέφεραν στο YAE65 ανθεκτικότητα σε κερκοσπορίνη [απόρριψη περίπτωσης ενδογενούς ανθεκτικότητας του YAE65 και επιβεβαίωση δράσης των κλώνων μετά από διάσωσή τους από το κάθε στέλεχος (plasmid rescue) και επανεισαγωγή τους στο YAE65]. Πέψεις των τριών κλώνων έδιναν ταυτόσημα αποτελέσματα οπότε επρόκειτο για ένα και μοναδικό κλώνο, στον οποίο και δόθηκε η ονομασία *CERC1* (Ververidis et al, in preparation). Αφού βρέθηκε η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των δύο άκρων του γενωμικού κλώνου *CERC1* έγινε σύγκριση με τη βάση δεδομένων που περιλαμβάνει όλο το γένωμα του ζαχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* και αναγνωρίστηκε τοπολογικά ο κλώνος στο γένωμα αλλά και η ακριβής αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του. Στην περιοχή αυτή λοιπόν περιλαμβάνονται οι κωδικές περιοχές δύο ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης *YNR074c* και *YNR073c*. Ακολούθησε υποκλωνοποίηση και έλεγχος του

κάθε ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης ξεχωριστά όσον αφορά τη δυνατότητα που έχει να προσφέρει ανθεκτικότητα σε κερκοσπορίνη. Τελικά αποδείχθηκε ότι μόνο το *YNR074c* προσδίδει ανθεκτικότητα ίδια με αυτή του πλήρη γενωμικού κλώνου *CERC1* (Ververidis et al, in preparation). Ως προϊόν του *YNR074c* αναφέρεται η πρωτεΐνη YN9B η οποία αποτελείται από 378 αμινοξικά κατάλοιπα, θεωρείται διαμεμβρανική και ~50% των αμινοξέων της είναι υδρόφοβα γεγονός που οδηγεί σε πρόβλεψη 2-3 διαμεμβρανικών περιοχών. Συγκρίνοντας την αλληλουχία των αμινοξέων της YN9B με άλλες πρωτεΐνες κατατεθειμένες σε βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών, προέκυψε μια ομάδα πρωτεϊνών (από βακτήρια μέχρι πολυκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς) οι οποίες στην πλειοψηφία τους είναι αναγωγάσες (reductases). Η πλειοψηφία αυτών των αναγωγασών ανήκει στην οικογένεια των εξαρτώμενων από FAD δισουλφιδικών οξειδοαναγωγασών (FAD-dependend disulfide oxidoreductases ή disulfide-containing flavoproteins).

FAD-εξαρτώμενες δισουλφιδικές αναγωγάσες

Η οικογένεια των FAD-εξαρτώμενων δισουλφιδικών αναγωγασών περιλαμβάνει ομοδιμερείς πρωτεΐνες που φέρουν ένα ζευγάρι κυστεϊνών στο κάθε ένα από τα δύο ενεργά τους κέντρα. Το κάθε ζευγάρι κυστεϊνών σχηματίζει αντιστρεπτά δισουλφιδικό δεσμό καθώς πρωτόνια μεταφέρονται από το NADPH μέσω μορίου FAD και ανάγουν τελικά κατάλληλο υπόστρωμα (Shames et al, 1986).

Αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας είναι η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR=Glutathione Reductase) και η αναγωγή της θειορεδοξίνης (THR=Thioredoxin Reductase) που συναντώνται σε βακτήρια (*Escherichia coli*, *Pseudomonas cepacia*), στη ζύμη (*Saccharomyces cerevisiae*), σε ανώτερα φυτά (*Arabidopsis thaliana*), σε έντομα (*Drosophila melanogaster*) αλλά και σε θηλαστικά (*Homo sapiens*). Ένα τρίτο αντιπροσωπευτικό μέλος της οικογένειας είναι και η αναγωγή της τρυπανοθειόνης (TR=Trypanothione Reductase) που συναντάται στα παρασιτικά πρωτόζωα τρυπανοσωματίδες (trypanosomatids; *Trypanosoma* sp., *Crithidia fasciculata*, *Leishmania* sp.).

Η GR είναι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της γλουταθειόνης στην ανηγμένη της μορφή (GSH=γ-glutamylcysteinylglycine), η οποία αφ' ενός είναι απαραίτητη για την κυτταρική άμυνα απέναντι σε οξειδωτικό στρες, αφ' ετέρου παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των δεσοξυδιβονουκλεϊτιδικών

προδρόμων του DNA (Holmgren, 1985). Η TR συναντάται στους τρυπανοσωματίδες που είναι παρασιτικά πρωτόζωα υπεύθυνα για την αρρώστεια του ύπνου, τη λείσμανίαση (leishmaniasis) και την αρρώστεια Chagas της Νότιας Αμερικής (South American Chagas disease) και στους οποίους αντιοξειδωτικό ρόλο μαζί με τη γλουταθειόνη παίζει και η τρυπανοθειόνη [T(SH)₂=N¹, N⁸-(bis)glutathionyl spermidine]. Στα πρωτόζωα αυτά δεν εντοπίζεται GR ενεργότητα και η GSH αναγεννάται μέσω της αντίδρασης οξειδωσης της T(SH)₂ σε T(S)₂, η οποία με τη σειρά της αναγεννάται από το ένζυμο TR (Shames et al, 1986; Krauth-Siegel et al, 1987). Τέλος, η THR ανάγει την οξειδωμένη μορφή της θειορεδοξίνης (TRX), μιας μικρού μοριακού βάρους οξειδοαναγωγής που χρησιμεύει στην αναγωγή ποικίλων υποστρωμάτων και εμπλέκεται σε πολλά οξειδωτικά μονοπάτια μεταφοράς μνημάτων (redox signal transduction pathways) (Mouaheb et al, 1998).

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας GR/TR/THR εμφανίζουν ομοιότητες στο μέγεθος, στο μηχανισμό κατάλυσης, καθώς και στην πρωτοταγή [η TR του *Trypanosoma congolense* εμφανίζει ταυτότητα καταλοίπων (identity) 41% και 38% με τη GR του ανθρώπου και της *E. coli* αντίστοιχα (Henderson et al, 1991)] και στην τεταρτοταγή τους δομή [παρόμοια δομή των περισσότερων από τις διακριτές περιοχές των THR της *E. coli* και GR του ανθρώπου (Kuriyan et al, 1991)].

Στις οξειδοαναγωγές αυτές έχουν αναγνωριστεί 4 δομικές περιοχές : η αμινοτελική FAD προσδένουσα περιοχή (FAD-binding domain), η NADPH προσδένουσα περιοχή (NADPH binding domain), η κεντρική περιοχή (central domain) που λειτουργικά αποτελεί τμήμα της FAD προσδένουσας περιοχής και η καρβοξυτελική περιοχή (C-terminal domain) η οποία σχηματίζει το ενεργό κέντρο αλληλεπιδρώντας (στην ανθρώπινη GR και στην TR) ή όχι (στην THR της *E. coli*) με την αντίστοιχη περιοχή του άλλου μονομερούς (Kuriyan et al, 1991).

Οι πιο πολλές από τις πρωτεΐνες της οικογένειας προβλέπεται ότι φέρουν 1-3 ισχυρά υδρόφοβες περιοχές οι οποίες πιθανά να είναι και διαμεμβρανικές. Αν και η συνολική ομοιότητα (similarity) της YN9B με αυτά τα ένζυμα δεν είναι πολύ μεγάλη [26-27% ταυτότητα καταλοίπων (identity) με την TR και 23-24% με την GR στην πρωτοταγή δομή] εντοπίζονται μικρές αλληλουχίες που εμφανίζουν αξιόλογη ομοιότητα (παράρτημα 1). Αυτές οι αλληλουχίες αντιστοιχούν σε υψηλά συντηρημένες περιοχές μεταξύ όλων των μελών της οικογένειας GR/TR/THR. *In silico* ανάλυση της τεταρτοταγούς δομής της YN9B χρησιμοποιώντας διάφορους αλγόριθμους, αποκάλυψε ότι η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει παρόμοια δομή με τις

αναγωγάσες GR/TR/THR (Ververidis et al, in preparation). Τα παραπάνω στοιχεία δημιουργούν την υποψία ότι η YN9B είναι μέλος της οικογένειας των FAD-εξαρτώμενων δισουλφιδικών οξειδοαναγωγασών (Ververidis et al, in preparation).

**Πρωτεΐνες μεμβρανικοί μεταφορείς στον *Saccharomyces cerevisiae* :
υπεροικογένειες μεταφορέων MFS (Major Facilitator Superfamily) και ABC
(ATP-Binding Cassette).**

Το *SGE1* γονιδιακό προϊόν κατατάσσεται στην οικογένεια των MFS πρωτεϊνών που προσφέρουν πολλαπλή ανθεκτικότητα σε διάφορα φάρμακα και αν και το ίδιο δε σχετίζεται με την αποτοξίνωση του κυττάρου από την κερκοσπορίνη, οι ομάδες των μεταφορέων MFS - MDR αλλά και ABC - MDR παρουσιάζουν γενικότερο ενδιαφέρον για το σκοπό αυτό.

Μεταφορείς MFS (Major Facilitator Superfamily transporters)

Μια προσπάθεια κατάταξης των πρωτεϊνών που είναι μεμβρανικοί μεταφορείς στον *Saccharomyces cerevisiae* εξαιρουμένων των μιτοχονδριακών μεταφορέων και των H⁺-ATPase έγινε όταν το 65% του γονιδιώματος της ζύμης ήταν γνωστό. Περίπου λοιπόν 60 πρωτεΐνες-μεταφορείς των οποίων η λειτουργικότητα ήταν τουλάχιστον εν μέρει γνωστή και περίπου 100 ακόμα γονιδιακά προϊόντα που εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα (similarity) με μεμβρανικές πρωτεΐνες-μεταφορείς στη ζύμη και / ή σε άλλους οργανισμούς, κατατάχθηκαν σε μια από τις 3 μεγάλες κατηγορίες των μεμβρανικών μεταφορέων (membrane transport proteins) : κανάλια (channels), μεταφορείς (transporters, facilitators, permeases, carriers) και αντλίες (pumps, ATPases) (Bruno A., 1995).

Οι μεταφορείς (transporters) είναι μεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί σε βακτήρια, μύκητες, φυτά και ζώα. Έχουν κοινή δομή και αποτελούνται από ένα κεντρικό υδρόφοβο πυρήνα που αποτελείται από 10, 12 ή 14 περιοχές που συνδέονται με τη μεμβράνη (membrane-spanning domains) μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται υδρόφιλες περιοχές. Φαίνεται ότι ένας μεταφορέας σε αντίθεση με το κανάλι για να μεταφέρει κάποια ουσία μέσα από τη μεμβράνη υφίσταται αντιστρεπτή αλλαγή της δομής του η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την έκθεση των υδρόφιλων περιοχών του και προς τις δυο μεριές της μεμβράνης. Στην περίπτωση που η προς μεταφορά ουσία

μεταφέρεται σύμφωνα με την κλίση της συγκέντρωσής της, ο μεταφορέας απλά διευκολύνει τη διάχυση και συνεπώς δεν καταναλώνεται ενέργεια. Άλλοι όμως μεταφορείς συνδυάζουν τη δράση τους με συνμεταφορά ή αντιμεταφορά (symport – antiport) πρωτονίων εξασφαλίζοντας έτσι ενέργεια για τη μεταφορά ουσιών αντίθετα από την κλίση συγκέντρωσής τους. Άλλος τρόπος εξασφάλισης ενέργειας είναι μέσω υδρόλυσης του ATP.

Μια μεγάλη υπεροικογένεια μεταφορέων στη ζύμη είναι εκείνη που τα μέλη της εμφανίζουν ομοιότητα (similarity) με τη βακτηριακή υπεροικογένεια MFS (Major Facilitator Superfamily) και πολλές από τις πρωτεΐνες που περιλαμβάνει προσδίδουν ανθεκτικότητα σε φάρμακα – αρωματικές ενώσεις μεταφέροντάς τις έξω από το κύτταρο με κατανάλωση ενέργειας. Αυτή η ενέργεια εξοικονομείται καθώς παράλληλα με την εξώθηση του φαρμάκου στον εξωκυττάριο χώρο η πρωτεΐνη MFS μεταφέρει πρωτόνια μέσα στο κύτταρο ($H^+_{IN} / DRUG_{OUT}$) λειτουργώντας ως αντιμεταφορέας.

Όλοι όμως οι μεταφορείς MFS δε σχετίζονται με εξώθηση τοξικών συστατικών από το κύτταρο μιας και υπάρχουν και μεταφορείς ABC που είναι πρωτεΐνες MDR. Επιπλέον πολλοί από τους ήδη γνωστούς μεταφορείς τοξικών ουσιών έχουν ευρύ πεδίο δράσης (μη ειδικοί). Μπορεί όμως π.χ. να δρουν ως H^+ -αντιμεταφορείς σε μεμβράνες κυστιδίων της ζύμης και να σχετίζονται με το μεταβολισμό και την αποθήκευση ιόντων (Bruno, 1995) ή ακόμα ως μεταφορείς πρωτεϊνών και ριβονουκλεοπρωτεϊνών ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα (Aitchison et al, 1995).

Στους μύκητες *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* και *Candida maltosa* έχουν αναγνωρισθεί γενετικά και λειτουργικά 5 γονίδια που ανήκουν στην υπεροικογένεια MFS και για τα οποία προτείνεται η ονομασία οικογένεια MFS-MDR (Goffeau et al, 1997). Από τα 5 αυτά γονίδια, τα 2 αφορούν τη ζύμη και κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες Atr1p που προσφέρει ανθεκτικότητα σε aminotriazoles και 4-nitroquinoline-N-oxide (Gompel-Klein & Brendel, 1990) και Sge1p που προσφέρει ανθεκτικότητα σε crystal violet και πιθανά σε βρωμιούχο αιθύδιο όταν βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα (Amakasu et al, 1993; Ehrenhofer-Murray et al, 1994). Η ολοκλήρωση της ανάγνωσης του γονιδιώματος του *Saccharomyces cerevisiae* αποκάλυψε, εκτός των 2 παραπάνω πρωτεϊνών, 26 ακόμα γονιδιακά προϊόντα που εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα με τα γνωστά μέλη της οικογένειας MFS-MDR (Goffeau et al, 1997). Συνολικά λοιπόν

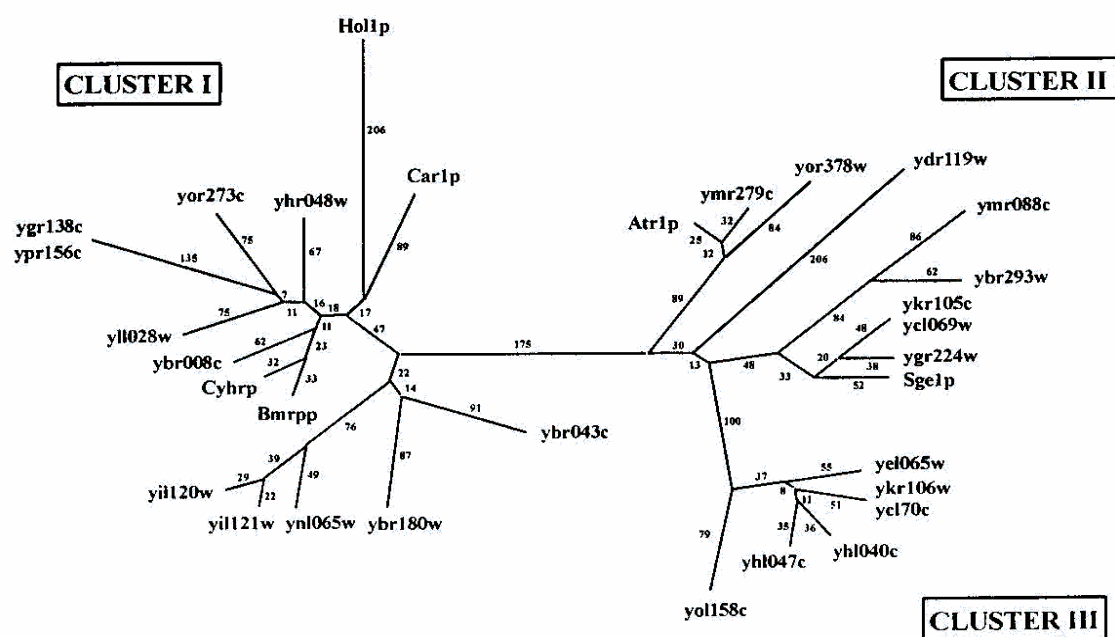
28 πρωτεΐνες της ζύμης και 3 πρωτεΐνες των άλλων μυκήτων (καθώς και 3 πρωτεΐνες των βακτηρίων *Bacillus subtilis* και *Escherichia coli*) ανήκουν στην οικογένεια MFS-MDR. Η πρωτεΐνη Hol1p καθώς και τα προϊόντα των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης *YHR048w*, *YHL040c* και *YHL047c* μελετώνται μεταξύ των άλλων, για την ανθεκτικότητα που πιθανά προσφέρουν απέναντι στην κερκοσπορίνη, στην παρούσα εργασία.

Κυρίως δομικές, παρά ειδίκευσης υποστρώματος, μεταξύ τους συγκρίσεις οδήγησαν στην κατάταξή τους σε 3 ομάδες (clusters) :

η ομάδα I αποτελείται από πρωτεΐνες MFS με 12 διαμεμβρανικές περιοχές,

η ομάδα II αποτελείται από πρωτεΐνες MFS με 14 διαμεμβρανικές περιοχές και σ' αυτήν ανήκουν οι Atr1p και Sge1p ενώ

η ομάδα III αποτελείται από πρωτεΐνες MFS με επίσης 14 διαμεμβρανικές περιοχές, διαχωρίζονται όμως από αυτές της ομάδας II μιας και δεν έχει βρεθεί ομόλογη πρωτεΐνη βακτηρίου ή ζύμης με γνωστή ανθεκτικότητα σε φάρμακο. Εν τούτοις τα μέλη της ομάδας III θεωρούνται πιο κοντά φυλογενετικά σε αυτά της ομάδας II παρά σε αυτά της ομάδας I (σχ.3).



Σχ.3. Το φυλογενετικό δέντρο 31 πρωτεϊνών, μέλη της οικογένειας MFS-MDR στη ζύμη (28 του *S. cerevisiae* και 3, Car1p, Cyhrp και Bmrpp, από άλλες ζύμες) που προέκυψε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα PHYLIP (Goffeau et al, 1997).

Μεταφορείς ABC (ATP-Binding Cassette transporters)

Στη μεγάλη κατηγορία των μεταφορέων ανήκουν τα συστήματα μεταφοράς που χρησιμοποιούν σαν κινητήρια δύναμη ενέργεια που προέρχεται από υδρόλυση του ATP (ATP – driven transport systems) όπου και ανήκουν οι μεταφορείς ABC (ATP - Binding Cassette).

Οι μεταφορείς ABC είναι πρωτεΐνες συντηρημένες σε όλη την κλίμακα των ζώντων οργανισμών από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο. Στα ευκαρυωτικά κύτταρα συναντώνται στην πλασματική μεμβράνη ή σε μεμβράνες ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων (κυστίδια, υπεροξυσώματα, μιτοχόνδρια) όπου και μεταφέρουν διάφορες ουσίες αντίθετα ως προς την ηλεκτροχημική τους διαβάθμιση και μετά από υδρόλυση ATP στο εσωτερικό των οργανιδίων.

Η δομική μονάδα των μεταφορέων ABC αποτελείται από 6 διαμεμβρανικές περιοχές TM_6 (TransMembrane domains) να προηγούνται ή να ακολουθούν μιας συντηρημένης κυτταροπλασματικής περιοχής ATPase με μήκος ~200 αμινοξέα NBF (Nucleotide Binding Fold). Αυτές οι περιοχές NBF περιλαμβάνουν τα μοτίβα Walker A και B που φαίνεται να εντοπίζονται σε πολλές άλλες πρωτεΐνες που προσδέουν δι- και τρι-φωσφορικά νουκλεοτίδια (Walker et al, 1982). Εν τούτοις, οι συντηρημένες αλληλουχίες μεταξύ των μεταφορέων ABC αφορούν ολόκληρη την NBF περιοχή και όχι μόνο τα μοτίβα Walker A και B.

Μερικοί μεταφορείς ABC αναφέρονται ως «μισού μήκους» (“half-sized”) γιατί αποτελούνται από μια δομική μονάδα H_2N-TM_6-NBF- ή $H_2N-NBF-TM_6-$ και φαίνεται ότι είναι λειτουργικοί μετά από διμερισμό. Οι white & brown pigment transport proteins που βρίσκονται στο μάτι και σε άλλους ιστούς στη *Drosophilla melanogaster*, οι Transporter of Antigenic Polypeptide fragments (TAP) στο ενδοπλασματικό δίκτυο των θηλαστικών και οι υπεροξυσωματικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με το σύνδρομο του Zellweger και την αδενολευκοδυστροφία είναι καλά χαρακτηρισμένοι «μισού μήκους» ABC μεταφορείς. Στον *Saccharomyces cerevisiae* έχει μελετηθεί η αλληλουχία τουλάχιστον 7 «μισού μήκους» ABC μεταφορέων (Bruno, 1995).

Άλλοι ABC μεταφορείς έχουν διπλή ενδομοριακή δομή (“full-sized”) της μορφής $H_2N-TM_6-NBF-TM_6-NBF$ ή $NBF-TM_6-NBF-TM_6-COOH$. Η πρωτεΐνη-ρυθμιστής διαμεμβρανικής μεταφοράς που είναι υπεύθυνη για την ασθένεια της κυστικής ίνωσης (CFTR = Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)

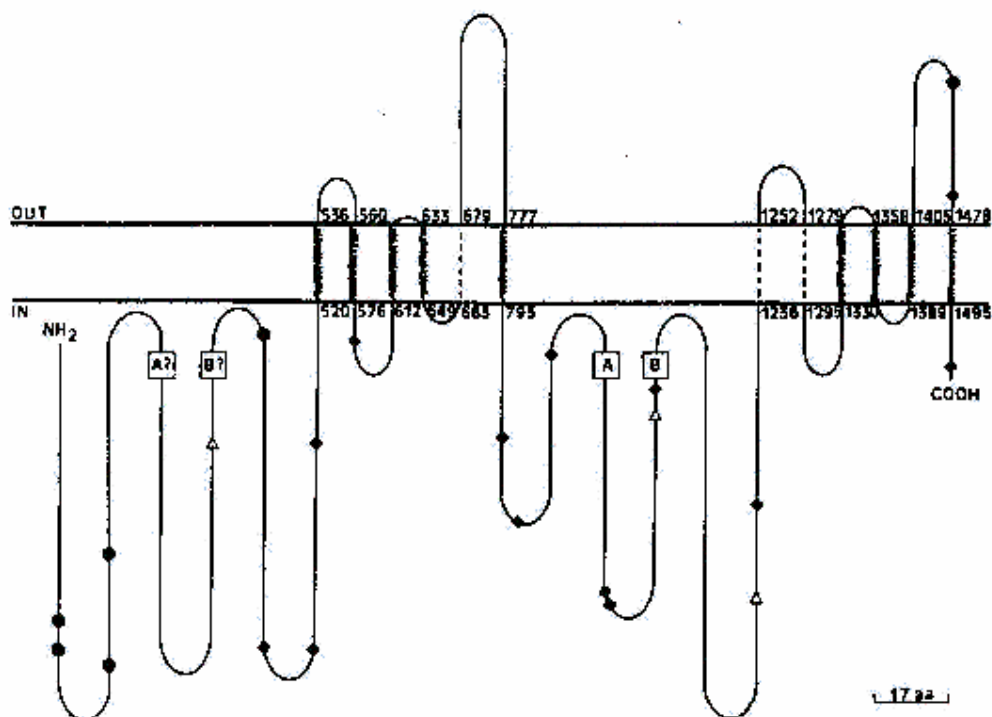
ανήκει σ' αυτή την κατηγορία όπως και η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *MDR1* και προσφέρει πολλαπλή ανθεκτικότητα σε κυτταρικές σειρές και ανθρώπινους όγκους διώχνοντας με κατανάλωση ενέργειας μικρά υδρόφοβα μόρια έξω από το κύτταρο (μη ειδικός εξωμεταφορέας των θηλαστικών). Στον *Saccharomyces cerevisiae* έχει μελετηθεί η αλληλουχία τουλάχιστον 10 διπλής δομής ABC μεταφορέων (Bruno, 1995). Η πιο καλά μελετημένη πρωτεΐνη είναι η Ste6p η οποία έχει δομή H₂N-TM₆-NBF-TM₆-NBF-COOH και βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη καταλύοντας την έκκριση της συζευκτικής φερρομόνης α. Τα γονίδια *SNQ2* και *PDR5* κωδικοποιούν για 2 άλλους καλά μελετημένους διπλής δομής ABC μεταφορείς οι οποίοι όταν βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα προσφέρουν ανθεκτικότητα σε διάφορα άσχετα μεταξύ τους φάρμακα.

Μπορούμε να διαχωρίσουμε τους ABC μεταφορείς σε δύο υποκατηγορίες βάση του αριθμού των αμινοξικών καταλοίπων που παρεμβάλλονται μεταξύ των Walker A και B motifs. Η απόσταση αυτή είναι σημαντική για τη λειτουργική τους δράση. Για παράδειγμα, το επικρατέστερο αλληλόμορφο που προκαλεί την κυστική ίνωση είναι μια έλλειψη εντός αναγνωστικού πλαισίου ενός κωδικονίου της φαινυλαλανίνης που εντοπίζεται μεταξύ των περιοχών Walker A και B στην πρωτεΐνη CFTR (Tsui, 1992). Η κατηγορία 1 εκπροσωπείται από την ανθρώπινη Mdr1p (Ρ-γλυκοπρωτεΐνη) και περιλαμβάνει την πλειοψηφία των γνωστών μεταφορέων ABC. Οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν μια επιπλέον περιοχή αμινοξικών καταλοίπων (13 περισσότερα συγκρίνοντας την Mdr1p με την CFTR) μεταξύ των περιοχών Walker A και B. Η κατηγορία 2 εκπροσωπείται από την πρωτεΐνη CFTR (Katzmann et al, 1995).

Ακόμα, τέλος, θα μπορούσε να αναφερθεί και σχέση μεταξύ πρωτεϊνών MFS-MDR και μεταφορέων ABC μιας και μερικές πρωτεΐνες ABC όπως οι Pdr5p και Snq2p φαίνεται ότι αποτελούνται από 12 διαμεμβρανικές περιοχές (Balzi & Goffeau, 1995; Decottignies et al, 1994; 1995) και διώχνουν το κυκλοεξιμίδιο και το 4-NQO αντίστοιχα με εξάρτηση από ATP όπως κάνουν και μέλη της οικογένειας MFS-MDR για κάποια φάρμακα, χωρίς βέβαια αυτά να υδρολύουν ATP. Επίσης, πολλά φάρμακα που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο και θετικά φορτισμένη αμινομάδα αλληλεπιδρούν με πολλαπλής ανθεκτικότητας μεταφορείς ABC ή MFS (Yelin & Schuldiner, 1995).

Το γονίδιο *PDR5*

Ένα από τα γονίδια της οικογένειας ABC - MDR που είναι γνωστό ως προς τη δομή και τον τρόπο δράσης του και μας απασχολεί σε μία πρώτη προσέγγιση της μελέτης της ανθεκτικότητας της ζύμης στην κερκασπορίνη είναι το *PDR5*. Το γονίδιο *PDR5* εδράζεται στο χρωμόσωμα XV, κωδικοποιεί για πρωτεΐνη μοριακού βάρους 160kDa η οποία ανήκει στην οικογένεια των μεταφορέων ABC και έχει διπλή ενδομοριακή δομή της μορφής H₂N-NBF-TM₆-NBF-TM₆-COOH (Balzi et al, 1994) (σχ.4).



Σχ.4. Προβλεπόμενη δομή και τοπολογία της Pdr5p στην πλασματική μεμβράνη. Φαίνονται καθαρά οι κυττοπλασματική (IN) και εξωκυτταρική (OUT) περιοχές καθώς και τα Walker A και B-binding motifs (? , εκφυλισμένα motifs) (Balzi et al, 1994).

Υπερέκφραση του *PDR5* έχει σαν αποτέλεσμα το κύτταρο να είναι ανθεκτικό σε διάφορες δομικά άσχετες κυτταροτοξικές ουσίες, όπως το κυκλοεξιμίδιο (παρεμποδιστής της πρωτεϊνοσύνθεσης) και το sulfomethuron methyl (παρεμποδιστής της συνθάσης του acetolactate) ενώ διακοπή της έκφρασης του *PDR5* οδηγεί σε υπερευαισθησία όχι μόνο σε κυκλοεξιμίδιο και sulfomethuron methyl αλλά και σε διάφορους μιτοχονδριακούς παρεμποδιστές (π.χ. χλωραμφαινικόλη, λινκομυκίνη, ερυθρομυκίνη, αντιμυκίνη) (Meyers et al, 1992).

Η Pdr5p εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την P-γλυκοπρωτεΐνη των θηλαστικών. Εντούτοις η Pdr5p εμφανίζει κάποιες ιδιομορφίες στην αλληλουχία των αμινοξέων της. Μια σημαντική αλλαγή είναι η αντικατάσταση της συντηρημένης στους μεταφορείς ABC λυσίνης της περιοχής Walker A του αμινοτελικού NBF από κυστεΐνη. Αν και η λυσίνη στην P-γλυκοπρωτεΐνη συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με τις φωσφορικές ομάδες του ATP που προσδένει, η κυστεΐνη παίζει επίσης ρόλο στην υδρόλυση του ATP. Εξ' άλλου η Pdr5p υπήρξε ο πρώτος μεταφορέας ABC που αποδείχθηκε ότι υδρολύει ATP *in vitro* (Decottignies et al, 1994). Επίσης δεδομένου ότι οι δύο NBF της CFTR μπορεί να μην είναι λειτουργικά ισοδύναμες, πιθανά και η Pdr5p που εμφανίζει ποικιλότητα στις NBF να εμφανίζει παράλληλα και ποικιλότητα στην ενεργότητα (μεταφορέας φαρμάκων και κανάλι-μεταφορέας ιόντων) (Balzi et al, 1994).

Απενεργοποίηση του PDR5 (insertion ή deletion) δεν οδηγεί σε θάνατο το κύτταρο, δεν επηρεάζει το τάχος αύξησης - ίσως μάλιστα λίγο να το επιταχύνει (Decottignies et al, 1995) -, τη σύζευξη (mating) ή τη σπορίωση (sporulation) αλλά έχει σαν αποτέλεσμα την εκδήλωση υπερευαισθησίας σε φάρμακα (Kolaczowski et al, 1996).

Το γονίδιο *SNQ2*

Ένα δεύτερο γονίδιο της οικογένειας ABC - MDR που μελετήθηκε και περεταίρω στην παρούσα εργασία ως προς την ανθεκτικότητα που προσφέρει σε κύτταρα ζύμης απέναντι στην κερκοσπορίνη είναι και το *SNQ2*. Το γονίδιο *SNQ2* απομονώθηκε μετά από ανίχνευση γενωμικής βιβλιοθήκης της ζύμης σε φορέα υψηλού αριθμού αντιγράφων, σε άγριο στέλεχος *Saccharomyces cerevisiae*, με τα μετασχηματισμένα κύτταρα να εμφανίζουν υπερ-ανθεκτικότητα στα χημικά μεταλλαξογόνα 4-NQO (4-NitroQuinoline-N-Oxide) και Triaziquone (Haase et al, 1992).

Η συμμετοχή του *SNQ2* (καθώς και των άλλων γονιδίων που απομονώθηκαν με τον ίδιο τρόπο : *SNG1* και *SNQ3/YAPI/PARI/PDR4*) σε ένα από τα τρία αναγνωρισμένα μονοπάτια για επιδιόρθωση βλαβών στο DNA που προκαλούνται από τις παραπάνω ουσίες στη ζύμη αποδείχθηκε απίθανη, ενώ η ανθεκτικότητα που παρέχει σε χημικά μεταλλαξογόνα μετά από υπερέκφρασή του παρέπεμπε στον τρόπο δράσης της P-γλυκοπρωτεΐνης (Haase et al, 1992). Υποκλωνοποίηση και ανάλυση

της αλληλουχίας του *SNQ2* οδήγησε στην αναγνώριση ενός μεγάλου ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης 4503bp το οποίο κωδικοποιεί για πρωτεΐνη 1501 αμινοξικών καταλοίπων και μοριακού βάρους 169kDa με πολλές υδροφοβικές περιοχές και η οποία όταν υπερεκφράζεται προσφέρει υπερ-ανθεκτικότητα σε 4-NQO, Triaziquone αλλά και σε sulfomethuron methyl και phenanthroline (Servos et al, 1993) και σε staurosporine και fluphenazine (Hirata et al, 1994).

Βάση της ομολογίας που παρουσιάζει το *SNQ2* με γνωστούς ATP-εξαρτώμενους μεταφορείς (40% ομοιότητα - identity με το *PDR5* της ζύμης, με το *STE6* της ζύμης επίσης, με το *white & brown* γονίδιο της *Drosophila melanogaster*, με τα *CFTR* και *MDR1* γονίδια του ανθρώπου), του φαινοτύπου υπερ-ανθεκτικότητας που εκδηλώνει σε υψηλό αριθμό αντιγράφων στη ζύμη καθώς και της ευαισθησίας στα ίδια χημικά όταν δεν εκφράζεται, προέκυψε το συμπέρασμα ότι το *SNQ2* κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη εξαγωγέα (export permease) (Servos et al, 1993). Επειδή όμως εμφανίζει ομολογία και με πρωτεΐνες μη μεταφορείς (Yef3p : Yeast Elongation Factor 3, UvrAp : *E.coli* repair enzyme) πιθανά η Snq2p να παίζει και άλλο ρόλο στη ζύμη (Servos et al, 1993).

Πρόκειται λοιπόν για διπλής ενδομοριακής δομής ABC-μεταφορέα H₂N-NBF-TM₆-NBF-TM₆-COOH όπως και η Pdr5p οπότε και δρα ως μονομερές μόριο. Μόνο η παρουσία της περιοχής PEST [πλούσια σε προλίνη (P), γλουταμικό οξύ (E), σερίνη (S) και θρεονίνη (T)] στο σημείο που το μόριο τέμνεται σε δύο περίπου όμοια τμήματα, και η οποία επίσης απαντάται σε μικρού χρόνου ζωής πρωτεΐνες με χρόνο ημίσειας ζωής < 2h, δημιουργεί την υποψία ότι με μια μετα-μεταφραστική διαδικασία το μόριο της Snq2p χωρίζεται σε δύο λειτουργικές υπομονάδες και αυτές κατόπιν δρουν σε ισομοριακές ποσότητες φτιάχνοντας διμερές (Servos et al, 1993).

Όπως και στην περίπτωση της Pdr5p, η κατά τ' άλλα συντηρημένη λυσίνη της Walker A περιοχής, η οποία και είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της ενεργότητας της ATPase, έχει αντικατασταθεί από κυστεΐνη και συνεχίζει να υδρολύει το ATP (Decottignies et al, 1995).

Όταν τα *SNQ2* και *PDR5* υπερεκφράζονται από υψηλού αριθμού αντιγράφων πλασμίδιο στη ζύμη η τοξικότητα που προκαλεί η οιστραδιόλη (estradiol) καθώς και η ενδοκυτταρική της συγκέντρωση ελλαττώνονται. Είναι πιθανό λοιπόν, τα φυσιολογικά υποστρώματα των δύο μεταφορέων ABC *in vivo* να είναι στεροειδείς ενώσεις ή / και σχετικά μεμβρανικά λιπίδια (Mahe et al, 1996). Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι οι Pdr5p και Snq2p εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα της ζύμης σε

κατιόντα όπως Na^+ , Li^+ και Mn^{2+} ενώ η έκφρασή τους επάγεται από αυτά τα μεταλλικά ιόντα (Miyahara et al, 1996). Τέλος φαίνεται ότι το *SNQ2* προσδίδει και ανθεκτικότητα σε camptothecin, ένα αντικαρκινικό φάρμακο μοναδικός στόχος του οποίου είναι η DNA τοποϊσομεράση I. Στην πραγματικότητα αποδείχθηκε ότι η ευαισθησία στην camptothecin στη ζύμη ελαττώνεται μέσω του ρυθμιστικού δικτύου *PDR1* και βασικά μέσω της δράσης του *SNQ2* σε πολλαπλά αντίγραφα (Reid et al, 1997), έλλειψη του οποίου οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία ακόμα και σε χαμηλότερες δόσεις camptothecin.

Τέλος απενεργοποίηση του γονιδίου *SNQ2* σε μεταλλαγμένο στέλεχος *pdr1-3* που υπερεκφράζει τα *PDR5/SNQ2*, επιμηκύνει σημαντικά τη φάση προσαρμογής των κυττάρων κατά την οποία υφίστανται μεταβολικές και φυσιολογικές αλλαγές πριν μπουν στην εκθετική φάση, ενώ απενεργοποίηση των γονιδίων *PDR5* και *SNQ2* ελαττώνει το τάχος εκθετικής αύξησης (Decottignies et al, 1995). Σύμφωνα και με παρατηρήσεις των Kolaczowski et al. που αναφέρθηκαν προηγουμένως, μάλλον το *SNQ2* είναι εκείνο που παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική αύξηση. Πιθανόν δε αυτοί οι μεταφορείς να εξωθούν ενδοκυτταρικούς κυτταροτοξικούς μεταβολίτες που συσσωρεύονται κατά την αύξηση (Hirata et al, 1994).

Οι μεταγραφικοί παράγοντες *PDR1* και *PDR3*

Η έκφραση των γονιδίων *PDR5* και *SNQ2* ρυθμίζεται από δύο Zn_2Cys_6 (zinc cluster) μεταγραφικούς παράγοντες (Zn_2Cys_6 ή Gal4p οικογένεια), τους *PDR1* και *PDR3* (Meyers et al, 1992; Mahe et al, 1996). Τα δύο γονίδια εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, το *PDR1* στο χρωμόσωμα VII και το *PDR3* στο χρωμόσωμα II.

Εκτός από τα *PDR5* και *SNQ2* στόχοι των μεταγραφικών παραγόντων *PDR1/PDR3* είναι και άλλοι μεταφορείς ABC όπως τα *YOR1* και *PDR3* (αυτορρυθμιζόμενη έκφραση) (Decottignies et al, 1995; Katzmann et al, 1994; 1995; Mahe et al, 1996) καθώς και MFS γονίδια όπως οι μεταφορείς εξόζης (hexose transporters) *HXT9* και *HXT11* (Nourani et al, 1997).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ενώ η υπερέκφραση των *PDR5*, *SNQ2* και *YOR1* λόγω της δράσης των *PDR1/PDR3* οδηγεί σε φαινότυπο πολλαπλής ανθεκτικότητας (MDR), η υπερέκφραση των *HXT9* και *HXT11* οδηγεί το κύτταρο σε υπερευαισθησία στα ίδια φάρμακα (Nourani et al, 1997).

Η υπερέκφραση των *SNQ2*, *PDR5* και *YOR1* συμβαίνει σε μεταλλαγμένα στελέχη *PDR1/PDR3* και οδηγεί σε εκδήλωση MDR φαινοτύπου. Είναι πιθανόν λοιπόν οι MI και MII αλληλουχίες των Zn_2Cys_6 μεταγραφικών παραγόντων στην Pdr3p να παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Pdr3p-Pdr3p ή/και Pdr3p-Pdr1p, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό συμπλόκου ενεργοποίησης μεταγραφικής έκφρασης (Nourani et al, 1997). Μια άλλη υπόθεση εμπλέκει μια κεντρική περιοχή παρεμπόδισης (central inhibitory domain) της Pdr1p (Carvajal et al, 1997) η οποία περιέχει 8 συντηρημένες αλληλουχίες που μπορεί να σχετίζονται με την παρεμποδιστική δράση των μεταγραφικών παραγόντων της Gal4p οικογένειας (Zn_2Cys_6) (Stone & Sadowski, 1993; Roch, 1997). Μερικές δε από αυτές τις συντηρημένες αλληλουχίες παίζουν ρόλο στη διάκριση του DNA στόχου. Επίσης, 8 συντηρημένες αλληλουχίες βρίσκονται και στην αμινοτελική περιοχή της Pdr3p και καλύπτουν τις δύο δομικές αλληλουχίες MI και MII ενώ όταν υφίστανται μεταλλαγές προκαλείται αυξημένη ενεργοποίηση στους υποκινητές των *PDR3*, *SNQ2* και *PDR5* (Nourani et al, 1997).

Οι Pdr1p και Pdr3p αναγνωρίζουν και προσδένονται στην αλληλουχία 5'-TCCGCGGA-3' του υποκινητή του γονιδίου που ελέγχουν την έκφραση και η οποία καλείται PDRE-box (Pdr1/Pdr3 Responsive Elements) (Delahodde et al, 1995; Katzmann et al, 1994; 1995) και όπως φαίνεται για την εξαρτώμενη από τα Pdr1p/Pdr3p έκφραση του *SNQ2* χρειάζονται τουλάχιστον δύο λειτουργικά PDRE-boxes στον υποκινητή του *SNQ2* (Mahe et al, 1996).

Η μεταγραφική έκφραση του *PDR5* εξαρτάται άμεσα από τη συνδυασμένη δράση των Pdr1p/Pdr3p (μηδενική έκφραση του *PDR5* σε στέλεχος $\Delta pdr1\Delta pdr3$) (Katzmann et al, 1994) ενώ χαμηλά επίπεδα του *SNQ2* μεταγραφικού προϊόντος είναι ανιχνεύσιμα σε στέλεχος $\Delta pdr1\Delta pdr3$ (Mahe et al, 1996).

Επίσης η Pdr1p είναι εκείνη που επηρεάζει περισσότερο τη μεταγραφική έκφραση του *SNQ2* και του *PDR5* από ότι η Pdr3p (Mahe et al, 1996). Γενικά η Pdr1p είναι εκείνη η οποία ρυθμίζει την έκφραση, εκτός από μεταφορέων ABC και πρωτεϊνών MFS, και άλλων πρωτεϊνών που συνδέονται με μεμβράνες (GAS1, D4405 membrane-associated proteins) αλλά και διαλυτών πρωτεϊνών (G3PD soluble proteins) (Balzi et al, 1995).

Το γονίδιο *HOLI*

Ακόμα ένα από τα γονίδια που ανήκουν στην οικογένεια MFS - MDR το οποίο εξετάζεται σε πρώτη φάση για ανθεκτικότητα που προσφέρει απέναντι σε κερκοσπορίνη στη ζύμη, αν και δεν είναι ακόμα γνωστή κάποια ανθεκτικότητα που μπορεί να προσφέρει απέναντι σε άλλα φάρμακα, αλλά είναι και το *HOLI*. Αυξότροφα σε ιστιδίνη (histidine) στελέχη ζύμης δεν έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν L-ιστιδινόλη (L-histidinol) ως πηγή ιστιδίνης ακόμα και αν το γονίδιο της αφυδρογονάσης της ιστιδινόλης είναι λειτουργικό. Μεταλλαγές όμως στο γονίδιο *HOLI* επιτρέπουν την αύξηση των παραπάνω στελεχών σε ιστιδινόλη, εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα πρόσληψης Na^+ (*Δholl* στελέχη δεν έχουν δυνατότητα πρόσληψης ιστιδινόλης και Na^+) καθώς και άλλων ιόντων που βρίσκονται στο θρεπτικό μέσο, στα οποία και παρουσιάζουν τελικά υπερευαισθησία (Gaber et al, 1990). Όπως φαίνεται η πρόσληψη ιστιδινόλης σ' αυτά τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν είναι αποτέλεσμα μεταλλαγής σε κάποιο από τα γονίδια μεταφορείς της ιστιδίνης (*GAP*=General Amino acid Permease, *HPI1*=Histidine Permease, *CAN1*=Arginine Permease) μιας και υπάρχει σαφής γενετική διάκριση. Μια απλή εξήγηση του παραπάνω φαινοτύπου είναι ότι μεταλλαγές στο *HOLI* γονίδιο τροποποιούν την εξειδίκευση ενός μεταφορέα ιόντων έτσι ώστε να μπορεί να μεταφέρει ιστιδινόλη τόσο καλά όσο και κατιόντα. Έτσι μεταλλαγές στο *HOLI* είτε ελλαττώνουν την ειδίκευση αυτού του υποθετικού μεταφορέα είτε μεγιστοποιούν το ρυθμό μεταφοράς (Gaber et al, 1990).

***Agrobacterium tumefaciens* για μετασηματισμό δικοτυλήδων φυτών- Μοριακός μηχανισμός.**

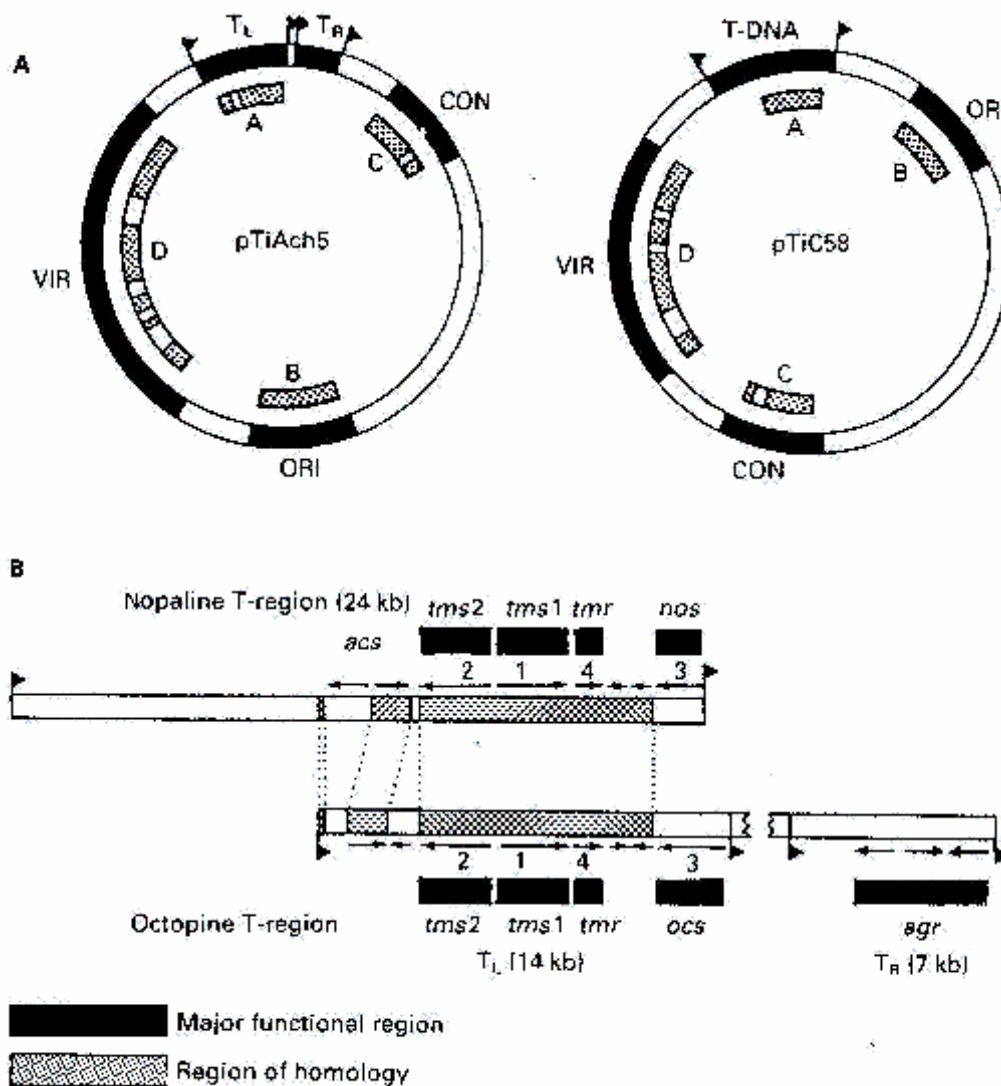
Μετά από μελέτη διαφόρων γονιδίων και ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης ως προς την προστασία που παρέχουν στη ζύμη απέναντι στην κερκοσπορίνη και έπειτα από αναγνώριση κάποιων από αυτά ως γονίδια ανθεκτικότητας, θα πρέπει να ακολουθήσει έλεγχος της δράσης τους και στα φυτικά κύτταρα. Ένα ιδιαίτερα ανεπτυγμένο σύστημα για την εισαγωγή στο φυτικό γονιδίωμα ξένων γονιδίων είναι το σύστημα του *Agrobacterium tumefaciens*. Το *A. tumefaciens* είναι ένα εδαφοβακτήριο που προσβάλλει τραυματισμένους ιστούς δικοτυλήδων και λίγων μονοκοτυλήδων φυτών και προκαλεί σχηματισμό όγκων (crown gall disease). Όλα

τα μολυσματικά στελέχη του *A. tumefaciens* φέρουν το πλασμίδιο Ti (Tumor inducing), μεγέθους 200-250kb, το οποίο φέρει 4 διακριτές και ομόλογες μεταξύ των διαφόρων Ti πλασμιδίων περιοχές. Οι δύο που σχετίζονται με το σχηματισμό του όγκου είναι το T (Transferred)-DNA και η *vir* (*virulence*) περιοχή, ενώ οι άλλες δύο σχετίζονται με τη συζευκτική μεταφορά και τη διατήρηση του πλασμιδίου μέσα στα κύτταρα του *Agrobacterium* (σχ.5A).

Κατά τη διαδικασία σχηματισμού του όγκου, το T-DNA μεταφέρεται στο φυτικό κύτταρο και ενσωματώνεται σταθερά στο φυτικό γονιδίωμα. Βασικές ανακατατάξεις της αλληλουχίας του T-DNA δεν παρατηρούνται ενώ μπορεί να βρεθεί σε ένα ή περισσότερα αντίγραφα σε τυχαίες θέσεις στο φυτικό γονιδίωμα. Η αλληλουχία του T-DNA ορίζεται από δύο ευθείες επαναλήψεις (*direct repeats*) των 25bp η καθεμία και οι οποίες είναι απαραίτητες σε πολική διάταξη και εμφανίζοντας *cis* δράση για το σχηματισμό του όγκου. Το T-DNA περιλαμβάνει γονίδια τα οποία είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό του όγκου στο φυτό και για τη σύνθεση των οπινών. Οι οπίνες (οκτοπίνη, νοπαλίνη, αγροπίνη, κ.λ.π.) είναι παράγωγα αμινοξέων και σακχάρων και χρησιμοποιούνται από το βακτήριο ως πηγές άνθρακα και αζώτου.

Στα στελέχη που παράγουν νοπαλίνες (*nopaline strains*) το T-DNA είναι ~24kb και φέρει 13 ORFs (σχ.5B). Τα γονίδια που παράγουν οπίνες είναι τα *nos* και *acs* και αντίστοιχα κωδικοποιούν για τα ένζυμα της συνθετάσης της νοπαλίνης (*nopaline synthase*) και της συνθετάσης της αγροσινοπίνης (*agrocinopine synthase*) ενώ τα ογκογονίδια είναι τα *tms1* και *tms2* που σχετίζονται με τη σύνθεση αυξινών και το *tmr* που σχετίζεται με τη σύνθεση της κυτοκινίνης.

Στα στελέχη που παράγουν οκτοπίνες (*octopine strains*) συναντά κανείς δύο περιοχές T-DNA: την T_L (~14kb) που περιλαμβάνει 8 ORFs και την T_R (~7kb) που περιλαμβάνει 6 ORFs κάθε μία από τις οποίες έχει τις δικές της ευθείες επαναλήψεις και κατά συνέπεια και αναξάρτητη πορεία μεταφοράς στο φυτικό γονιδίωμα (σχ.5B). Τα ORFs που βρίσκονται στο δεξί μέρος του T-DNA κωδικοποιούν για πρωτεΐνες λειτουργικά ισοδύναμες με αυτές των ORFs του T_L-DNA. Συγκεκριμένα το γονίδιο *ocs* κωδικοποιεί για τη συνθετάση της οκτοπίνης (*octopine synthase*) και βρίσκεται στο T_L-DNA. Στην ίδια περιοχή συναντώνται και τα ογκογονίδια *tms1*, *tms2* και *tmr*.



Σχ.5. Γενική οργάνωση των πλασμιδίων Ti που παράγουν οκτοπίνες και νοπαλίνες.

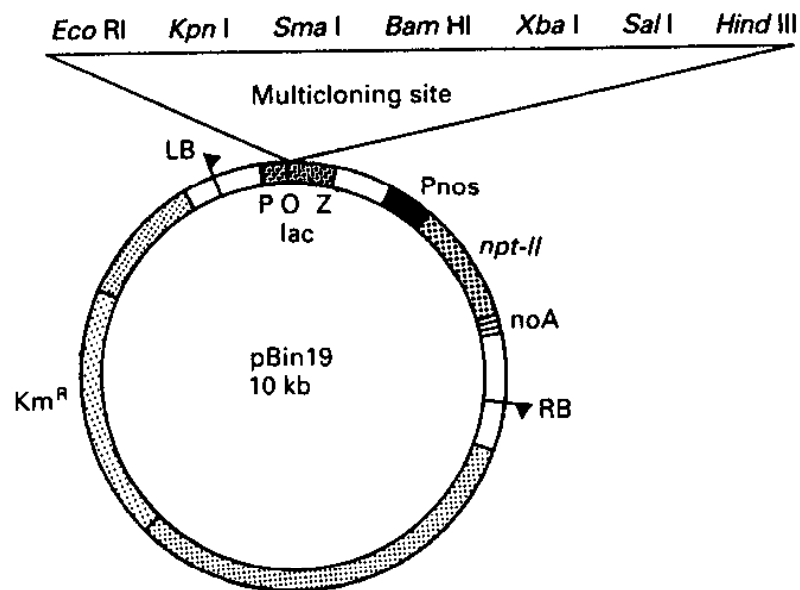
A. Χάρτες πλασμιδίων Ti που παράγουν οκτοπίνες (pTiAch5) και νοπαλίνες (pTiC58) όπου φαίνονται και οι σχετικές θέσεις και τα μεγέθη των κύριων λειτουργικών περιοχών.

B. Χάρτες των αντίστοιχων περιοχών T όπου φαίνονται οι περιοχές ομολογίας και οι θέσεις των ORFs.

Είναι σημαντικό το ότι τα γονίδια που περιέχονται στο T-DNA δε σχετίζονται με τη μεταφορά του στο φυτικό κύτταρο αλλά ούτε και με τη σταθερή διατήρησή του στο γονιδίωμα του φυτού. Ο μηχανισμός της μεταφοράς του T-DNA απαιτεί τη λειτουργική δράση των γονιδίων της περιοχής *vir* των οποίων η μεταγραφή επάγεται από συστατικά (π.χ. ακετοσυριγκόνη) που ελευθερώνονται από τον τραυματισμένο φυτικό ιστό. Επικρατεί λοιπόν η άποψη ότι η ακετοσυριγκόνη αποτελεί εξωκυττάριο σήμα το οποίο μεταδίδεται στο εσωτερικό του κυττάρου και επάγει την έκφραση

πολλών γονιδίων *vir*. Ακολουθεί πέψη της μιας αλυσίδας στις ευθείες επαναλήψεις 25bp στα άκρα του T-DNA και μεταφορά του μονόκλωνου γραμμικού μορίου, με άγνωστο ακόμα μηχανισμό, ανάλογο όμως εκείνου της βακτηριακής σύζευξης.

Το *A. tumefaciens* έχει χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά ξένου DNA και το μετασχηματισμό φυτικών ιστών. Έτσι πολλοί πλασμιδιακοί φορείς μετασχηματισμού βασίζονται στο Ti πλασμίδιο χωρίς όμως να φέρουν ογκογόνα γονίδια. Ανάλογα από το αν το T-DNA που ορίζεται από τις 25bp ευθείες επαναλήψεις βρίσκεται στον ίδιο φορέα με τα *vir* γονίδια ή σε ξεχωριστούς φορείς, οι μη ογκογόνοι φορείς διακρίνονται σε *cis* και *trans* αντίστοιχα. Οι *trans* ή δυαδικοί (binary) φορείς (π.χ. BIN-HYG-TX, BIN19) μπορούν και πολλαπλασιάζονται σε κύτταρα *E. coli* αλλά και *A. tumefaciens*, φέρουν γονίδιο επιλογής σε βακτηριακά στελέχη, ενώ μεταξύ των ευθείων επαναλήψεων φέρουν πολυσυνδέτη (MCS=MultiCloning Site) καθώς και γονίδιο άμεσης επιλογής των μετασχηματισμένων φυτικών κυττάρων (σχ.6).



Σχ.6. Χάρτης του δυαδικού φορέα pBIN19.

Το στέλεχος του *Agrobacterium* που φέρει το δυαδικό φορέα φέρει επίσης και πλασμίδιο Ti (π.χ. pGV2260) από το οποίο έχει αφαιρεθεί το T-DNA αλλά έχει ακέραιη τη περιοχή *vir*. Έτσι έχει τη δυνατότητα να παρακινήσει *in trans* το T-DNA με το ξένο ένθετο του δυαδικού φορέα και να προκαλέσει μετασχηματισμό κάποιου φυτικού ιστού.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιώντας ως σύστημα-μοντέλο το σακχαρομύκητα *Saccharomyces cerevisiae* κλωνοποιήθηκαν και μελετήθηκαν γονίδια των οποίων τα προϊόντα συμμετέχουν στην αποτοξίνωση από την κερκοσπορίνη και από άλλους φωτοενεργοποιητές που προκαλούν την παραγωγή $^1\text{O}_2$. Κατόπιν έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης αυτών των γονιδίων σε κατάλληλο δυαδικό φορέα με στόχο την εισαγωγή τους μετά από μετασχηματισμό στο φυτικό γονιδίωμα.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Βακτηριακά Στελέχη

E.coli

XL-1-Blue : *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac⁻*, F [*proAB⁺ lacI^q lacZΔM15 Tn10(tet^r)*] (Bullock et al, 1987)

DH5a : *supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Hanahan, 1983; Bethesda Research Laboratories, 1986)

HB101 : F⁻, *thi-1, hsdS20, (r_B⁻, m_B⁻), supE44, recA13, ara14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (str^r), xyl-5, mtl-1, λ⁻*

Agrobacterium tumefaciens

C58C1

Μυκητιακά Στελέχη

Saccharomyces cerevisiae

FT4 : MATa *ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ63 leu2-Δ1*

FT5 : MATa *ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ63 leu2-Δ1*

YAE65 : MATa *ade2-119 ilv1-92 trp5-b sge1 ura3Δ5*

YPH98 : MATa *ura3-52 lys2-801 ade2-101 leu2-Δ1 trp1-Δ1*

YPH98 (ΔSNQ2) : MATa *lys2-801 ade2-101 leu2-Δ1 trp1-Δ1* [SNQ2::Tn10 (URA3)]

YPH500 : MATa *ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*

YKKB13 : MATa *ura3-52 lys2-801 ade2-101 his3-Δ200 leu2-Δ1* (PDR5::TRP1)

R757 : MATa *ura3-52 his4-15 lys9*

R2903 : MATa *ura3-52 his4-15 lys9* (ΔHOLI-1)

YM4586 : MATa *ade2 ura3 his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-903 tyr1-501 Km^r*

YM4585 : MATa *ade2 ura3 his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-903 tyr1-501 Km^s*
(deletion strain)

YHR048wt : MATa *ade2 ura3 his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-903 tyr1-501 Km^r*

(Δ28) : MATa *ade2 ura3 his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-903 tyr1-501 Km^s*
(ΔYHR048)

YHL040wt : MATa *ade2 ura3 his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-903 tyr1-501 Km^r*

(Δ170) : MATα *ade2 ura3 his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-903 tyr1-501* Km^s
(ΔYHL040)

YHL047wt : MATα *ade2 ura3 his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-903 tyr1-501* Km^f

(Δ163) : MATα *ade2 ura3 his3-Δ200 lys2-801 leu2-3,112 trp1-903 tyr1-501* Km^s
(ΔYHL047)

Τα ΔYNR074c στελέχη της ζύμης [FT4(ΔYNR074c), YAE65(ΔYNR074c) και YPH98(ΔYNR074c)] δημιουργήθηκαν μετά από μετασχηματισμό των αντίστοιχων στελεχών με *HindIII* κομμάτι της pUC19[ΔYNR074c::URA3] κατασκευής και αντικατάσταση του YNR074c στο γένωμα από το ΔYNR074c::URA3 μετά από διπλό επιχιασμό. Η αποκατάσταση της πρωτοτροφίας σε ουρακίλη βοήθησε στην επιλογή των νέων στελεχών.

Πλασμιδιακοί φορείς-κατασκευές

pRS314 : πλασμιδιακός φορέας (4.785kb) στον οποίο ο συνδυασμός CEN6/ARSH4 τον περιορίζει σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων στη ζύμη, συμπληρώνει την αυξοτροφία σε τρυπτοφάνη (*TRP1*) και παρέχει ανθεκτικότητα σε αμικιλίνη σε βακτηριακά στελέχη (*Amp^r*).

pRS316 : πλασμιδιακός φορέας (4.895kb) τον οποίο ο συνδυασμός CEN6/ARSH4 περιορίζει σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων στη ζύμη, συμπληρώνει την αυξοτροφία σε ουρακίλη (*URA3*) και παρέχει ανθεκτικότητα σε αμικιλίνη σε βακτηριακά στελέχη (*Amp^r*).

YE_p13 : πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης (10.639kb) που βρίσκεται σε υψηλό αριθμό αντιγράφων στη ζύμη λόγω του 2μm πλασμιδιακού εναρκτηρίου σημείου αντιγραφής (origin of replication) που φέρει, συμπληρώνει την αυξοτροφία σε λευκίνη (*LEU2*) και παρέχει ανθεκτικότητα σε αμικιλίνη σε βακτηριακά στελέχη (*Amp^r*).

YE_p24 : πλασμιδιακός φορέας έκφρασης (expression vector) (7769kb) που βρίσκεται σε υψηλό αριθμό αντιγράφων στη ζύμη λόγω του 2μm πλασμιδιακού εναρκτηρίου σημείου αντιγραφής που φέρει, συμπληρώνει την αυξοτροφία σε ουρακίλη (*URA3*) και παρέχει ανθεκτικότητα σε αμικιλίνη (*Amp^r*) σε βακτηριακά στελέχη. Έχει τη δυνατότητα παροχής ανθεκτικότητας σε τετρακυκλίνη (*Tc^r*) αναλόγως της κατασκευής

YEplac112 : πλασμιδιακός φορέας (4.99kb) που χρησιμοποιεί το 2μm πλασμιδιακό εναρκτήριο σημείο αντιγραφής για να εξασφαλίζει υψηλό αριθμό αντιγράφων στη ζύμη, συμπληρώνει την αυξοτροφία σε τρυπτοφάνη (*TRP1*) και παρέχει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη σε βακτηριακά στελέχη (*Amp^r*).

PUCA7-TX : πλασμιδιακός φορέας έκφρασης (~3.5kb), πρόδρομος του BIN-HYG-TX φορέα για μετασχηματισμό των φυτών, φέρει CamV35s (Cauliflower mosaic Virus) υποκινητή και OCS (OCTopine Synthase gene) terminator μεταξύ των οποίων γίνεται η κλωνοποίηση, φέρει γονίδιο που προσφέρει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη (*Amp^r*) σε βακτηριακά στελέχη *E.coli* και *A.tumefaciens* αλλά δεν έχει γονίδιο επιλογής σε φυτικά κύτταρα.

BIN-HYG-TX : δυαδικός (binary) πλασμιδιακός φορέας για μετασχηματισμό των φυτών (plant transformation vector) (~10kb), φέρει LB (Left Border) και RB (Right Border) που περικλείουν CamV35s (Cauliflower mosaic Virus) υποκινητή και OCS (OCTopine Synthase gene) terminator καθώς και τις αλληλουχίες pNOS-*hptII*-pAg7 [nopaline synthase gene promoter-hygromycin resistance gene (plant transformation marker)-polyadenylation site], η κλωνοποίηση ενός ξένου κομματιού DNA γίνεται σε πολυσυνδέτη μεταξύ των CamV35s υποκινητή και OCS terminator θέσεων, η επιλογή σε στελέχη *E.coli* και *A.tumefaciens* με καναμυκίνη (*Km^r*) ενώ σε φυτά με υγρομυκίνη (*Hg^r*). Προέρχεται από το δυαδικό φορέα BIN19.

pRK2013 : μεγάλο (48kb) συζευκτικό πλασμίδιο που φέρει τις συζευκτικές περιοχές Tra1 και Tra2 του RP4 (RK2) μεταξύ των οποίων υπάρχει γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη (100μg/ml), φέρει επίσης τμήμα του ColE1, *Km^r* (Figurski, 1979).

pGV2260 : πρόκειται για Ti (Tumor inducing) πλασμίδιο από το οποίο έχει αφαιρεθεί η T-DNA αλληλουχία και έχει αντικατασταθεί από τμήμα του φορέα pBR322. Η ακέραιη όμως *vir* περιοχή λειτουργεί *in trans* για τη συζευκτική μεταφορά ενός δυαδικού φορέα από στέλεχος *A. tumefaciens* στο φυτικό κύτταρο, η επιλογή σε στελέχη *A. tumefaciens* γίνεται με καρμπενικιλίνη (*Carb^r*).

pYES2 : πλασμιδιακός φορέας έκφρασης (5.859kb) στον οποίο η κλωνοποίηση γίνεται μεταξύ των περιοχών P_{GALI} (*GALI/GAL10* promoter region) και T_{CYC1} (*CYC1* transcription termination signal sequence), βρίσκεται σε υψηλό αριθμό αντιγράφων στη ζύμη χάρη στο 2μm πλασμιδιακό εναρκτήριο σημείο αντιγραφής συμπληρώνει την αυξοτροφία σε ουρακίλη (*URA3*) στη ζύμη και παρέχει ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη (*Amp^r*) σε βακτηριακά στελέχη.

pAP1Z : χίμαιρα που φέρει υποκινητή που επάγει την έκφραση *lacZ* γονιδίου παρουσία H_2O_2 , συμπληρώνει την αυξοτροφία σε ουρακίλη (*URA3*) στη ζύμη.

pEH22 : κατασκευή του Yep24 πλασμιδιακού φορέα (7769 bp) σε *BamHI* θέση κλωνοποίησης, με ένθετο DNA 10 kb από το γένωμα άγριου τύπου στελέχους του *Saccharomyces cerevisiae* με πέψη με *Sau3AI*. Το 10 kb ένθετο φέρει το 4503 bp ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου *SNQ2* (Haase et al, 1992).

pSTS1 : κατασκευή του YEp13 πλασμιδιακού φορέα (10639 bp) με ένθετο DNA που περιέχει το *PDR5* γονίδιο.

YEp352/CERC1 : κατασκευή του Yep352 πλασμιδιακού φορέα (5.18kb) σε *BamHI* θέση κλωνοποίησης με ένθετο DNA 4.985bp από το γένωμα άγριου τύπου στελέχους του *Saccharomyces cerevisiae* με πέψη με *Sau3AI* (από γενωμική βιβλιοθήκη)

YEp352/YNR074c : κατασκευή του Yep352 πλασμιδιακού φορέα (5.18kb) σε *BamHI* θέση κλωνοποίησης με ένθετο DNA 3.373bp από την κατασκευή YEp352/CERC1 μετά από πέψη με *Sau3AI/BglII*

pRS316/YNR074c : κατασκευή του pRS316 πλασμιδιακού φορέα (4.895bp) σε *SmaI* θέση κλωνοποίησης με ένθετο το DNA 2.789kb από την κατασκευή YEp352/YNR074c μετά από πέψη με *SmaI*

Κατασκευές της παρούσας εργασίας

YEplac112/YNR074c : κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα YEplac112 (4.99kb) σε *SmaI* θέση κλωνοποίησης με ένθετο το DNA 2.789kb από την κατασκευή YEp352/YNR074c μετά από πέψη με *SmaI*

pRS314/YNR074c : κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pRS314 (4.785kb) σε *SmaI* θέση κλωνοποίησης με ένθετο το DNA 2.789kb από την κατασκευή YEp352/YNR074c μετά από πέψη με *SmaI*

pRS316/SNQ2 : κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα pRS316 (4.895kb) σε *XhoI* θέση κλωνοποίησης με ένθετο το DNA 7.5kb από την κατασκευή pEH22 μετά από πέψη με *Sall/XhoI*

pUCA7-TX/YNR074c : κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pUCA7-TX (~3.5kb) σε *BamHI* θέση κλωνοποίησης με ένθετο το DNA 1.158kb που φέρει το ORF *YNR074c* (1.137kb), προϊόν PCR, μετά από πέψη με *BamHI*

BIN-HYG-TX/YNR074c : κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα για μετασχηματισμό των φυτών BIN-HYG-TX (~10kb) σε *EcoRI/HindIII* θέσεις κλωνοποίησης με ένθετο

το DNA 1.948kb από την κατασκευή pUCA7-TX/YNR074c μετά από πέψη με *EcoRI/HindIII*

pUCA7-TX/SNQ2 : κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pUCA7-TX (~3.5kb) σε *BamHI* θέση κλωνοποίησης με ένθετο το DNA 4.524kb που φέρει το γονίδιο *SNQ2* (4.506kb), προϊόν PCR, μετά από πέψη με *BamHI*

pYES2/YNR074c : κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης pYES2 (5.859kb) σε *BamHI* θέση κλωνοποίησης με ένθετο το DNA 1.158kb από την κατασκευή pUCA7-TX/YNR074c μετά από πέψη με *BamHI*

pUC19[ΔYNR074c::URA3] : το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης *YNR074c* κλωνοποιήθηκε σε *SmaI* θέση του pUC19 πλασμιδιακού φορέα (2686 bp). Σε *EcoRV* θέση αυτής της κατασκευής και αφού αφαιρέθηκε το ενδιάμεσο κομμάτι έγινε σύνδεση (ligation) του *URA3* γονιδίου (1166 bp) μετά από πέψη με *HindIII* και fill in με Klenow.

Θρεπτικά υλικά ανάπτυξης

Για την ανάπτυξη των στελεχών του *E.coli* αλλά και του *A.tumefaciens* χρησιμοποιήθηκε LB θρεπτικό μέσο (Luria-Bertani broth) του οποίου η σύσταση είναι η εξής :

	g/lit dH ₂ O
LB : tryptone	10
yeast extract	5
sodium chloride (NaCl)	10
pH 7.5	

Για την ανάπτυξη των στελεχών του *S.cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν ελάχιστο (MYM=Minimal Yeast Medium) αλλά και πλήρες (YCM=Yeast Complete Medium ή YEPD) θρεπτικά μέσα τα οποία περιέχουν :

	g/lit dH ₂ O
MYM : YNB (Yeast Nitrogen Base) w/o amino acids	6
glucose (Glu)	20

	g/lt dH ₂ O
YEPD : yeast extract	10
bacto-peptone	20
glucose	20

Όλα τα υλικά αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο για 15min κάτω από πίεση 1.5 atm/cm³. Τα στερεά θρεπτικά υλικά περιέχουν επιπλέον 2% agar-agar (Ausubel et al current protocols, 1987).

Προκειμένου να γίνει επιλογή των φορέων κλωνοποίησης σε βακτηριακά στελέχη και σε στελέχη μυκήτων χρησιμοποιούνται κατάλληλα αντιβιοτικά και γονίδια που αποκαθιστούν αυξοτροφίες σε πυριμιδίνες (αδενίνη), πουρίνες (ουρακίλη) και αμινοξέα (λευκίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, ισολευκίνη, βαλίνη, λυσίνη, τυροσίνη). Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα :

ANTIBIΩΤΙΚΟ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicillin	100 µg/ml	
Rifampicin	50 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml	100 µg/ml
Carbenicillin	100 µg/ml	100 µg/ml

ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΒΑΣΗ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Adenine sulfate	150µM
Uracil	200µM

AMINOΞΥ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ
Leucin	2mM
Histidine	300µM
Tryptophan	400µM
Isoleucine	750µM
Valine	2.5mM
Lysine-HCl	1.5mM
Tyrosine	500µM

Επίσης, χρησιμοποιούνται φάρμακα σε διάφορες συγκεντρώσεις των οποίων ελέγχεται η ανθεκτικότητα στελεχών και κατασκευών στη ζύμη. Οι συγκεντρώσεις των stock διαλυμάτων καθώς και το μέσο διαλυτοποίησής τους αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα :

ΦΑΡΜΑΚΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ STOCK	ΜΕΣΟ ΔΙΑΛΥΣΗΣ
Cercosporin	1mM	Ethanol
4-nitroquinoline oxid	1mg/ml	Aceton
Cycloheximide	1mg/ml	Ethanol
m-AMSA	5mg/ml	Dimethyl sulfoxide
Toluidine blue	10mM	sdH ₂ O
Methylen blue	10mM	sdH ₂ O

Τα φάρμακα που είναι διαλυμένα σε οργανικούς διαλύτες φυλάσσονται σε aliquotes στους -80°C ενώ τα άλλα στους 4°C .

Οι βάσεις, τα αμινοξέα και τα φάρμακα προμηθεύονται από τη Sigma.

Γενικές μέθοδοι

Μικρής κλίμακας αλκαλική απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E.coli*

Φυγοκεντρούμε 1.5ml καλλιέργειας στις 13,000 στροφές/λεπτό για 1min.

Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 100λ διαλύματος I.

Προσθέτουμε 200λ φρέσκο διάλυμα II, αναδεύουμε αντιστρέφοντας 10 φορές χωρίς να κάνουμε vortex.

Προσθέτουμε 150λ παγωμένο διάλυμα III και αναδεύουμε απότομα. Επωάζουμε στον πάγο για 5min.

Φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 5-10min στους 4°C .

Στο υπερκείμενο προσθέτουμε 400λ phenol:chloroform (1:1), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 15sec.

Στην υδάτινη φάση προσθέτουμε 1ml pure ethanol, κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 5min.

Στο ίζημα προσθέτουμε 1ml 70% ethanol και φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 2min.

Στεγνώνουμε το ίζημα σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 65°C μέχρι να εξατμιστεί κάθε ίχνος αιθανόλης.

Αναδιαλύουμε σε 20λ sdH₂O και προσθέτουμε και RNaseA σε τελική συγκέντρωση 20μg/ml.

Διάλυμα I : 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0

Διάλυμα II : 0.2M NaOH, 1% SDS

Διάλυμα III : 5M CH₃COO⁻, 3M Na⁺ pH 5.8

Μεσαίας κλίμακας αλκαλική απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *E.coli*

Σύμφωνα με πρωτόκολλο της QIAGEN plasmid Midi preparation για καλλιέργειες 30-150ml.

Μετασηματισμός δεκτικών (competent) βακτηριακών κυττάρων *E.coli*

Ο μετασηματισμός βακτηριακών στελεχών γίνεται με στόχο την εισαγωγή και την ενίσχυση του αριθμού των αντιγράφων (amplification) διαφόρων κατασκευών.

Aliquotes δεκτικών βακτηριακών κυττάρων φυλάσσονται στους -80°C και ξεπαγώνουν αργά στον πάγο λίγο πριν να χρησιμοποιηθούν για το μετασηματισμό.

Αναμιγνύουμε 100λ δεκτικών κυττάρων με το πολύ 10λ διαλύματος DNA και επωάζουμε στον πάγο για 15min.

Κάνουμε heat-shock στους 42°C για 90sec και αμέσως μεταφέρουμε στον πάγο για 2min.

Προσθέτουμε 1ml LB θρεπτικό μέσο και επωάζουμε για 60min στους 37°C.

Φυγοκεντρούμε τα κύτταρα στις 10,000 στροφές/λεπτό για 1min, απομακρύνουμε το περισσότερο μέρος από το υπερκείμενο και απλώνουμε τα κύτταρα στην επιφάνεια κατάλληλου επιλεκτικού θρεπτικού μέσου.

Επωάζουμε στους 37°C o/n.

Μετασηματισμός κυττάρων ζύμης

Γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο για High Efficiency LiAc / SS-DNA / PEG Transformation της TRAFO Method Page (http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/human_genetics/gietz/methods).

Μέτρηση της ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης σε καλλιέργεια ζύμης-ποσοτικός προσδιορισμός (lacZ assay)

Το γονίδιο *lacZ* της *E.coli* κωδικοποιεί για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (β-galactosidase) μεταξύ των οποίων και χρωμογενή υποστρώματα. Αυτές οι ουσίες είναι άχρωμες αλλά τα προϊόντα της υδρόλυσής τους είναι έγχρωμα.

Εμβολιάζουμε 3ml MYM (προσθέτοντας τα αμινοξέα ή / και βάσεις στα οποία είναι αυξότροφο το στέλεχος) ή YEP με single colony και επωάζουμε το κατάλληλο χρονικό διάστημα αναδεύοντας στους 30°C μέχρι OD₅₅₀=0.7-1.0.

1.5ml από την παραπάνω καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 13,000 στροφές/λεπτό για 30sec και αναδιαλύουμε την πελλέτα σε 500λ Z-buffer+2-mercaptoethanol (αν το μέσο καλλιέργειας είναι YEP ξεπλένουμε το ίζημα μια φορά με Z-buffer).

Προσθέτουμε 1 σγ. διαλύματος 0.1% SDS και 2 σγ. chloroform και αναδεύουμε με vortex για 10sec. Μ' αυτή τη διαδικασία το κυτταρικό τοίχωμα της ζύμης καθίσταται διαπερατό.

Προεπωάζουμε τα κύτταρα στους 30°C για 5min.

Προσθέτουμε 100λ διαλύματος ONPG (*o*-nitrophenyl-β-D-galactoside) 4mg/ml (περίσσεια χρωμογενούς υποστρώματος) και μετράμε το χρονικό διάστημα που περνά από τη στιγμή που προστέθηκε το ONPG μέχρι τη στιγμή που το διάλυμα κιτρινίζει στους 30°C σε min.

Τότε σταματάμε την αντίδραση προσθέτοντας 500λ Na₂CO₃ 1M (αύξηση του pH σε 11 και απενεργοποίηση της ενεργότητας του ενζύμου).

Φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 1min και φωτομετρούμε το υπερκείμενο στα 420nm.

Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης υπολογίζεται από τη σχέση :
$$U = (1000 \times OD_{420}) / (t \times v \times OD_{550})$$
 όπου v=1.5ml και t= ο χρόνος επώασης στους 30°C σε min.

Z-buffer : 60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 40mM 2-mercaptoethanol. Το Z-buffer φτιάχνεται χωρίς 2-mercaptoethanol η οποία προστίθεται λίγο πριν να χρησιμοποιηθεί και το υπόλοιπο φυλάσσεται στους 4°C.

Το διάλυμα ONPG (*o*-nitrophenyl-β-D-galactoside) είναι φωτοευαίσθητο και φυλάσσεται στους 4°C.

Επιβοηθούμενη-τριμερής βακτηριακή σύζευξη (triparental conjugation)

Οι βακτηριακές συζεύξεις πραγματοποιούνται ανάμεσα σε στελέχη του ίδιου ή διαφορετικών ειδών με διαφορετικούς γενετικούς δείκτες ώστε να γίνεται εύκολα η επιλογή του μετασυζευγμένου δέκτη.

Στην επιβοηθούμενη-τριμερή βακτηριακή σύζευξη, το κύτταρο βοηθός (H=helper) φέρει συζευκτικό πλασμίδιο το οποίο παρακινεί πλασμίδιο του δότη (DO=donor), το οποίο είναι μεν μη συζευκτικό αλλά φέρει εναρκτήριο σημείο συζευκτικής μεταφοράς (oriT) και παρακινητικά γονίδια (mob), να μεταφερθεί στο κύτταρο του δέκτη (RE=receptor).

Single colonies των τριών στελεχών μεγαλώνουν ο/η σε κατάλληλα επιλεκτικά υγρά θρεπτικά μέσα. Την επόμενη μέρα μετράμε OD₆₀₀ και αραιώνουμε και αραιώνουμε τις καλλιέργειες έτσι ώστε η αναλογία DO:H:RE να είναι 10:1:10.

Αναμιγνύουμε 100λ από κάθε αραιωμένη καλλιέργεια και φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 1min. Ξεπλένουμε το ίζημα με LB έτσι ώστε να απομακρυνθούν όσο το δυνατόν τα αντιβιοτικά επιλογής των τριών στελεχών και επαναδιαλύουμε σε 200λ LB.

Κάνουμε 2 spots των 100λ στην επιφάνεια τρυβλίου με LB και επωάζουμε στους 30°C ο/η (εφ' όσον ο δέκτης είναι στέλεχος *A.tumefaciens*).

Την επόμενη μέρα επαναδιαλύουμε δυο «λουπιές» από τις αποικίες που μεγάλωσαν στις σταγόνες, σε 500λ LB και απλώνουμε στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού μέσου επιλογής των μετασυζευγμένων.

Για να ελέγξουμε αν οι αποικίες του *Agrobacterium* είναι μετασυζευγμένες, κάνουμε αλκαλική απομόνωση DNA, η οποία τελικά δίνει «βρώμικο» πλασμδιακό DNA με πρόσμιξη από γενωμικό, και αυτό το μίγμα χρησιμοποιείται για μετασχηματισμό δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, απ' όπου κατόπιν με αλκαλική απομόνωση πλασμδιακού DNA πάλι ελέγχεται αν η αρχική αποικία του *Agrobacterium* έφερε το πλασμίδιο. Άλλος τρόπος είναι να γίνει Southern hybridization στο *Agrobacterium*.

Έλεγχος σταγόνων διαδοχικής αραιώσεως (spot test)

Για τη μελέτη της ευαισθησίας στελεχών ζύμης σε διάφορα φάρμακα ο/η υγρές καλλιέργειες σε ελάχιστο ή πλήρες θρεπτικό υλικό αραιώνονται μέχρι OD₆₀₀=0.5 και σταγόνες 5μl από αραιώσεις 0, 1:10, 1:100 και 1:1000 τοποθετούνται στην επιφάνεια κατάλληλων επιλεκτικών θρεπτικών μέσων σε τρυβλία-petri με agar που περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις του κάθε φαρμάκου.

Σύνδεση μεταξύ συμπληρωματικών άκρων DNA (ligation of cohesive termini)

Η σύνδεση μεταξύ των συμπληρωματικών άκρων (sticky ends) DNA φορέα-ένθετου απαιτεί καθαρότητα και των δύο αυτών μορίων DNA και όσο το δυνατόν πιο χαμηλό όγκο αντίδρασης. Αρχικά το μίγμα φορέα-ένθετου επωάζεται στους 65°C για το πολύ 3min ώστε να ανοίξουν τυχόν δεσμοί υδρογόνου και άλλες χαλαρές συνδέσεις. Κατόπιν βυθίζουμε το μίγμα στον πάγο και προσθέτουμε το ligation buffer σε τελική συγκέντρωση 1x και την T₄ DNA ligase. Η επώαση γίνεται στους 16°C για τουλάχιστον 4h (συνήθως ο/η). Για να αυξήσουμε την αποδοτικότητα της αντίδρασης 4-8 φορές χρησιμοποιούμε κύκλους των 60sec για θερμοκρασίες 10°C και 30°C (30sec στην κάθε θερμοκρασία) (Lund A.H. et al, 1996).

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR=Polymerase Chain Reaction)

Για την κλωνοποίηση των δύο γονιδίων που βρέθηκε στην παρούσα εργασία ότι σχετίζονται ανεξάρτητα-εναλλακτικά με την ανθεκτικότητα σε κερκοσπορίνη στη ζύμη, σχεδιάστηκαν τα παρακάτω ολιγονουκλεοτίδια :

YNR074c :

oligo1(left) : 5'-cgcggatcccaggaagagcagagaaagg-3'

oligo2(right) : 5'-cgcggatcccgcgtgcagttcatatttagtc-3'

YDR011w (SNQ2) :

oligo1(left) : 5'-cgcggatccatgagcaatatcaaaagcacgcaaga-3'

oligo2(right) : 5'-cgcggatccggttatctgaagccacattactg-3'

Οι υπογραμμισμένες αλληλουχίες είναι *BamHI* περιοριστικές θέσεις που σχεδιάστηκαν ειδικά για την κλωνοποίηση των γονιδίων αυτών σε κατάλληλους φορείς.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έγινε χρησιμοποιώντας το Explant Long Template PCR System μίγμα πολυμερασών της Boehringer Mannheim.

Επαγωγή γονιδίων στη ζύμη μετά από επίδραση φαρμάκου

Η διαδικασία της επαγωγής γίνεται αφού το στέλεχος της ζύμης έχει μεγαλώσει σε υγρή καλλιέργεια YEPD αναδεδυόμενη με 220 στροφές/λεπτό στους 30°C μέχρι OD₆₀₀=0.4. Κατόπιν προστίθεται το φάρμακο σε κατάλληλη συγκέντρωση και συνεχίζεται η επώαση της καλλιέργειας σύμφωνα με τις παραπάνω συνθήκες και

παρουσία φωτός (εφ' όσον το φάρμακο είναι φωτοενεργοποιούμενο) για 1-2h. Ακολουθεί απομόνωση ολικού RNA.

Απομόνωση ολικού RNA ζύμης με τη μέθοδο της όξινης φαινόλης (hot acid phenol protocol)

25ml καλλιέργειας ζύμης φυγοκεντρώνται στις 4,000 στροφές/λεπτό για 5min. Ξεπλένουμε το ίζημα με sdH₂O.

Αναδιαλύουμε το ίζημα σε 500λ lysis buffer και προσθέτουμε ίσο όγκο όξινη φαινόλη pH=5.0.

Επιάζουμε στους 65°C για 1h αναδεύοντας με vortex κάθε 15-20min.

Επιάζουμε στον πάγο για 5min και κατόπιν προσθέτουμε 1/10 του όγκου (100λ) 3M CH₃COONa pH=5.3.

Φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 5min στους 4°C.

Στην υδάτινη φάση προσθέτουμε ίσο όγκο phenol:chloroform (1:1) και φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 5min.

Μεταφέρουμε την υδάτινη φάση, προσθέτουμε ίσο όγκο chloroform και φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 5min.

Μεταφέρουμε την υδάτινη φάση και προσθέτουμε 2.5 όγκους ethanol.

Φυγοκεντρούμε στις 13,000 στροφές/λεπτό για 5min και αφήνουμε την πελλέτα να στεγνώσει.

Αναδιαλύουμε σε 50λ H₂O-DEPC.

Lysis buffer : 10mM Tris-HCl pH=7.5, 10mM EDTA pH=8.0, 0.5% SDS.

Υβριδισμός Northern (Northern hybridization)

Η *ηλεκτροφόρηση του ολικού RNA* γίνεται σε gel φορμαλδεΐδης (Sambrook et al lab manual, 1989).

Ακολουθεί *μεταφορά του αποδιατεταγμένου RNA* σε νάυλον μεμβράνη (Sambrook et al lab manual, 1989).

Η κατασκευή του κατάλληλου ανιχνευτή (probe) γίνεται είτε με Random Priming είτε με PCR.

Σήμανση με τυχαίους εναρκτές (Random Priming)

Αναμιγνύουμε DNA και H₂O σε τελικό όγκο 8.5λ και βράζουμε το μίγμα για 2-3min.

Μεταφέρουμε αμέσως στον πάγο.

Προσθέτουμε 11.5λ LS 2x, 2λ dATP-P³²(10mCi/ml), 2λ dCTP-P³²(10mCi/ml), 1λ Klenow fragment (5u/μl, Promega).

Επωάζουμε στους 37°C για 30min-2h.

LS 2x : HEPES 1M pH 6.6 : DTM : pd(N)₆ (25 : 25 : 7)

DTM : 0.1mM dGTP, 0.1mM dTTP in TM (250mM Tris-HCl pH 8.0, 25mM MgCl₂, 50mM β-mercaptoethanol

Pd(N)₆ : 1mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA pH 7.5, 90 units/ml oligos (random primers) (Pharmacia Biotech)

Σήμανση DNA (DNA labelling) με PCR

Αν έχουμε ολιγονουκλεοτίδια συμπληρωματικά του DNA για το οποίο θέλουμε να φτιάξουμε τον ανιχνευτή, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Η σήμανση γίνεται με dATP-P³² 10μCi και συγκεντρώσεις dCTP, dGTP και dTTP 125μM.

Ο διαχωρισμός του ανιχνευτή από τα μη ενσωματωμένα ραδιενεργά νουκλεοτίδια γίνεται μετά από φυγοκέντριση του μίγματος μέσα από κολώνα Shephadex S-200 (Pharmacia Biotech).

Ακολουθεί **προ-υβριδισμός** της νάυλον μεμβράνης όπου έγινε η μεταφορά του RNA σε διάλυμα church στους 65°C για 2h έως ο/n.

Ο **υβριδισμός** γίνεται αφού προσθέσουμε τον ανιχνευτή σε 15ml διαλύματος church, στους 65°C ο/n.

Διάλυμα church : 0.5M Na₃PO₄ pH=7.0, 1% BSA, 7% SDS, 1mM EDTA.

Το ξέπλυμα της μεμβράνης από τον ανιχνευτή που μπορεί να προσδέθηκε σε μη ειδικά σημεία γίνεται με 2xSSC, 0.1%SDS και ανάδευση στους 65°C.

Διάλυμα 20xSSC : 3M NaCl, 0.34M κιτρικό νάτριο (sodium citrate) pH=7.0.

Η **έκθεση** της μεμβράνης γίνεται σε film Kodak X-OMAT AR με 2 screens και στους -80°C για κατάλληλο χρονικό διάστημα ανάλογα με την ισχύ του σήματος στη μεμβράνη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η δράση της κερκοσπορίνης δεν οδηγεί σε αναγωγή του μοριακού οξυγόνου (O_2) σε δραστικό υπεροξείδιο του υδρογόνου(H_2O_2).

Όπως είναι γνωστό η δράση της κερκοσπορίνης σχετίζεται με την παραγωγή 1O_2 και O_2^- . Τα παράγωγα αυτά του οξυγόνου ως εξαιρετικά δραστικά αντιδρούν και δεσμεύονται τοπικά δημιουργώντας δευτερογενή παράγωγα οξυγόνου χαμηλότερης οξειδοαναγωγικής ενέργειας όπως H_2O_2 . Η δράση της κερκοσπορίνης επομένως θα μπορούσε να προκαλέσει ενδοκυτταρική αύξηση της συγκέντρωσης H_2O_2 . Με την εισαγωγή του πλασμιδίου pAP1Z, στο οποίο το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης είναι υπό τον έλεγχο του υποκινητή AP1 ο οποίος επάγεται από αυξημένες συγκεντρώσεις H_2O_2 , σε στελέχη ζύμης, ελέγχεται η παραπάνω υπόθεση. Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης λοιπόν θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης δραστικότητας της κερκοσπορίνης, εφόσον το H_2O_2 είναι κάποιο ενδιάμεσο προϊόν. Όμως μέτρηση της ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης στα στελέχη FT4 και YAE65 μετά από ενεργοποίηση του γονιδίου στην κατασκευή pAP1Z μετά από επίδραση H_2O_2 ή κερκοσπορίνης έδειξε ότι το H_2O_2 πιθανότατα δεν είναι ένα από τα προϊόντα δράσης της κερκοσπορίνης.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	U (ενεργότητα β-γαλακτοσιδάσης)
FT4 pAP1Z	1.369
FT4 pAP1Z+0.2mM H_2O_2	3.591 (2.5x)
FT4 pAP1Z+0.2μM κερκοσπορίνη	1.222
YAE65 pAP1Z	2.997
YAE65+0.2mM H_2O_2	8.593 (3x)
YAE65+0.2μM κερκοσπορίνη	3.006

Τόσο σε FT4 όσο και σε YAE65 στέλεχος το pAP1Z παρουσία 0.2mM H_2O_2 ενεργοποιεί την παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης 2.5 - 3 φορές. Παρουσία όμως 0.2μM συγκέντρωσης κερκοσπορίνης δε συμβαίνει κάτι αντίστοιχο και η παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης κυμαίνεται σε βασικά επίπεδα (όπως δηλαδή και στο μάρτυρα). Επιβεβαιώνεται έτσι ότι η δράση της κερκοσπορίνης δε σχετίζεται με την παραγωγή H_2O_2 .

Έλεγχος γονιδίων MDR όσον αφορά τη δυνατότητα που έχουν να παρέχουν προστασία από την κερκοσπορίνη

Η ομοιότητα (40-60% identity) του γονιδιακού προϊόντος *cLE6* της *C. kikuchii* με την Sge1p του *S. cerevisiae*, μέλος της οικογένειας MFS-MDR και η απόρριψη τελικά της συμμετοχής της Sge1p στο μεταβολισμό της κερκοσπορίνης ή / και στην παροχή ανθεκτικότητας στην τοξίνη στη ζύμη, μας οδήγησε στην αναζήτηση κάποιων άλλων γονιδίων MDR τα οποία πιθανόν να σχετίζονται με την αποτοξίνωση από την κερκοσπορίνη με μηχανισμό εξώθησης από το κύτταρο (efflux mechanism).

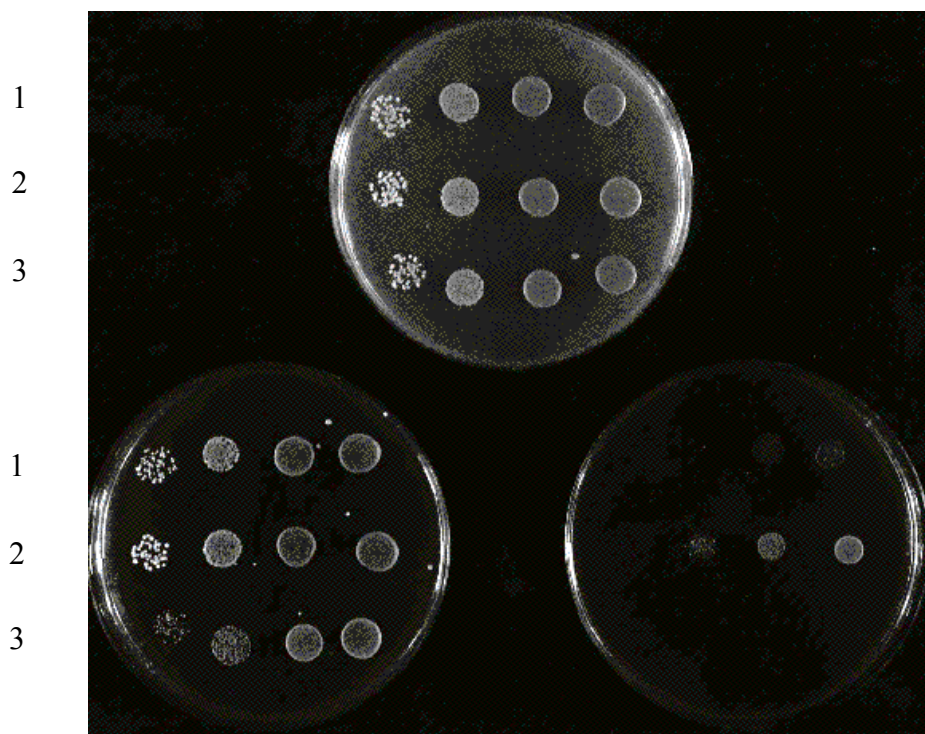
Έτσι έγινε επιλογή και ανάλυση της ικανότητας ορισμένων αντιπροσωπευτικών μελών των οικογενειών MFS και ABC να προσφέρουν ανθεκτικότητα στην κερκοσπορίνη όταν εκφράζονται από υψηλό αριθμό αντιγράφων. Τα γονίδια που μελετήθηκαν ήταν τα εξής : *SNQ2*, *PDR5* (μεταφορείς ABC), *HOLI*, *YM4587*, *YHR048w*, *YHL040c*, *YHL047c* (MFS-MDR). Τα αποτελέσματα δοκιμής σταγόνων που έγιναν σε ελάχιστο (MYM) και σε πλήρες (YEPD ή YPD) θρεπτικό μέσο με κερκοσπορίνη καταγράφονται στον ακόλουθο πίνακα.

Η κλίμακα μέτρησης των αποτελεσμάτων αφορά κατά μέσο όρο όλες τις αραιώσεις και με ένδειξη 0 εννοείται καμία απολύτως ανάπτυξη ενώ με ένδειξη 10 έχουμε πλήρη ανάπτυξη όπως στο μάρτυρα (ανάπτυξη απουσία τοξίνης).

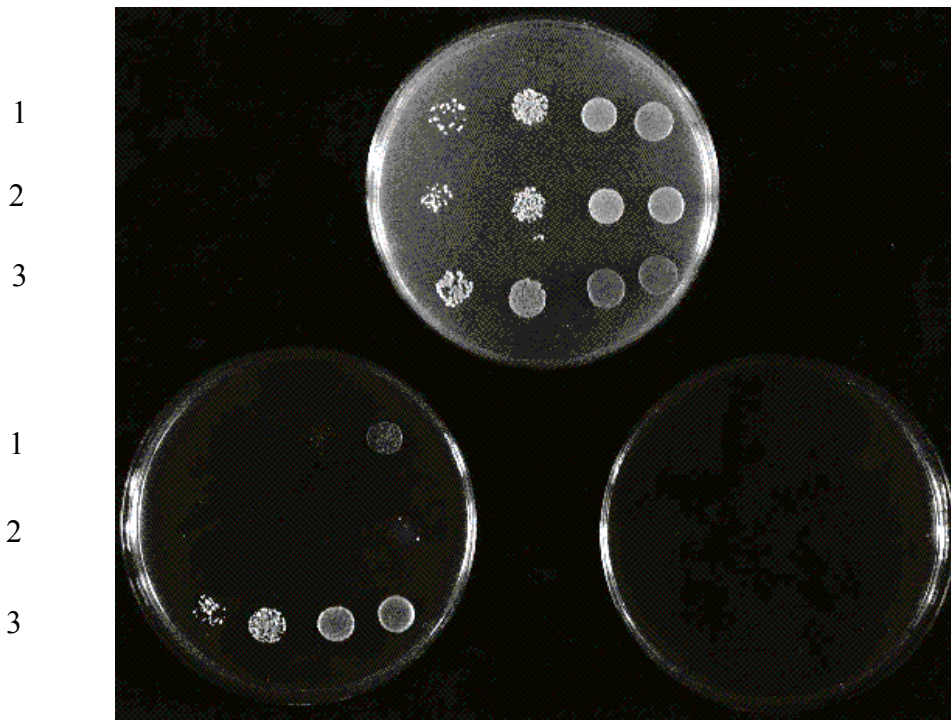
ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	MYM+1μM κερκοσπ.	MYM+2μM κερκοσπ.	YPD+2μM κερκοσπ.	YPD+5μM κερκοσπ.
YRH98 YEp24		0	0	9	0.5
YRH98 pEH22		0	0	10	4
YRH98 (Δ <i>SNQ2</i>)		0	0	5	0
YRH500 YEp13		0	0	0	0
YRH500 pSTS1		0	0	0	0
YKKB13 YEp13		0	0	6	0
R757		0	0	10	10
R2903		0	0	10	10
4586		0	0	0	0

4585	0	0	0	0
YHR048	0	0	0	0
(Δ28)	0	0	0	0
YHL040	0	0	0	0
(Δ170)	0	0	0	0
YHL047	0	0	0	0
(Δ163)	0	0	0	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : Έλεγχος γονιδίων MDR (*PDR5*, *SNQ2*, *HOL1*) και ORFs της ίδια ομάδας (*YM4587*, *YHR048w*, *YHL040c*, *YHL047c*) ως προς τη δυνατότητα παροχής προστασίας από την κερκοσπορίνη.



Εικ.3Α. Έλεγχος σταγόνων στα στελέχη 1. YPH98 YEp24, 2. YPH98 pEH22, 3. YPH98 (Δ SNQ2) σε YCM χωρίς κερκοσπορίνη (κέντρο πάνω), με 2μM (αριστερά κάτω) και με 5μM (δεξιά κάτω) κερκοσπορίνη.



Εικ.3B. Έλεγχος σταγόνων στα στελέχη 1. YPH500 YEp13, 2. YPH500 pSTS1, 3. YKKB13 YEp13 σε YCM χωρίς κερκοσπορίνη (κέντρο πάνω), με 2µM (κάτω αριστερά) και με 5µM (κάτω δεξιά) κερκοσπορίνη.

Παρατηρούμε ότι ανθεκτικότητα στην κερκοσπορίνη δεν προσφέρεται από τον κλώνο *PDR5* είτε βρίσκεται σε ένα αντίγραφο (στο γονιδίωμα του οργανισμού-YPH500 YEp13) είτε βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα σε κάποιο φορέα πολλαπλών αντιγράφων (YPH500 pSTS1) ούτε σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο αλλά ούτε και σε πλήρες (πιν.1, εικ.3B). Ομοίως δεν προσφέρεται ανθεκτικότητα και από τα 4 ORFs όταν βρίσκονται σε ένα αντίγραφο στο γονιδίωμα (στελέχη 4586, YHR048, YHL040 και YHL047). Διάκριση μεταξύ αυτών των στελεχών και εκείνων που φέρουν έλλειψη του αντίστοιχου γονιδίου [στελέχη 4585, (Δ28), (Δ170), (Δ163) αντίστοιχα] δεν υπάρχει επίσης. Η ανθεκτικότητα σε κερκοσπορίνη του στελέχους που φέρει το γονίδιο *HOLI* σε ένα ή σε κανένα αντίγραφο [στελέχη R757 και R2903 (*HOLI* disruption) αντίστοιχα] είναι ενδογενής και αυτό επιβεβαιώνεται σε YCM. Μόνο ο κλώνος *SNQ2* έδωσε ανθεκτικότητα σε κερκοσπορίνη σε πλήρες θρεπτικό μέσο, μεγαλύτερη όταν βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα (YPH98 pEH22) και μικρότερη όταν βρίσκεται σε ένα αντίγραφο (YPH98 YEp24) μέχρι και σε συγκέντρωση 5µM κερκοσπορίνης (πιν.1, εικ.3A).

Προστασία στελεχών *Saccharomyces cerevisiae* από την κερκοσπορίνη με υπερέκφραση του ORF *YNR074c*

Ο κλώνος *CERC1* της γενωμικής βιβλιοθήκης του στελέχους άγριου τύπου S288C της ζύμης, που προσφέρει ανξεκτικότητα στην κερκοσπορίνη, περιλαμβάνει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, τα *YNR073c* και *YNR074c* (Ververidis et al, in preparation). Έλεγχος του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης *YNR074c* ως προς τη δυνατότητα που έχει να προσφέρει ανθεκτικότητα σε κερκοσπορίνη σε ελάχιστο και σε πλήρες θρεπτικό υλικό είχε σαν αποτέλεσμα να μη μεγαλώνει κανένα από τα στελέχη σε MYM ενώ να μεγαλώνουν τα στελέχη YAE65 που φέρουν τον κλώνο *CERC1* ή το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης *YNR074c* σε πολλαπλά αντίγραφα σε YCM ακόμα και σε συγκέντρωση κερκοσπορίνης 5μM. Τα στελέχη με ένα (YAE65 pRS314 και YAE65 YEp352) ή κανένα [YAE65 (Δ *YNR074c*)] αντίγραφο ή μικρό αριθμό (YAE65 pRS314/*YNR074c*) αντιγράφων *YNR074c* δε μπορούν να αναπτυχθούν σε υψηλή συγκέντρωση κερκοσπορίνης (πίνακας 2). Το στέλεχος FT4 δεν προσφέρει κατάλληλο υπόβαθρο για συγκρίσεις.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	MYM+1Μμ κερκοσπ.	MYM+2μM κερκοσπ.	YPD+2μM κερκοσπ.	YPD+5μMκ ερκοσπ.
FT4 YEp352		0	0	2	1
FT4 YEp352/ <i>CERC1</i>		0	0	2	1
FT4 YEp352/ <i>YNR074c</i>		0	0	2	1
FT4 (Δ <i>YNR074c</i>)		0	0	1	0.5
YAE65 pRS314		0	0	8	0
YAE65 pRS314/ <i>YNR074c</i>		0	0	10	0
YEA65 (Δ <i>YNR074c</i>)		0	0	3	0
YEA65 YEp352		0	0	10	0
YEA65 YEp352/<i>YNR074c</i>		0	0	10	4
YEA65 YEp352/<i>CERC1</i>		0	0	10	2

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 : Προστασία της ζύμης από την κερκοσπορίνη μετά από υπερέκφραση του ORF *YNR074c* σε ποικίλο γενετικό υπόβαθρο.

***SNQ2* και *YNR074c* εναντίον κερκοσπορίνης. Συνεργατική ή μεμονωμένη δράση;**

Ακόμα μία φορά επιβεβαιώνεται ότι το *YNR074c* δεν προσφέρει στο στέλεχος FT4 προστασία από την κερκοσπορίνη σε πλήρες θρεπτικό υλικό, είτε βρίσκεται σε ένα αντίγραφο, είτε βρίσκεται σε χαμηλό ή υψηλό αριθμό αντιγράφων. Συνεπώς, αν και οι αρχικές ενδείξεις ήταν διαφορετικές, αναγκαζόμαστε να αντικαταστήσουμε το στέλεχος FT4 στα πειράματά μας με το YPH98 το οποίο είναι επίσης άγριος τύπος.

Το YAE65 στέλεχος παρουσιάζει μια μικρή διαφορά στην αύξηση σε πλήρες θρεπτικό υλικό από τα 3.5μM κερκοσπορίνης, όταν φέρει το *YNR074c* σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων και σε πολλαπλά αντίγραφα. Αυτή η διαφορά μεγαλώνει στα 5μM για το στέλεχος με πολλαπλό αριθμό αντιγράφων *YNR074c*, ενώ με ένα μόνο ή κανένα αντίγραφο δεν έχουμε ανάπτυξη (πίνακας 2). Σε 7μM κερκοσπορίνης το στέλεχος με τον πολλαπλό αριθμό αντιγράφων είναι το μόνο που μεγαλώνει κάπως (μη παρουσιάσιμα αποτελέσματα).

Επανάληψη του ελέγχου για το *SNQ2* αποκαλύπτει ότι το εν λόγω γονίδιο προσδίδει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο YPH98 στέλεχος όταν βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα σε χαμηλή ακόμα συγκέντρωση κερκοσπορίνης (2μM) σε πλήρες θρεπτικό υλικό (εικ.3A). Αυτή η διαφορά φαίνεται ακόμα περισσότερο στα 5μM κερκοσπορίνης (εικ.3A).

Η ανάπτυξη σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό δε μας βοηθάει να βγάλουμε κάποιο συμπέρασμα για ένα από τα δύο γονίδια. Στο πλήρες θρεπτικό μέσο όμως το *YNR074c* και ακόμη περισσότερο το *SNQ2* προσφέρουν ανθεκτικότητα σε πολλαπλά αντίγραφα. Τα στελέχη λοιπόν που εμφανίζουν κάποια ανθεκτικότητα στην κερκοσπορίνη είναι τα YPH98 hc(high copy)*SNQ2* που έχει sc(single copy)*YNR074c* στο γονιδίωμα και YAE65 hc*YNR074c* που πιθανά έχει sc*SNQ2* και τα αποτελέσματα αυτά είναι επαναλήψιμα.

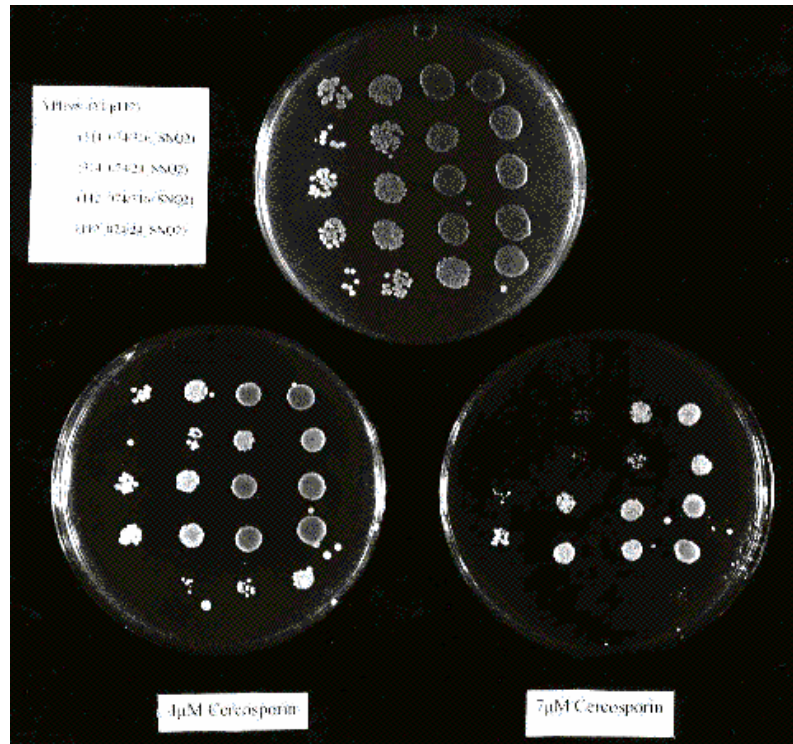
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ή να απορριφθεί η υπόθεση ότι τα δύο γονίδια δρουν μέσα στο κύτταρο με κάποιο τρόπο συνεργατικά, δημιουργήθηκαν κατασκευές των *YNR074c* και *SNQ2* σε υψηλού και χαμηλού αριθμού αντιγράφων φορείς και μετά από εισαγωγή τους σε διάφορους συνδυασμούς (1c*YNR074c* 1c*SNQ2*, 1c*YNR074c* hc*SNQ2*, hc*YNR074c* 1c*SNQ2*, hc*YNR074c* hc*SNQ2*) στο στέλεχος YPH98, ελέγχθηκαν ως προς την ανθεκτικότητα που παρέχουν σε κερκοσπορίνη (πίνακας 5, εικ.4). Εκτός από το στέλεχος FT4 και το YAE65 φαίνεται πως δεν είναι πολύ

χρήσιμο ως γενετικό υπόβαθρο για τη διάκριση των *lcYNR074c*, *hcYNR074c*, *lcSNQ2* και *hcSNQ2* στην προστασία που παρέχουν απέναντι στην κερκοσπορίνη. Έτσι τα πειράματα συνεχίζονται με το στέλεχος YPH98. Ενδεικτικά γίνεται και έλεγχος σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	MYM +0.5μM κερκοσπ.	MYM +1μM κερκοσπ.	YPD +4μM κερκοσπ.	YPD +7μM κερκοσπ.
YPH98 pRS314		-	-	10	0.5
YPH98 pRS314/ <i>YNR074c</i>		2	2	9	2
YPH98 (Δ <i>YNR074c</i>)		0.5	0	5	1
YPH98 Yeplac112		0.5	0.5	10	2
YPH98 Yeplac112/ <i>YNR074c</i>		6	5	9	9
YPH98 pRS316		1	0.5	9	2
YPH98 pRS316/ <i>SNQ2</i>		1	0.5	10	2
YPH98 (Δ <i>SNQ2</i>)		0.5	0	6	1
YPH98 YE _p 24		1	0.5	10	1
YPH98 pEH22		0.5	0.5	9	4
YPH98 pRS314/ <i>YNR074c</i> pRS316/ <i>SNQ2</i>		-	-	10	1
YPH98 pRS314/ <i>YNR074c</i> pEH22		8	2	9	3
YPH98 Yeplac112/ <i>YNR074c</i> pRS316/ <i>SNQ2</i>		5	2	9	5
YPH98 Yeplac112/ <i>YNR074c</i> pEH22		-	-	4	0.5

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 : Έλεγχος της συνεργατικής δράσης των προϊόντων του γονιδίου *SNQ2* και του ORF *YNR074c* στην προστασία που παρέχουν απέναντι στην κερκοσπορίνη.

Εικ.4. Έλεγχος σταγόνων των στελεχών YPH98 YEplac112, YPH98 pRS314/*YNR074c* pRS316/*SNQ2*, YPH98 pRS314/*YNR074c* pEH22, YPH98 YEplac112/*YNR074c* pRS316/*SNQ2*, YPH98 YEplac112/*YNR074c* pEH22 σε YCM χωρίς κερκοσπορίνη (πάνω κέντρο), με 4μM (κάτω αριστερά) και με 7μM (κάτω δεξιά) κερκοσπορίνη.



Αρχικά παρατηρούμε ότι οι μάρτυρες YPH98 pRS314, YPH98 pRS314/*YNR074c* pRS316/*SNQ2* και YPH98 YEplac112/*YNR074c* pEH22 δε μεγάλωσαν καθόλου στο ελάχιστο θρεπτικό μέσο. Μια εξήγηση που μπορεί να δοθεί για τα YPH98 pRS314/*YNR074c* pRS316/*SNQ2* και YPH98 YEplac112/*YNR074c* pEH22 (και κυρίως για το τελευταίο) είναι ότι η υπερέκφραση μεμβρανικών πρωτεϊνών γενικά παρεμποδίζει τις λειτουργίες της ζύμης (Romanos et al, 1992). Εν τω μεταξύ και οι ο/η υγρές καλλιέργειες (από μία αποικία) από τις οποίες έγινε η δοκιμή σταγόνων για τα στελέχη YPH98 pRS314, YPH98 YEplac112/*YNR074c* pEH22 και ακόμα περισσότερο για τα στελέχη YPH98 pRS314/*YNR074c* pRS316/*SNQ2* και YPH98 YEplac112/*YNR074c* pRS316/*SNQ2* δεν είχαν αναπτυχθεί ιδιαίτερα. Εν τούτοις το YPH98 YEplac112/*YNR074c* pRS316/*SNQ2* είναι ένα από τα στελέχη που εμφανίζει ικανοποιητική ανθεκτικότητα στην κερκοσπορίνη.

Στο ελάχιστο θρεπτικό μέσο τα στελέχη που φαίνεται να είναι ανθεκτικά στην κερκοσπορίνη είναι τα YPH98 YEplac112/*YNR074c*, YPH98 pRS314/*YNR074c* pEH22 και YPH98 YEplac112/*YNR074c* pRS316/*SNQ2*. Στο πλήρες θρεπτικό υλικό επιπλέον το στέλεχος YPH98 pEH22 είναι ανθεκτικό σε υψηλές συγκεντρώσεις κερκοσπορίνης (πιν.3). Αντιθέτως, το στέλεχος YPH98 YEplac112/*YNR074c* pEH22 φαίνεται ότι δεν αντέχει την υπερέκφραση δύο μεμβρανικών πρωτεϊνών από υψηλού αριθμού αντιγράφων φορείς ακόμα κι αν αυτές μπορεί να του προσφέρουν πλεονέκτημα για την αύξησή του (πιν.3, εικ.4).

Έλεγχος *SNQ2* και *YNR074c* ως προς την ανθεκτικότητα που παρέχουν απέναντι στο κυκλοεξιμίδιο (CHX).

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το *PDR5* είναι εκείνο το γονίδιο που σε υψηλό αριθμό αντιγράφων προσφέρει ανθεκτικότητα σε κυκλοεξιμίδιο (Meyers et al, 1992). Ο έλεγχος του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης *YNR074c* και του *SNQ2* γονιδίου ως προς την ανθεκτικότητα που προσφέρουν σε κυκλοεξιμίδιο σε ελάχιστο και πλήρες θρεπτικό υλικό οδήγησε στα αποτελέσματα των πινάκων 4 και 5. Επίσης οι δοκιμές ανθεκτικότητας έγιναν και σε ελάχιστο θρεπτικό υλικό. Ορισμένα από αυτά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται.

Η ένδειξη (0.5) σημαίνει ότι η ανάπτυξη είναι σχεδόν μηδενική ενώ στις δοκιμές με – για κάποιο λόγο δεν είχαμε ανάπτυξη ούτε στον μάρτυρα.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	MYM +0.5μg/ml κυκλοεξ.	MYM +2μg/ml κυκλοεξ.	YPD +0.5μg/ml κυκλοεξ.	YPD +2μg/ml κυκλοεξ.
FT4 pRS316		0	0	1	0
FT4 pRS316/ <i>YNR074c</i>		0	0	1	0
FT4 (Δ <i>YNR074c</i>)		0	0	1	0
FT4 YE _{p352}		0	0	1	0
FT4 YE _{p352} / <i>YNR074c</i>		0	0	1	0
YEA65 pRS316		1	(0.5)	2	0
YEA65 pRS316/ <i>YNR074c</i>		1	(0.5)	2	0
YEA65 (Δ <i>YNR074c</i>)		1	0.5	2	0
YEA65 YE _{p352}		1	0	2	0
YEA65 YE _{p352} / <i>YNR074c</i>		1	0	2	0
<u>YPH98 pRS314</u>		-	-	0	0
YPH98 pRS314/ <i>YNR074c</i>		-	-	0	0
YPH98 (Δ <i>YNR074c</i>)		-	-	0	0
YPH98 YE _{plac112}		-	-	0	0
YPH98 YE _{plac112} / <i>YNR074c</i>		-	-	0	0
YPH98 YE _{p24}		(0.5)	0	1	0

<u>YPH98 pEH22</u>	0	0	0.5	0
YPH98 (Δ SNQ2)	0	0	1	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 4 : Έλεγχος προστασίας που παρέχουν τα *SNQ2* και *YNR074c* στη ζύμη απέναντι στο κυκλοεξιμίδιο σε διαφορετικά γενετικά υποστρώματα.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	YPD+0.5μg/ml κυκλοεξιμίδιο	YPD+2μg/ml κυκλοεξιμίδιο
YEA65 pRS314		0	0
YEA65 pRS314/ <i>YNR074c</i>		2	0
YEA65 (Δ <i>YNR074c</i>)		1	0
YEA65 YEplac112		3	0
YEA65 YEplac112/ <i>YNR074c</i>		2	0
YAE65 pRS316		1	0
YAE65 pRS316/ <i>SNQ2</i>		1	0
YAE65 YEρ24		0.5	0
YAE65 pEH22		0.5	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 : Έλεγχος προστασίας που παρέχουν τα *SNQ2* και *YNR074c* στη ζύμη απέναντι στο κυκλοεξιμίδιο στο στέλεχος YAE65.

Το *YNR074c* δεν προσφέρει ανθεκτικότητα στο κυκλοεξιμίδιο είτε βρίσκεται σε ένα αντίγραφο, χαμηλό ή υψηλό αριθμό αντιγράφων σε ελάχιστο ή σε πλήρες θρεπτικό υλικό και σε οποιοδήποτε γενετικό υπόβαθρο (FT4, YAE65, YPH98 στελέχη). Ομοίως και το *SNQ2*, καθώς και ελλείψεις των *YNR074c* και *SNQ2* δίνουν τα ίδια αποτελέσματα.

Έλεγχος του *SNQ2* και του *YNR074c* ως προς την ανθεκτικότητα που παρέχουν στη ζύμη σε 4-NQO.

Τα παραπάνω στελέχη ελέγχθηκαν και σε 4-NQO για να δούμε αν και το *YNR074c* όπως και το *SNQ2* προσδίδει ανθεκτικότητα σ' αυτό το φάρμακο όταν βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα.

Τα κενά αντί για κάποια ένδειξη ανθεκτικότητας σημαίνουν ότι δεν έγιναν οι αντίστοιχοι έλεγχοι.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	MYM +0.1μg/ml 4-NQO	MYM +0.25μg/ml 4-NQO	MYM +0.5μg/ml 4-NQO
YPH98 pRS314		-	-	-
YPH98 pRS314/YNR074c		10	4	0.5
YPH98 (ΔYNR074c)			9	2
YPH98 YEplac112		10	4	1
YPH98 YEplac112/YNR074c		9	3	0.5
YPH98 pRS316			6	2
YPH98 pRS316/SNQ2			9	5
YPH98 (ΔSNQ2)			5	1
YPH98 YE _p 24			9	4
YPH98 pEH22			10	10
YPH98 pRS314/YNR074c pRS316/SNQ2		-	-	-
YPH98 pRS314/YNR074c pEH22		10	10	9
YPH98 YEplac112/YNR074c pRS316/SNQ2		10	9	4
YPH98 YEplac112/YNR074c pEH22		-	-	-
ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	YPD +0.5μg/ml 4-NQO	YPD +0.75μg/ml 4-NQO	YPD +1μg/ml 4-NQO
YPH98 pRS314		5	1	0
YPH98 pRS314/YNR074c		6	1	0.5
YPH98 (ΔYNR074c)		5	1	0.5
YPH98 YEplac112		5	1	0.5
YPH98 YEplac112/YNR074c		5	1	0.5
YPH98 pRS316		5	1	0.5

YPH98 pRS316/SNQ2	8	8	7
YPH98 (Δ SNQ2)	2	0	0
YPH98 YE _p 24	4	1	0.5
YPH98 pEH22	10	9	9
YPH98 pRS314/YNR074c pRS316/SNQ2	0.5	0.5	0
YPH98 pRS314/YNR074c pEH22	9	9	9
YPH98 YE _p lac112/YNR074c pRS316/SNQ2	5	1	1
YPH98 YE _p lac112/YNR074c pEH22	1	0.5	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 6 : Έλεγχος του *SNQ2* και του *YNR074c* ως προς την ανθεκτικότητα που παρέχουν στη ζύμη σε 4-NQO σε ποικίλα γενετικά υποστρώματα.

Όπως και στον προηγούμενο έλεγχο οι μάρτυρες YPH98 pRS314, YPH98 pRS314/*YNR074c* pRS316/*SNQ2* και YPH98 YE_plac112/*YNR074c* pEH22 δε μεγάλωσαν.

Γενικά δε φαίνεται να υπάρχει σχέση του *YNR074c*, όταν υπερεκφράζεται, με ανθεκτικότητα σε 4-NQO (YPH98 YE_plac112/*YNR074c*), ενώ επιβεβαιώνεται η προστασία που παρέχει το *SNQ2* όχι μόνο όταν υπερεκφράζεται (YPH98 pEH22) αλλά και όταν βρίσκεται σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων (YPH98 pRS316/*SNQ2*) σε περιορισμένο βαθμό βέβαια. Ακόμα και το στέλεχος YPH98 pRS314/*YNR074c* pEH22 είναι ανθεκτικό σε 4-NQO, όχι όμως και το YPH98 YE_plac112/*YNR074c* pEH22 (πιν.6).

Έλεγχος των *SNQ2* και *YNR074c* ως προς την ανθεκτικότητα που προσφέρουν στους φωτοενεργοποιητές μπλε του τολουιδινίου και μπλε του μεθυλενίου.

Οι φωτοενεργοποιητές μπλε του τολουιδινίου και μπλε του μεθυλενίου ανάγουν το μοριακό οξυγόνο σε οξυγόνο "εν τω γεννάσθαι" (¹O₂). Δεδομένου ότι το

κύριο προϊόν της δράσης της κερκοσπορίνης είναι το $^1\text{O}_2$ και προκειμένου να συσχετιστεί ή όχι η αποτοξίνωση που προσφέρουν τα *SNQ2* και *YNR074c* με το σχηματισμό του δραστικού αυτού παραγώγου, ελέγχεται η ανθεκτικότητα που αυτά προσφέρουν ως προς τους παραπάνω μη φυσικούς φωτοενεργοποιητές.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	YPD+10μM TB	YPD+25μM TB	YPD+50μM TB	YPD+100μM TB
YPH98	8	1	0	0
YPH98 pRS314/ <i>YNR074c</i>	9	8	2	1
YPH98 YEplac112/ <i>YNR074c</i>	10	10	2	2
YPH98 (Δ <i>YNR074c</i>)	8	1	0	0
YPH98 pRS316/ <i>SNQ2</i>	8	2	1	0
YPH98 pEH22	9	9	8	6
YPH98 (Δ <i>SNQ2</i>)	1	0	0	0

ΠΙΝΑΚΑΣ 7 : Έλεγχος σταγόνων σε μπλε του τολουιδινίου (TB).

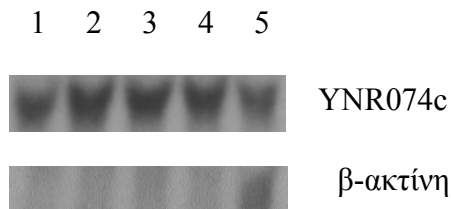
ΣΤΕΛΕΧΟΣ	YPD+10μM MB	YPD+25μM MB	YPD+50μM MB	YPD+100μM MB
YPH98	2	1	1	0.5
YPH98 pRS314/ <i>YNR074c</i>	5	5	5	5
YPH98 YEplac112/ <i>YNR074c</i>	10	8	8	8
YPH98 (Δ <i>YNR074c</i>)	2	1	1	0.5
YPH98 pRS316/ <i>SNQ2</i>	2	1	1	0.5
YPH98 pEH22	8	8	8	8
YPH98 (Δ <i>SNQ2</i>)	1	0.5	0.5	0.5

ΠΙΝΑΚΑΣ 8 : Έλεγχος σταγόνων σε μπλε του μεθυλενίου (MB).

Φαίνεται ότι τόσο το *YNR074c* όσο και το *SNQ2* όταν υπερεκφράζονται προσδίδουν ανθεκτικότητα σε methylen blue περισσότερο και σε toluidine blue λιγότερο, ακόμα και σε συγκεντρώσεις που φτάνουν τα 100Mμ (παράρτημα 2).

Έλεγχος επαγωγής της μεταγραφικής έκφρασης του *YNR074c* από διάφορα φάρμακα

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα τόσο το *YNR074c* όσο και το *SNQ2* προσφέρουν ανθεκτικότητα στην κερκοσπορίνη όταν εκφράζονται σε πολλαπλά αντίγραφα. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η σχέση αυτών των γονιδίων με την τοξίνη είναι ειδική μελετήθηκε η επαγωγή της μεταγραφικής έκφρασής τους στο άγριου τύπου στέλεχος YPH98 μετά από επίδραση για 1h κερκοσπορίνης, 4-NQO, toluidine blue και θερμικού σοκ (heat shock) στους 37°C. Το συνολικό RNA που απομονώθηκε από τις παραπάνω καλλιέργειες υβριδίστηκε με ραδιενεργούς ανιχνευτές *YNR074c* (εικ.6) και *SNQ2* (μη παρουσιάσιμα αποτελέσματα) καθώς επίσης και ανθρώπινη β-ακτίνη.



Εικ. 6. Έλεγχος επαγωγής της μεταγραφικής έκφρασης του *YNR074c* από διάφορα φάρμακα 1 : YPH98 μάρτυρας, 2 : 8μM cercosporin, 3 : 0.1μg/ml 4-NQO, 4 : 10μM TB, 5 : heat shock 37⁰C / 1h.

Όταν επιδρούμε με κερκοσπορίνη για 1h παρατηρείται ελαφρά επαγωγή (1.5-2x) του *YNR074c*. Ομοίως και όταν επιδρούμε με 4-NQO ή μπλε του τολουιδινίου. Αντιθέτως έχουμε ελάττωση της έκφρασης των γονιδίων *YNR074c* (εικ.6A) και *SNQ2* (μη παρουσιάσιμα αποτελέσματα) όταν η καλλιέργεια υφίσταται θερμικό σοκ και σταθερή έκφραση του *SNQ2* μετά από επίδραση οποιουδήποτε από τα φάρμακα (μη παρουσιάσιμα αποτελέσματα) όπως άλλωστε συμβαίνει και με όλους τους ABC μεταφορείς (Kuchler, προσωπική επικοινωνία).

Η μικρή επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *YNR074c* που προκαλείται από κερκοσπορίνη, μπλε του τολουιδινίου και 4-NQO δε θεωρείται σημαντική γεγονός το οποίο σημαίνει ότι η αλληλεπίδραση αυτών των τοξινών με το εν λόγω γονίδιο δεν είναι εξειδικευμένη.

Κατασκευές για μετασχηματισμό φυτικών ιστών

Βάσει των αποτελεσμάτων των συνδυασμών έκφρασης των *SNQ2* και *YNR074c* σε πολλαπλό αριθμό αντιγράφων προχωρούμε στη δημιουργία των κατασκευών για μετασχηματισμό φυτικού ιστού του καπνού, με σκοπό τον έλεγχο της προστασίας που παρέχουν αυτά τα γονίδια απέναντι στην κερκοσπορίνη στον καπνό.

Επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση του *YNR074c* ως προϊόντος PCR, στη θέση *BamHI* του φορέα pUCA7-TX στο σωστό προσανατολισμό και κατόπιν σε *EcoRI/HindIII* θέσεις στον φορέα BIN-HYG-TX. Η κατασκευή BIN-HYG-TX/*YNR074c* μεταφέρθηκε από στέλεχος *E.coli* XL-1-Blue όπου βρίσκονταν, συζευκτικά και με βοηθητικό στέλεχος το HB101 pRK2013, στο στέλεχος του *A. tumefaciens* C58C1 pGV2260.

Προκειμένου να ελεγχθεί η λειτουργικότητα του προϊόντος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης *YNR074c*, κλωνοποιείται σε *BamHI* θέση του φορέα έκφρασης pYES2 και γίνονται δοκιμές σταγόνων σε πλήρες θρεπτικό υλικό που για πηγή άνθρακα φέρει γαλακτόζη και διάφορες συγκεντρώσεις κερκοσπορίνης. Πράγματι φαίνεται ότι το *YNR074c*, προϊόν αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, είναι λειτουργικό και παρέχει προστασία από κερκοσπορίνη σε YAE65 στέλεχος συγκρίσιμη με αυτήν που παρέχει στην κατασκευή YEplac112/*YNR074c* (θετικός μάρτυρας - μη παρουσιάσιμα αποτελέσματα).

Η κλωνοποίηση με παρόμοιο τρόπο του γονιδίου *SNQ2* αποδείχθηκε μειονεκτική και οι προσπάθειες με βελτιωμένες για την περίπτωση συνθήκες βρίσκονται σε εξέλιξη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κερκοσπορίνη είναι μία φωτοενεργοποιούμενη χρωστική που παράγεται από τα είδη του γένους *Cercospora* και αποτελεί την πρωταρχική αιτία για την άμεση εκδήλωση της ασθένειας της κερκοσπορίωσης σε προσβεβλημένα φυτά.

Η κερκοσπορίνη μετά από τη διέγερσή της από το φως μεταφέρει αυτή την ενέργεια αλλά και ηλεκτρόνια στο μοριακό οξυγόνο και δίνει γένεση σε δραστικά παράγωγα $^1\text{O}_2$ κυρίως αλλά και $\cdot\text{O}_2^-$. Αυτά με τη σειρά τους επιτίθενται σε διάφορα κυτταρικά συστατικά – κυρίως λιπαρά οξέα του πλασμαλήμματος και του τονοπλάστη (Daub & Briggs, 1993) – τα οποία και οξειδώνουν. Κατόπιν επέρχεται καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, διαρροή ιόντων από το φυτικό κύτταρο και τελικά θάνατος.

Διάφοροι μηχανισμοί (καροτενοειδή, σύστημα ασκορβικού / γλουταθειόνης) και ένζυμα (καταλάση, υπεροξειδική δισμουτάση) που απαντώνται όχι μόνο σε βακτήρια και μύκητες αλλά και σε φυτικούς και ζωϊκούς οργανισμούς και έχουν σχέση με την αποτοξίνωση από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, δε φαίνεται να δρουν αποτελεσματικά εναντίον του $^1\text{O}_2$ (Daub, 1987; Sollod et al, 1992).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στην εισαγωγή, το προϊόν ενός cDNA (*cLE6*) κλώνου της *C. kikuchii* πιστεύονταν αρχικά ότι εμπλέκεται στη διαδικασία της παραγωγής της κερκοσπορίνης (Enhrenshaft & Urchurch, 1991). Τελικά ανακαλύφθηκε ότι θα πρέπει να σχετίζεται με το γενικότερο μεταβολισμό της τοξίνης και ότι είναι ομόλογο με την *Sge1p* της ζύμης, μέλος της MFS-MDR οικογένειας. Η ιδιότητα της πολλαπλής ανθεκτικότητας (MDR=MultiDrug Resistance) αφορά πρωτεΐνες-μεταφορείς οι οποίες καταλύουν την εξώθηση από το κύτταρο ποικίλων άσχετων μεταξύ τους υδρόφοβων τοξινών με έναν μη ειδικό ως προς τη χημική σύσταση του υποστρώματος μηχανισμό. Στη ζύμη αναγνωρίζονται δύο οικογένειες τέτοιων μεταφορέων : η οικογένεια ABC-MDR τα μέλη της οποίας κερδίζουν ενέργεια από την υδρόλυση του ATP και η οικογένεια MFS-MDR όπου η ενέργεια παρέχεται από την είσοδο πρωτονίων στο κύτταρο (μηχανισμός $\text{H}^+_{\text{IN}} / \text{DRUG}_{\text{OUT}}$). Η ομολογία του *cLE6* με μέλη της οικογένειας MFS-MDR αρχικά μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η *Sge1p* πιθανά να σχετίζεται με την εξώθηση της κερκοσπορίνης από το κύτταρο. Έλεγχος της ικανότητας του *SGE1* να παρέχει προστασία σε κερκοσπορίνη σε στελέχη ζύμης οδήγησε σε αρνητικά αποτελέσματα (Ververidis et al, in preparation). Γι' αυτό το λόγο, επιλέγησαν και μελετήθηκαν αντιπροσωπευτικά μέλη

των οικογενειών MFS και ABC μεταφορέων ως προς την ικανότητα που έχουν να προσφέρουν προστασία στην κερκοσπορίνη όταν εκφράζονται σε πολλαπλά αντίγραφα. Αυτά ήταν τα γονίδια *SNQ2*, *PDR5* (οικογένεια ABC), *HOL1* (οικογένεια MFS) και τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης *YM4587*, *YHR048w*, *YHL040c* και *YHL047c* (MFS οικογένεια). Από αυτά μόνο το *SNQ2* όταν εκφράζεται σε πολλαπλό αριθμό αντιγράφων μπορεί να παρέχει ανθεκτικότητα στην τοξίνη σε άγριου τύπου στέλεχος *S. cerevisiae* (πίνακας 1, εικ.3A). Το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης *YNR074c*, τμήμα του γενωμικού κλώνου *CERC1*, επιβεβαιώνεται για μία ακόμα φορά (Ververidis et al, in preparation) ότι παρέχει προστασία στο ευαίσθητο σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο και σε 1μM κερκοσπορίνης στέλεχος YAE65 (πίνακας 2).

Ο ρόλος του *SNQ2* να προσφέρει πολλαπλή ανθεκτικότητα σε φάρμακα και να λειτουργεί ως μεταφορέας στεροειδών έχει ήδη αναφερθεί (Servos et al, 1993; Decottignies et al, 1995; Mahe et al, 1996). Η παρουσία του στην πλασματική μεμβράνη έχει επίσης αποδειχθεί (Decottignies et al, 1995). Αντιθέτως μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί κάτι σχετικό με τη δομή, την τοπολογία και την λειτουργικότητα του *YNR074c*. Η σχέση του *YNR074c* με την αποτοξίνωση της ζύμης από υδρόφοβους φωτοενεργοποιητές καθώς και *in silico* ανάλυση, οδηγούν σε υποθέσεις για την τοπολογία και τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης Ynr074cp (YN9B). Η πρωτοταγής δομή της YN9B και ιδιαίτερα η παρουσία μικρών περιοχών (motifs) που είναι συντηρημένα στην YN9B και σε άλλες αναγωγάσες TR/GR/thioredoxin (παράρτημα 1) υποθέτουν ομοιότητα και στην τριτοταγή δομή. Μπορούμε να υποθέσουμε επίσης ότι 2-3 ισχυρά υδρόφοβες περιοχές της YN9B καθιστούν την πρωτεΐνη μεμβρανική. Οι ομόλογες αναγωγάσες της YN9B επίσης φέρουν 1-3 ισχυρά υδρόφοβες περιοχές στις αντίστοιχες θέσεις της αλληλουχίας τους. Αυτές οι δυνητικά σχετιζόμενες με τη μεμβράνη περιοχές αντιστοιχούν σε μικρά τμήματα που καλύπτουν τις FAD προσδένουσες περιοχές (FAD-binding domain) και τις περιοχές διμερισμού (dimerization domain) των αναγωγασών.

Έχουμε λοιπόν ένα ταυτοποιημένο γονίδιο που ανήκει στους μεταφορείς ABC-MDR και ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης με υψηλή ομολογία με αναγωγάσες, οι οποίοι ανεξάρτητα (;) είναι σε θέση να παρέχουν προστασία στην κερκοσπορίνη και σε άλλους συνθετικούς φωτοενεργοποιητές που παράγουν $^1\text{O}_2$ όταν εκφράζονται σε πολλαπλά αντίγραφα.

Ούτε το *SNQ2* αλλά ούτε και το *YNR074c* έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν ανθεκτικότητα σε κυκλοεξιμίδιο (CHX) (πίνακες 3+4) και επιπλέον το *YNR074c* δε

σώζει το κύτταρο από 4-NQO (πίνακας 6). Αν λοιπόν το *YNR074c* κωδικοποιεί για μία αναγωγή, αυτή δε μπορεί να αναγνωρίσει κανένα από τα δύο υποστρώματα (CHX, 4-NQO) και να βοηθήσει στην αποτοξίνωση. Πιθανότατα το κύτταρο κατορθώνει να αποβάλλει το κυκλοεξιμίδιο μέσω της μεμβρανικής Pdr5p και το 4-NQO μέσω της επίσης μεμβρανικής Snq2p πριν προλάβουν να προκαλέσουν βλάβη.

Το γεγονός ότι και το *YNR074c* αλλά και το *SNQ2* σχετίζονται κατά κάποιον τρόπο με την προστασία από κερκοσπορίνη μας οδήγησε στο να εξετάσουμε αν υπάρχει κάποια συνεργασία μεταξύ τους γι' αυτό το σκοπό. Τελικά τα αποτελέσματα δείχνουν να μην υπάρχει κάποια συνεργασία των δύο προϊόντων όταν αυτά υπερεκφράζονται στη ζύμη ή τουλάχιστον φαίνεται ότι όταν το ένα από τα δύο βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα και το άλλο σε χαμηλό αριθμό αντιγράφων ή σε ένα αντίγραφο στο γένωμα είναι αρκετό για να είναι το στέλεχος ανθεκτικό στην κερκοσπορίνη (πιν.3, εικ.4). Εξ άλλου, έχει παρατηρηθεί ότι και κυτταρικές σειρές θηλαστικών κυττάρων αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε υδρόφοβα φάρμακα (antifolate, trimetrexate, piritrexim, e.t.c.) όταν υπερεκφράζουν είτε έναν πολλαπλής ανθεκτικότητας μεταφορέα (*MDR1*) είτε μία διαμεμβρανική αναγωγή (DHFR=DiHydroFolate Reductase) (Assaraf et al, 1989; Li et al,1993).

Τα toluidine blue και methylen blue είναι δύο συνθετικές φωτοενεργοποιούμενες χρωστικές οι οποίες ανάγουν το O₂ σε ¹O₂. Το γονίδιο *SOR1* της *C. nicotianae* βρέθηκε ότι αποκαθιστά την ανθεκτικότητα μεταλλαγμένων στελεχών του μύκητα στις παραπάνω αλλά και σε άλλες χρωστικές καθώς επίσης και σε κερκοσπορίνη (Ehrenschaft et al, 1998). Εν τούτοις η Sor1p δεν εμφανίζει ομολογία με κάποια αναγωγή. Η YN9B όμως πρωτεΐνη εμφανίζει υψηλή ομολογία με αναγωγάσες και επιπλέον φαίνεται ότι παρέχει προστασία σε toluidine blue και methylen blue όταν βρίσκεται σε υψηλό αριθμό αντιγράφων κυρίως. Ομοίως και η Snq2p παρέχει προστασία σε μπλε του τολουιδινίου και μπλε του μεθυλενίου όταν βρίσκεται σε πολλαπλά αντίγραφα (πιν.7+8, εικ.5). Εκτός λοιπόν από τη Sor1p στην *C. nicotianae*, και η YN9B αλλά και η Snq2p στον *S. cerevisiae* αναγνωρίζουν τοξίνες που παράγουν ¹O₂ και προστετεύουν από τη δράση τους. Έτσι μπορεί να υποθέσει κανείς ότι το κύριο προϊόν της αντίδρασης της κερκοσπορίνης (¹O₂) ή τα οξειδωμένα από το ¹O₂ κυτταρικά συστατικά - κυρίως μεμβρανικά λιπίδια μιας και η κερκοσπορίνη εδράζεται στις μεμβράνες (Daub & Briggs, 1993) – ανάγονται από μία μεμβρανική πρωτεΐνη, τη YN9B, και επανέρχονται στην φυσιολογική τους κατάσταση ενώ η Snq2p αναγνωρίζει τα μη επιδιορθωμένα κυτταρικά συστατικά και

τα μεταφέρει έξω από το κύτταρο συμμετέχοντας στο γενικότερο μεταβολισμό τους. Η υπόθεση αυτή έρχεται και σε συμφωνία με την άποψη ότι τα φυσιολογικά υποστρώματα των Snq2p και Pdr5p *in vivo* πιθανόν να είναι στεροειδή ή / και μεμβρανικά λιπίδια (Mahe et al, 1996). Διαφορετικά, η YN9B αναγνωρίζει τους φωτοενεργοποιητές που προκαλούν την παραγωγή $^1\text{O}_2$ και τους μετατρέπει στις ανηγμένες αδρανείς μορφές ενώ η Snq2p μεταφέρει τα μόρια αυτά έξω από το κύτταρο. Η τελευταία υπόθεση φαίνεται μάλλον απίθανη μιας και δεν απαιτεί καμία εξειδίκευση από τη μεριά της αναγωγάσης προκειμένου να αναγνωρίζει μια ποικιλία άσχετων μεταξύ τους φωτοενεργοποιητών.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων η μελλοντική ερευνητική δραστηριότητα μπορεί να ακολουθήσει δύο διαφορετικές κατευθύνσεις με σκοπό βέβαια πάντα την ανάπτυξη ανθεκτικών φυτών στο μύκητα *Cercospora*. Έχοντας ως στόχο τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών δράσης των δύο γονιδίων *SNQ2* και *YNR074c* μπορούμε με τυχαία *in vitro* μεταλλαξογένεση να δημιουργήσουμε μεταλλαγές μεταξύ των οποίων να γίνει επιλογή εκείνων που παρέχουν ανθεκτικότητα σε υψηλότερα επίπεδα κερκοσπορίνης (gain of function mutations). Σε μια διαφορετική προσέγγιση χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτές τα γονίδια *SNQ2*, *YNR074c* ή ακόμα και το *SOR1* μπορούμε να ανιχνεύσουμε ομόλογα φυτικά γονίδια σε cDNA βιβλιοθήκη φυτικού ιστού. Αυτά στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές για έλεγχο της έκφρασής τους σε διαφορετικές ποικιλίες καπνού που παρουσιάζουν διαφορετική ανθεκτικότητα στην κερκοσπορίνη και σε διάφορους ιστούς προσβεβλημένων ή όχι φυτών. Ο τελικός στόχος αφορά την κατασκευή μετασχηματισμένων φυτών (transgenic plants) χρησιμοποιώντας γονίδια του ίδιου του φυτού.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Flavonoid disulphide Reductase multiple alignment

REGION 1 FAD-binding domain

	10	20	30	40	50	60
TRtb	-----MSKI-----	FDLVVI	GAGSGGLEAGWNAATLYKKRVA	IDVQTH		
GRat	MARKMLVDGEIDKVA	AEANATHYDFDLFVI	GAGSGGVRAARFSAN	-HGAKV	GICELPFH	
THRhu	-----MNGPEDLPKSYDYDLII	GGSGGLAAK	-EAAQY	GKKVMVLD	FVTP	
GRdm	-----MAPVQG---	SYDYDLIVIGGSAGLACAK	-EASLNGARVA	CLDFVKP		
GRhu	-----ACRQEPQPQPPAAGAVAS	YDYLVI	GGSGGLASARRAAE	-LGARAA	VVESH--	
Gryeast	--MLSATKQTFRSLQIR	TMTSTNTKHYDYLVI	GGSGGVASARRAAS	-YGAKT	LLVEAK--	
GRpc	-----MQKYDFDLFVI	GAGSGGVRAARIAAG	-HGAKVAIAE	----		
YNR074c	-----MTINTKNIVVVGAGV	FGVSVANHL	-----			
THRyeast	-----VHNKVTII	GS GPAHTAAIYLARAEIKP	ILYEGMMAN			
THRat	-----LKP	LLFEGWMMAN				
THRec	-----GTTKHSKLLIL	GS GPAGYTA	AVYAARANLQPVLITG	----		
	-----dl	-viG-Gsgg--	aa--a--g--v	-----		

	70	80	90	100	110	120
TRtb	H-GPPHYAALGGTCVNVGCV	PKKLMVTGAQYMDHLRESAG	FGW----	EFDGSSVKANWKK		
GRat	PISSEIIGVGGTCVIRGCV	PKKILVYGATYGGELEDAK	NYGW----	EINEK	-VDFTWKK	
THRhu	TPLGTRWG-LGGTCVNVGCI	PKKLMHQALLGQALQDSR	NYGW----	KVEET	-VKHDWDR	
GRdm	TPLGTKWG-VGGTCVNVGCI	PKKLMHQASLLGEAVHEAA	--AW----	NVDDK	-IKPDWHR	
GRhu	-----KLGTCVNVGCV	PKKVMWNTAVHSEFMHDH	ADYGF-----	P	SCEGKFNWRV	
Gryeast	-----ALGGTCVNVGCV	PKKVMWYASDLATRVSHANE	YGLYQNLPLDKEHLTFN	WPE		
GRpc	-----EY-RFGGTCVIRGCV	PKKLLMYASQYQGFEDAAG	FGW-----	HS	AATSHSWTS	
YNR074c	-----YRELGGT-----	YAIKLV	TASNIVYFLPSAV	-----	RLT	
THRyeast	GIAAG--GQLTTT-----	TEIENFP	PGF----	PDGLT	GSELMDRMRE	
THRat	DIAPG--GQLTTT-----	TDVENFP	PGF----	PEGIL	GIDIVEKFRK	
THRec	-MEKG--GQLTTT-----	TEVENWP	GD-----	PNDLT	GPELLMERMHE	
	-----g	-lggTcv--gc	-pkk-----	g-----	w--	

	130	140	150	160	170	180
TRtb	LIAAKNEAVLDINKSYEGM	FNDTEGLDFL	GWGSLESKNVVVRETADPK	SAVKERLQAD		
GRat	LLQKKTDEILRLNNIYKRL	LANA-AVKLYE	EGEGRVVGPN	EVEVRQIDG	TKISY	TAK----
THRhu	MIEAVQNHIGSLNWGYR	VALREKK-VVYENAYGQ	FIGPHRIKATNNK	GKEKIYS----	AE	
GRdm	LCAVVQNHISR-HWVT	VVDLRDCK-VEYIN	GLGSFVTRTHCCP	SMKSG-ERTIT	----	AQ
GRhu	IKEKRDAYVSRNLN	AIYQNNL-TKSHIEI	IRGHAAFTSDPKPT	IEVSGKK---	YT----	AP
Gryeast	FKQKRDAYVHRLN	GIYQKNL-EKEKVD	VVFGWARFNKDG	NVEVQKRDNT	TEVYS----	AN
GRpc	LIAAKDAEIALREGVYQR	-LIENANVEIFK	GRAQIAGPNRV	TVT-----	GASVSAR	
YNR074c	VSKDYTKSILPLKNV	LD SGIEVIKDTA	-----	ASFDDKEV	VVLGSDRA	-----
						IKFD

```

THRyeast QSTKFGTEII-TETVSKVDLSSKP----FKLWTEFNEDAEPVTTD----AILLATGASAK
THRat    QSERFGTIF-TETVNKVDLSSKP----FKLFT----DSRTVLAD----SVIISTGAVAK
THRrec   HATKFETEII-FDHINKVDLQNRP----FRL----NGDNGEYTC-----ALIIATGASAR
-----i--l--y--l--k-----g--f-----a-

```

REGION 2 NADPH-binding domain

```

                190      200      210      220      230      240
                |        |        |        |        |        |
Trtb         HILLATGSWPQMPA---IPGV-EHCISSNEAFYLPEPPRRVLTVGGGFISVEFAGIFNAY
GRat         HILIIATGSRAQKPN---IPGH-ELAIITSDEALSLEEFPKRAIVLGGGYIAVEFASIW---
THRhu        SFLIATGERPRYL---IPGDKEYCISDDLFLSLPYCPGKTLVVGASYVALEECAGFL---
GRdm         TFVIAVG-RPRYPD---IPGAAEIGTTSDDLFLSLDR-EGKTLVVGAGYIGLEECAGFL---
GRhu         HILIIATGMPSTPHESQIPGA-SLGITSDGFFQLEELPGRSVIVGAGYIAVEMAGILS--
Gryeast      HILVATGGKAIFPEN--IPGF-ELGTDSGFFRLEEQPKKVVVVGAGYIGIELAGVFN--
GRpc         TILIIATGARPVMP---PVAG-ANLMITSDDVFDLPVGPPIAIIGGGYIACEFAGI---F
YNR074c     ILVLATGSKWADPIGSTYTFGDNYKEYFEREASRISDADHILFLGGGFVNCLELAGELLFK
THRyeast     RMHLPG----EETYWQKGISACAVCDGAVPIFR----NKPLAVIGGGDSACEEAQFLT-K
THRat        RLSFTGSGEGNGGFWNRGISACAVCDGAAPIFR----NKPLVVIGGGDSAMEEANFLT-K
THRrec       YLGLPS----EEAFKGRGVSACATCDGF--FYR----NQKVAVIGGGNTAVEEALYLSNI
--l-atg-----p----ipg-----sd--f-l--p----v-GgGyia-E-Ag-l---

```

```

                250      260      270      280      290      300
                |        |        |        |        |        |
Trtb         ---KPPGKVTLCYRNLLILRGFDETIREEVTKQLTANGIEIMTNENPAKVSINTDGSK
GRat         RGMGATVDLFFRKELPLRGFDDEMRLVARNLEGRGVNLHPQTSLTQLTKTDQGIKV---
THRhu        AGIGLGVTVMVRS-ILLRGFDQDMANKIGEHEEHGKIFIRQFVPIKVEQIEAGTPGRLR
GRdm         KGLGYG-TVMVRS-IVLRGFDQMAELVAASMEERGIPFLADVDRCREADDAAREYRLT
GRhu         -ALGSKTSLMIRHDKVLSFDSMISTNCTEELNAGVEVLKFSQVKEVKKTLVSGLEVSMV
Gryeast      -GLGSETHLVIRGETVLRKFDECIQNTITDHYVKEGINVHKLSKIVKVEKNVETDKLKI-
GRpc         NGLGRHVVQLHRGSQVLRGFDELREHLGDELKKSGLDLRLGVDVVAVERQRGALSVQL-
YNR074c     YLEEIRSGKKRISIIHNSDKLLPDSGLYNDTLRKNVTDYLSKNGI
THRyeast     Y--GSKVFMVLRKDH-LRA-STIMQKRAEKN-EK---IEILYNTVALEAKGD--GKLLNAL
THRat        Y--GSKVYIIHRRDT-FRA-SKIMQQRALSN-PK--IEVIWNSAVVEAYGDENGRVGLGL
THRrec       ---ASEVHLIHRRDG-FRA-EKILIKRLMDKVEN--GNIILHTNRTLEEVTDGDMGVTGV
---g--v-l--R---lR-fd-----e-gi-----g-----

```

REGION 3 Central domain

```

                310      320      330      340      350      360
                |        |        |        |        |        |
Trtb         HVTFESGKTLDVD----VVMMAIGRIPRTNDLQLGNVGVKLTTPKGG-VQVDEFSTRTNVPN
GRat         ISS-SHGEFVAD----VVLFATGRSPNTKRLNLEAVGVLDQAGA-VKVDEYSRTNIPS
THRhu        VVAQSTNSEEEIEGEYNTVMLAIGRDACTRKIGLETVGKINEKTGKIPVTDEEQTNVPY
GRdm         QIRFTTSHHR-----LWAIGRKLCDLSLNLMPALTVQK--DKIPVDSQEATNVPH
GRhu        TAVPGRLPVMTMIPDVDCLLWAIGRVPNTKDLNKLGIQTDDK-GHIIVDEFQNTNVKG
Gryeast      ----HMNDSKSIDVDELIWTIGRKSHL-GMGSENVGIKLNHSH-DQIIAHEYQNTNVPN
GRpc         ----TTGDAM----EVDAVMAATGRLPNTWGLGLETVDVGLDQNGA-IKVDEYSRTSSPG
YNR074c     TLYLNTVGASLDTSKPRIFLGEKSS LCDKKGFIQVEKNFRVKAWEAGN
THRyeast     RIKNTKKNEETD-LPVSGLFYAIGHTPATKIV-----AGQVDTDEAG-----
THRat        KVKNVVTGDVSD-LKVSGLFFAIGHQPATKFL-----DGQLELDEDG-----

```

THRec RLRDTQNSDNIESLDVAGLFVAIGHSPNTAIF-----EGQLEL-ENG-----
 -----v-----aiGr-p-t--l-l--vg-----g-i-vde---tn-p-

370 380 390 400 410 420
 TRtb IYAIGDIT-DRLMLTP-VAINEGAALVDTVFGN----KPRKTDHTRVASAVFSIPPIGTC
 GRat IWAVGDAT-NRINLTP-VALMEATCFANTAFGG----KPTKAEYSNVACAVFCIPPLAVV
 THRhu IYAIGDILEDKVELTP-VAIQAGRLLAQRLYAG----STVKCDYENVPTTVFTPLEYGAC
 GRdm IYAVGDI IYGKPELTP-VAVLAGRLLARRLF GG----STQSM DYKDVATTVFS-WSTSAS
 GRhu IYAVGDC-GKALLTP-VAIAAGRKL AHRLF E---YKEDSKLDYNNIPTVVF SHPPIGTV
 Gryeast IYSLGDVV-GKVELTP-VAIAAGRKLSNRLF GPEKFRND-KLDYENVPSVIFSHPEAGSI
 GRpc IYAVGDVT-NRLNLTP-VAIHEGHAFADTVFGG----KALPTEHENVPFAVFSQPQAASV
 YNR074c VFAIGDVTNFRYHGLVKRDNDVLDVLRNVISSLQEGTEASLV-DADCLETGHAPSGVSL
 THRyeast -Y-----IKTVPG----SSLTSVPGFFAAG-----DVQDSKYRQAITS A-
 THRat -Y-----VVTKPG---TTKTSVVGVF AAG-----DVQDKKYRQAITAA-
 THRec -Y-----IKVQSGIHGNATQTSIPGVFAAG-----DVMDHLYRQAITS A-
 iYa-gd-----ltP-va---g--l----f-----k-----V---vf-----a-

430 440 450 460 470 480
 TRtb GLIEEVAAKE--FEKVAVYMSSFTPLMHNISGSKYKFKFAKIVTNHSDG-TVLGVHLLGD
 GRat GLSEEEAVEQ-ATGDILVFTSGFNPMKNTISGRQEK TLM-KLIVDEKSD-KVIGASMCGP
 THRhu GLSEEKAVEKFG EENIEVYHSYFWPLEW TIPS RDNNKCYAKI ICNTKDNERVVG FHV LGP
 GRdm GLAEEDASSS-SEPRIEVFHGYKPT EFFIPQKSVRYCYLKAVAERHGDQRVYGLHYIGP
 GRhu GLTEDEAIHKYGIEN-KTYSTSFTPMYHAVTKRKT KCV M-KMVCANK-EEKVVGIHMQGL
 Gryeast GISEKEAIEKYGKENIKVYNSKFTAMYYAMLSEKSPTRY-KIVCAGP-NEKVVGLHIVGD
 GRpc GLSEAQARDRYS--NVEIYGS AFRPMRAALSGRDEKA-LVKLVVNG-SNDRVVG AHIVGA
 YNR074c GPNAGFGQFPLPL LGTINIPSFLISRAKSKNLFSDKMEPLFKK-----
 THRyeast -----GS
 THRat -----GT
 THRec -----GT
 gl-e--a-----f-p-----k-v-----v-g-h--G-

490 500 510 520 530 540
 TRtb GAPEIIQAVGVCLRLNAKISDF-YNTIGVHPTS AEELCSMRTPSYYYLKG EKMETLP ESS
 GRat DAAEIMQGI AIALKCGATKAQF-DSTVGIHPSSAE EFVTMR SVT----RRIAHKPKPKTN
 THRhu NAGEVTQGF AAALKCGLTKKQL-DSTIGIHPVCAEVFTT LSVTK----RSGASILQAGC
 GRdm VAGEVIQGF AAALKSGLTLT-L-INTVGIHPTTAE EFTRLAITK----PRSGLDPTPASC
 GRhu GCDEMLQGF AVAVKMGATKADF-DNTVAIHPTS SEELVTLR-----
 Gryeast SSAEILQGF GVAIKMGATKADF-DNCVAIHPTS AEELVTMR-----
 GRpc DAAEIIQGI AVA I KARATKADF-DATLGVHPTLAE EFVTLRNR-----
 THRyeast GCMAALDA-----EKYLTSLE-----
 THRat GCMAALDA-----EHYLQEIGSQEGKSD-----
 THRec GCMAALDA-----ERYLDGLADAK-----
 g--e--qg---a-k---t---f-d-t---hp--aee-----

Οι πρωτεΐνες με τις οποίες έγινε η παραπάνω στοίχιση της πρωτοταγούς δομής του γονιδιακού προϊόντος του *YNR074c* είναι :

TRtb : Trypanothione Reductase *Trypanosoma brucei brucei*,

GRat : Glutathione Reductase *Arabidopsis thaliana*,

THRhu : Thioredoxin Reductase *Homo sapiens*,

GRdm : Glutathione Reductase *Drosophila melanogaster*,

GRhu : Glutathione Reductase *Homo sapiens*,

GRyeast : Glutathione Reductase *Saccharomyces cerevisiae*,

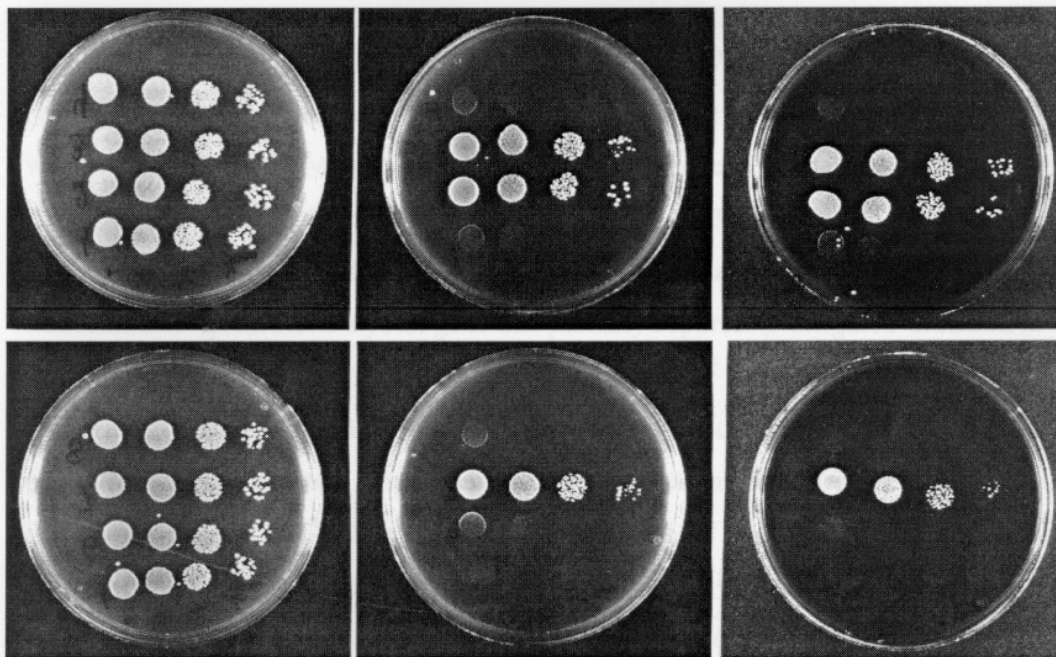
GRpc : Glutathione Reductase *Pseudomonas cepacia*,

THRyeast : Thioredoxin Reductase *Saccharomyces cerevisiae*,

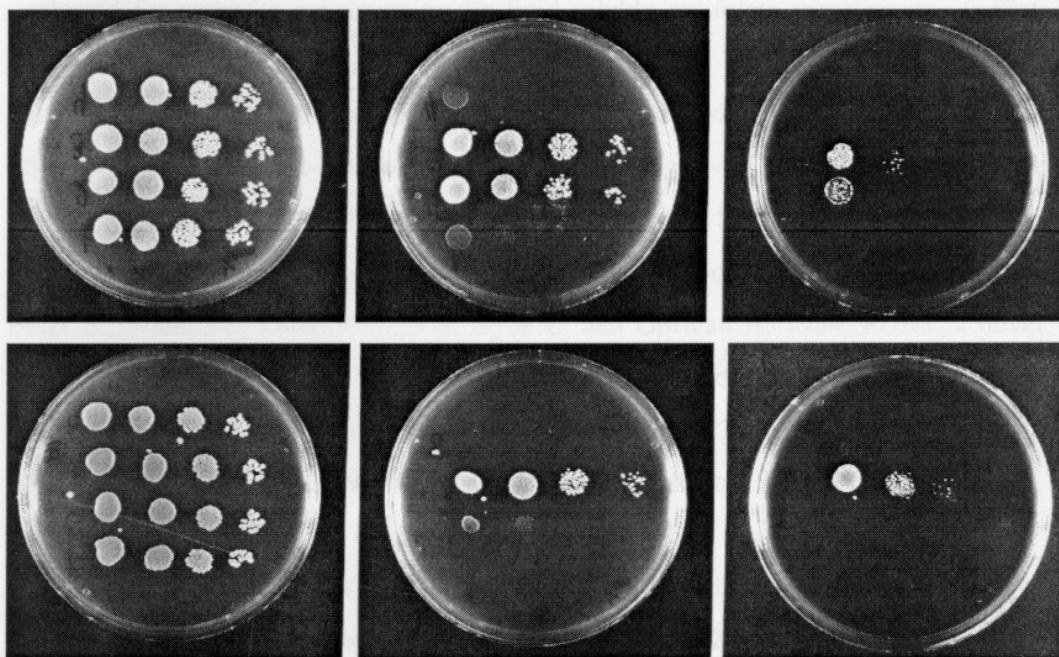
THRat : Thioredoxin Reductase *Arabidopsis thaliana*,

THRec : Thioredoxin Reductase *Escherichia coli*.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2



A.



B.

Έλεγχος σταγόνων των στελεχών 1 : YPH98, 2 : YPH98 pRS314/YNR074c, 3 : YPH98 Ycplac112/YNR074c, 4 : YPH98 [ΔYNR074c], 5 : YPH98 pRS316/SNQ2, 6 : YPH98 pEH22, 7 : YPH98 [ΔSNQ2] σε YCM

A. χωρίς φάρμακο, με 25μM και 100μM MB.

B. χωρίς φάρμακο, με 25μM και 100μM TB.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aitchison J. D., Rout M. P., Marelli M., Blobel G. and Wozniak R. W. 1995, Two novel related yeast nucleoporins Nup170p and Nup157p : complementation with the vertebrate homologue Nup155p and functional interactions with the yeast nuclear pore-membrane protein Pom152p, *J. Cell. Biol.*, 131 : 1133-1148.
- Amakasu H., Suzuki Y., Nishizawa M. and Fukasawa T. 1993, Isolation and characterization of *SGE1* : a yeast gene that partially suppresses the *gal11* mutation in multiple copies, *Genetics*, 134 : 675-683.
- Armitage P., Walden R. and Draper J. 1988, Vectors for the transformation of plant cells using *Agrobacterium*, Plant Genetic Transformation and Gene Expression, a Laboratory Manual, ed. Draper J., Scott R., Armitage P. and Walden R., Blackwell Scientific Publications (chapter 1).
- Assaraf Y.G., Molina A. and Schimke R.T. 1989, Sequential amplification of dihydrofolate reductase and multidrug resistance genes in Chinese hamster ovary cells selected for stepwise resistance to the lipid-soluble antifolate trimetrexate, *J. Biol. Chem.*, 264 (31) : 18326-18334.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. 1987, Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1-3, ed. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K., Massachusetts general hospital and Harvard Medical School
- Balzi E., Wang M., Leterme S., Van Dyck L. and Goffeau A. 1994, PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1, *J. Biol. Chem.*, vol.269; No.3; pp.2206-2214.
- Balzi, E. & Goffeau, A. 1995, Yeast multidrug resistance : the PDR network, *J. Bioenerg. Biomem.* 27 : 71-76.
- Batchvarova R.B., Reddy V.S. and Bennett J. 1992, Cellular resistance in rice to cercosporin, toxin of *Cercospora*, *Phytopathology*, 82 : 642-646.
- Bruno A. 1995, An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, vol. 11 : 1575-1611.
- Carvajal E., van den Hazel H.B., Cybularz-Kolaczowska A., Balzi E. and Goffeau A. 1997, Molecular and phenotypic characterization of yeast PDR1 mutants that show

- hyperactive transcription of various ABC multidrug transporter genes, *Mol. Gen. Genet.*, 256 : 406-415.
- Coque J.J., Liras P., Martin J.F. 1993, Genes for β -lactamase, a penicillin-binding protein and a transmembrane protein are clustered with the cerhamycin biosynthetic genes in *Nocardia lactamdurans*, *EMBO J.* 12 : 631-639.
- Daub M. E. 1987, Resistance of fungi to the photosensitizing toxin cercosporin, *Phytopathology*, 77 : 1515-1520.
- Daub M.E. and Briggs S.P. 1983, Changes in tobacco cell membrane composition and structure caused by the fungal toxin cercosporin, *Plant Physiol.*, 71 : 763-766.
- Daub, M.E. 1982, *Cercosporin*, a Photosensitizing Toxin from *Cercospora* species, *Phytopathology*, vol. 72 : p. 370-374.
- Daub, M.E. and Ehrenshaft M. 1993, The photoactivated toxin cercosporin as a tool in fungal photobiology, *Physiologia Plantarum* 89 : 227-236.
- Daub, M.E., Leisman, G.B., Clark, R.A. and Bowden E.F. Oct. 1992, Reductive detoxification as a mechanism of fungal resistance to singlet oxygen-generating photosensitizers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : pp.9588-9592.
- Decottignies A., Kolaczowski M., Balzi E. and Goffeau A. 1994, Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast, *J. Biol. Chem.* vol.269; No 17 : 12797-12803.
- Decottignies A., Lambert L., Catty P., Degand H., Epping E.A., Moye-Rowley W.S., Balzi E. and Goffeau A. 1995, Identification and characterization of SNQ2, a new multidrug ATP Binding Cassette transporter of the yeast plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, vol.270; No.30 : 18150-18157.
- Delahodde A., Delaveau T. and Jacq C. 1995, Positive autoregulation of the yeast transcription factor Pdr3p, which is involved in control of drug resistance, *Mol. Cell. Biol.*, 15 : 4043-4051.
- Ehrenhofer-Murray A., Wurgler F. F. and Sengstag C. 1994, The *Saccharomyces cerevisiae* *SGE1* gene product : a novel drug-resistance protein within the major facilitator superfamily, *Mol. Gen. Genet.*, 244 : 287-294.
- Ehrenshaft M. and Upchurch R.G. 1991, Isolation of Light-Enhanced cDNAs of *Cercospora kikuchii*, *Appl. Environ. Microbiol.* vol.57; No 9; p.2671-2676.
- Ehrenshaft M., Jenns A.E. and Daub M.E. 1995, Targeted gene disruption of carotenoid biosynthesis in *Cercospora nicotianae* reveals no role of carotenoids in photosensitizer resistance, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8 : 569-575.

- Ehrenshaft M., Jenns A.E., Chung K.R. and Daub M.E. 1998, *SOR1*, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* fungi, is highly conserved in divergent organisms, *Molecular Cell*, vol.1 : 603-609.
- Gaber R.F., Kielland-Brandt M.C. and Fink G.R. 1990, *HOL1* mutations confer novel ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.*, vol.10; No.2; p.643-652.
- Goffeau A., Park J., Paulsen I.T., Jonniaux J-L., Dinh T., Mordant P. and Saier M.H. 1997, Multidrug-resistant transport proteins in yeast : complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames within the Major Facilitator Superfamily, *Yeast* vol. 13 : 43-54.
- Gompel-Klein P. and Brendel M. 1990, Allelism of *SNQ1* and *ATRI*, genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* required for controlling sensitivity to 4-nitroquinoline-N-oxide and aminotriazole, *Curr. Genet.*, 18 : 93-96.
- Goodwin T.W. 1980, The biochemistry of the carotenoids, Vol. 1, pp. 257-288 Chapman & Hall, New York, NY, ISBN 0-412-21690-6.
- Haase E., Servos J. and Brendel M. 1992, Isolation and characterization of additional genes influencing resistance to various mutagens in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.*, 21 : 319-324.
- Henderson G. B., Murgolo N. J., Kuriyan J., Osapay K., Kominos D., Berry A., Scrutton N. S., Hinchliffe N. W., Perham R. N. and Cerami A. 1991, Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that of trypanothine reduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, pp. 8769-8773.
- Hirata D., Yano K., Miyahara K. and Miyakawa T. 1994, *Saccharomyces cerevisiae* YDR1, which encodes a member of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, is required for multidrug resistance, *Curr. Genet.* 26 (4) : 285-294.
- Holmgren A. 1985, Thioredoxin, *Annu. Rev. Biochem.*, 54 : 237-271.
- Jalal M. A. F., Hossain M. B., Robeson D. J., van der Helm D. 1992, *Cercospora beticola* Phytotoxins: Cebetins That Are Photoactive, Mg²⁺-Binding, Chlorinated Anthraquinone-Xanthone Conjugates, *Am.Chem.Soc.* vol.114; No 15; 5967-5971.
- Katzmann D.J., Burnett P.E., Golin J., Mahe Y. and Moye-Rowley W.S. 1994, Transcriptional control of the yeast PDR5 gene by the PDR3 gene product, *Mol. Cell. Biol.*, 14 : 4653-4661.
- Katzmann D.J., Hallstrom T.C., Voet M., Wysock W., Golin J., Volckaert G. and Moye-Rowley W.S. 1995, Expression of an ATP-Binding Cassette transporter-

- encoding gene (*YORI*) is required for Oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cel. Biol.*, vol.15, No.12 : 6875-6883.
- Kolaczkowski M., van der Rest M., Cybularz-Kolaczkowska A., Soumillion J.-P., Konings W.N. and Goffeau A. 1996, Anticancer Drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p, *J. Biol. Chem.*, vol. 271; No.49; pp.31543-31548.
- Krauth-Siegel R. L., Enders B., Henderson G. B., Fairlamb A. H. and Schirmer R. H. 1987, Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme, *Eur. J. Biochem.*, 164 (1) : 123-128.
- Kuriyan J., Kong X.-P., Krishna T. S. R., Sweet R. M., Murgolo N. J., Field H., Cerami A. and Henderson G. B. 1991, X-ray structure of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata* at 2.4-Å resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, pp. 8764-8768.
- Kuriyan J., Krishna T. S. R., Wong L., Guenther B., Pahler A., Williams Jr C. H. and Model P. 1991, Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes, *Nature*, vol. 352 : 172-174.
- Li X.K., Kobayashi H., Holland J.F. and Ohnuma T. 1993, Expression of dihydrofolate reductase and multidrug resistance genes in trimetrexate-resistant human leukemia cell lines, *Leuk. Res.*, 17 (6) : 483-490.
- Lund A.H., Duch M. and Pedersen F.S. 1996, Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation, *Nucl. Acid Res.*, vol.24, No.4 : 800-801.
- Lynch F.J. and Geoghegan M.J. 1979, Regulation of growth and cercosporin photoinduction in *Cercospora beticola*, *Tran. Br. Mycol. Soc.*, 73 : 311-327.
- Mahe Y., Lemoine Y. and Kuchler K. 1996, The ATP binding cassette transporters Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, vol.271; No.41; pp.25167-25172.
- Mahe Y., Parle-McDermott A., Nourani A., Delahodde A., Lamprecht A. and Kuchler K. 1996, The ATP-binding cassette multidrug transporter Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* : a novel target for the transcription factors Pdr1 and Pdr3, *Mol. Microbiol.*, 20 (1) : 109-117.
- Marger M.D. and Saier M.J. Jan.1993, A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport, *Trends Biochem. Sci.* 18 : 13-20.

- Meyers S., Schauer W., Balzi E., Wagner M., Goffeau A. and Golin J. 1992, Interaction of the yeast pleiotropic drug resistance genes PDR1 and PDR5, *Curr. Genet.*, 21 (6) : 431-436.
- Miyahara K., Mizunuma M., Hirata D., Tsuchiya E and Miyakawa T. 1996, The involvement of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance transporters Pdr5p and Snq2p in cation resistance, *FEBS Lett.*, 399 (3) : 317-320.
- Mouaheb N., Thomas D., Verdoucq L., Monfort P. and Meyer Y. 1998, *In vivo* functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 95, pp. 3312-3317.
- Nitiss J. and Wang J.C. 1988, DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast, *PNAS*, vol. 85, pp. 7501-7505.
- Nourani A., Papajova D., Delahodde A., Jacq C. and Subik J. 1997, Clustered amino acid substitutions in the yeast transcription regulator Pdr3p increase pleiotropic drug resistance and identify a new central regulatory domain, *Mol. Gen. Genet.*, 256 : 397-405.
- Pitkin J.W., Panaccione D. G. and Walton J. D. 1996, A putative cyclic peptide efflux pump encoded by the TOXA gene of the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*, *Microbiology*, 142 (pt.6) : 1557-1565.
- Poch O. 1997, Conservation of a putative inhibitory domain in the GAL4 family members, *Gene*, 184 : 229-235.
- Reid R.J.D. Kauh E.A. and Bjornsti M.-A. 1997, Camptothecin sensitivity is mediated by the pleiotropic drug resistance network in yeast, *J. Biol. Chem.*, vol.272; No.18; pp.12091-12099.
- Romanos M.A., Scorer C.A. and Clare J.J. 1992, Foreign gene expression in yeast : a review, *Yeast*, 8 (6) : 423-488.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989, *Molecular Cloning, a laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Servos J., Haase E. and Brendel M. 1993, Gene SNQ2 of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169kDa protein homologous to ATP-dependent permeases, *Mol. Gen. Genet.*, 236 : 214-218.
- Shames S. L., Fairlamb A. H., Cerami A. and Walsh C. T. 1986, Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly

- discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases, *Biochemistry*, 25 : 3519-3526.
- Shames S.L., Fairlamb A.H., Cerami A. and Walsh C.T. 1986, Purification and characterization of trypanothione reductase from *Crithidia fasciculata*, a newly discovered member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases, *Biochemistry*, 25 : 3519-3526.
- Simon-Plas F., Gomes E., Milat M-L., Pugin A., Blein J-P. 1996, *Cercospora beticola* Toxins, *Plant Physiol.*, 111 : 773-779.
- Sollod C.C., Jenns A.E. and Daub M.E. 1992, Cell surface redox potential as a mechanism of defence against photosensitizers in fungi, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (2) : 444-449.
- Steinkamp M.P., Martin S.S., Hoefert L.L. and Ruppel E.G. 1981, Ultrastructure of lesions produced in leaves of *Beta vulgaris* by cercosporin, a toxin from *Cercospora beticola*, *Phytopathology*, 71 : 1272-1281.
- Stone G. and Sadowski I. 1993, GAL4 is regulated by a glucose-responsive functional domain, *EMBO J.*, 12 : 1375-1385.
- Tan K.K. 1978, Light-induced fungal development-In the filamentous fungi, Vol. 3 (J.E. Smith & D.R. Berry eds), pp. 334-357, John Wiley & Sons, New York, NY, ISBN 0-470-99352-9.
- Tsui L.-C. 1992, The spectrum of cystic fibrosis mutations, *Trends Genet.*, 8 : 392-398.
- Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J. and Gay N. 1982, Distantly related sequences in the alpha and beta subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold, *EMBO J.* 8 : 945-951.
- Yelin R. and Schuldiner S. 1995, The pharmaceutical profile of the vesicular monoamine transporter resembles that of multidrug transporters, *FEBS Letters*, 377 : 201-207.

Εχθροί και ασθένειες των ζαχαρότευτλων 1982, Έκδοση Ελληνικής Βιομηχανίας Ζάχαρης ΑΕ.