

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ
Αριθ. Πρωτ. 647
Ημερομηνία 15-9-2005

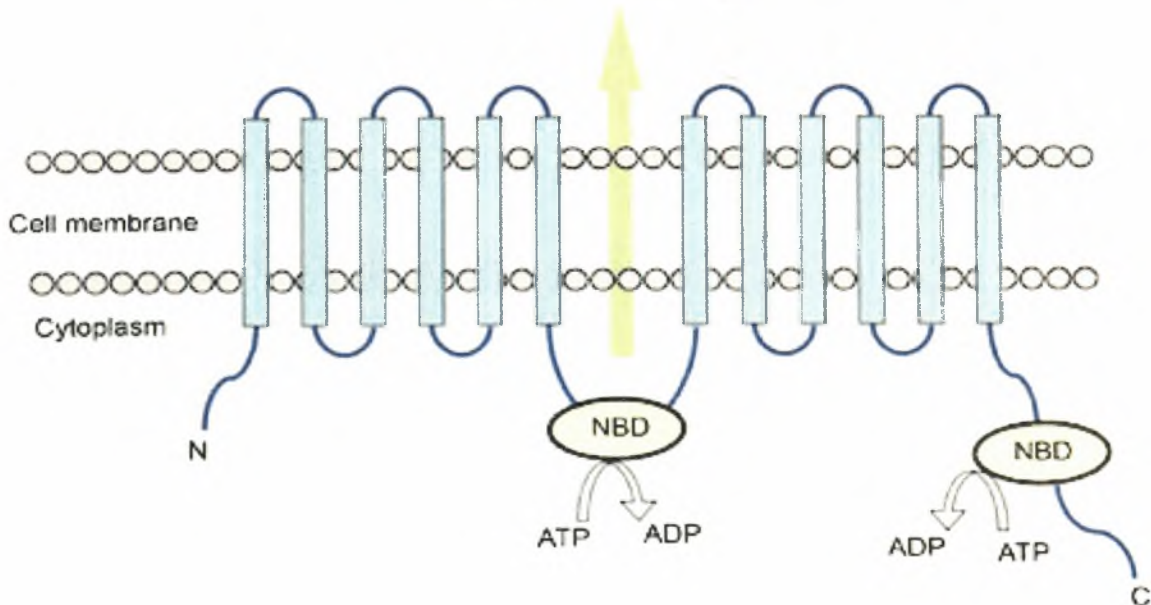
Heinrich Heine
HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

Διπλωματική εργασία

Μοριακή ανάλυση του Pdr5 ABC μεταφορέα

Κρικώνη Κατερίνα

Extrusion of xenobiotics





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7666/1
Ημερ. Εισ.: 03-05-2012
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΒΒ
2009
ΚΡΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000092029

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Βιοχημείας του Πανεπιστημίου
Heinrich-Heine, στην πόλη του Ντίσελντορφ της Γερμανίας.

1/4/2009-30/8/2009

Τριμελής Επιτροπή Αξιολόγησης:

Prof. Dr. Lutz Schmitt (Πανεπιστήμιο Heinrich-Heine)

Dr. Νικόλαος Μπαλατσός (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)

Dr. Δημήτριος Μόσιαλος (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)

καα.φ
Μπαλατσός

ΝΙΚΟΣ ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ

Αφιερώνω την παρούσα διπλωματική εργασία σε όλους αυτούς που ονειρεύονται να βελτιώσουν με την ερευνητική προσφορά τους τον κόσμο.....

1. Περίληψη.....	σελ. 1-2
2. Εισαγωγή.....	σελ. 3-18
2.1 Οι ABC Μεταφορείς.....	σελ. 3-12
2.1.1 ABC συστήματα εισόδου.....	σελ. 3
2.1.2 ABC συστήματα εξώθησης.....	σελ. 4
2.1.3 Οι χαρακτηριστικές δομές των ABC μεταφορέων.....	σελ. 5-6
2.1.4 Η δομή των ABC μεταφορέων.....	σελ. 7-9
2.1.4.1 Τι μπορεί να μας αποκαλύψουν οι δομές;.....	σελ. 7
2.1.4.2 Η τρισδιάστατη δομή του ABC BtuCD μεταφορέα.....	σελ. 7-8
2.1.4.3 Η δομή των νουκλεοτιδο-δεσμευτικών περιοχών.....	σελ. 9-10
2.1.5 Δεσμευτικές αλληλεπιδράσεις ATP.....	σελ. 11
2.1.6 Ο ATP-οδηγημένος κύκλος αντίδρασης των μεταφορέων ABC.....	σελ. 12
2.2 Ο Pdr5 ABC μεταφορέας.....	σελ. 13-18
3. Στόχοι Εργασίας.....	σελ. 19-20
4. Υλικά.....	σελ. 21-33
4.1 Εργαστηριακός Εξοπλισμός.....	σελ. 21
4.2 Βιοχημικά, χημικά προϊόντα και εμπορικά αντιδραστήρια.....	σελ. 21-26
4.2.1 Διαλύτες.....	σελ. 21
4.2.2 Ένζυμα.....	σελ. 22
4.2.3 Υλικά για καλλιέργειες και διαλογή.....	σελ. 22
4.2.4 Άλατα και ρυθμιστικά διαλύματα.....	σελ. 23
4.2.5 Υποστρώματα.....	σελ. 23
4.2.6 Υλικά ηλεκτροφόρησης.....	σελ. 23
4.2.7 Εμπορικά Αντιδραστήρια (Kits).....	σελ. 24
4.2.8 Ολιγονουκλεοτίδια.....	σελ. 25-26
4.2.8.1 Εκκινητές για κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση.....	σελ. 25
4.2.8.2 Εκκινητές για Colony PCR.....	σελ. 26
4.2.8.3 Εκκινητές για αλληλούχιση.....	σελ. 26
4.3 Μέσα και αντιδραστήρια.....	σελ. 27-29
4.3.1 Διαλύματα αμινοξέων για Dropout complete Medium.....	σελ. 27
4.3.2 AS Mix (διαλύματα αμινοξέων).....	σελ. 27
4.3.3 LB μέσο καλλιέργειας (Luria Broth).....	σελ. 27
4.3.4 2×LB μέσο καλλιέργειας.....	σελ. 27
4.3.5 ΥΡ μέσο καλλιέργειας (Yeast extract Peptone).....	σελ. 28
4.3.6 2×ΥΡ μέσο καλλιέργειας.....	σελ. 28
4.3.7 2×Dropout complete μέσο καλλιέργειας (pH 5.6).....	σελ. 28
4.3.8 NZY+ Broth (pH 7.5).....	σελ. 28
4.3.9 20% Γλυκόζη.....	σελ. 28
4.3.10 50% Γλυκερόλη.....	σελ. 29

4.4 Τρυβλία.....	σελ. 30-31
4.4.1 LB Τρυβλία.....	σελ. 30
4.4.2 LB-amp ⁺ Τρυβλία.....	σελ. 30
4.4.3 LB-amp ⁺ Screening Τρυβλία.....	σελ. 30
4.4.4 YPD τρυβλίο (Εκχύλισμα ζύμης Peptone Δεξτρόζης).....	σελ. 30
4.4.5 Drop-out –TRP Τρυβλία.....	σελ. 30
4.4.6 Drop-out –His Τρυβλία.....	σελ. 31
4.4.7 Τρυβλία άγαρ που περιέχουν τα εξεταζόμενα τοξικά υποστρώματα.....	σελ. 31
4.5 Ρυθμιστικά Διαλύματα.....	σελ. 32
4.5.1 LATE.....	σελ. 32
4.5.2 PLATE.....	σελ. 32
4.5.3 10x TE.....	σελ. 32
4.5.4 10x LiAc.....	σελ. 32
4.5.5 TAE Running Buffer 10X, (pH 8).....	σελ. 32
4.5 Κυτταρικά στελέχη & Πλασμίδια.....	σελ. 33
4.6.1 <i>E. Coli</i> Κυτταρικά στελέχη.....	σελ. 33
4.6.2 Κυτταρικά στελέχη Ζύμης.....	σελ. 33
4.6.3 Πλασμίδια.....	σελ. 33
5. Μέθοδοι.....	σελ. 34-51
Μοριακές & Βιολογικές Μέθοδοι (5.1-5.11).....	σελ. 34-48
Βιοχημικές Μέθοδοι (5.12).....	σελ. 49-51
5.1 Καλλιέργειες & Συλλογή Κυττάρων.....	σελ. 34-35
5.1.1 Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιιεργειών.....	σελ. 34
5.1.1.1 Προετοιμασία εναρκτήριων βακτηριακών καλλιιεργειών.....	σελ. 34
5.1.1.2 Προετοιμασία μεγάλων καλλιιεργειών <i>E. Coli</i> ολονύκτιας επώασης.....	σελ. 34
5.1.1.3 Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων.....	σελ. 35
5.1.2 Ανάπτυξη καλλιιεργειας ζύμης.....	σελ. 35
5.1.2.1 Προετοιμασία εναρκτήριων καλλιιεργειών ζύμης.....	σελ. 35
5.1.2.2 Προετοιμασία των κύριων καλλιιεργειών ζύμης.....	σελ. 35
5.1.2.3 Συλλογή των κυττάρων ζύμης.....	σελ. 35
5.2 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA (Midiprep).....	σελ. 36-37
5.3 Ηλεκτροφόρηση σε τζέλ αгарόζης.....	σελ. 38
5.4 Σχεδιασμός εκκινητών.....	σελ. 39
5.5 Θέσιο-κατευθυνόμενη μεταλλάξηγένεση.....	σελ. 40-43
5.5.1 Θέσιο-κατευθυνόμενη μεταλλαξηγένεση (η μέθοδος).....	σελ. 40
5.5.2 Έλεγχος της μεταλλαξηγένεσης.....	σελ. 41
5.5.3 Αντίδραση μεταλλαξηγένεσης.....	σελ. 41-42
5.5.4 Παράμετροι περιοδικής μεταβολής θερμοκρασίας.....	σελ. 42
5.5.5 Πέψη των προϊόντων μεταλλαξηγένεσης με Dpn I.....	σελ. 43
5.5.6 Μετασχηματισμός των κυττάρων XL-10.....	σελ. 43
5.6 Πέψη DNA.....	σελ. 44

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

5.7 Μετασχηματισμός ζύμης.....σελ.	45
5.7.1 Προετοιμασία των κυττάρων ζύμης για μετασχηματισμό.....σελ.	45
5.7.2 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης με χρήση θερμικού σοκ.....σελ.	45
5.8 Colony PCR.....σελ.	46
5.8.1 Colony PCR –Η αντίδραση.....σελ.	46
5.8.2 Παράμετροι περιοδικής μεταβολής θερμοκρασίας.....σελ.	46
5.9 Καθαρισμός των Colony PCR προϊόντων.....σελ.	47
5.10 DNA Αλληλούχιση (Sequencing).....σελ.	48
5.11 Αποθήκευση βακτηριακών στελεχών & στελεχών ζύμης.....σελ.	48
5.12 Δοκιμές αντίστασης φαρμάκων (βιοχημική μέθοδος).....σελ.	49-51
5.12.1 Δοκιμές αντίστασης σε τριβλία με άγαρ.....σελ.	50
5.12.2 Δοκιμές αντίστασης σε υγρές καλλιέργειες.....σελ.	51
6. Αποτελέσματα.....σελ.	52-74
6.1.1 Προϊόντα της θεσιο-κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης.....σελ.	53-54
6.2 Κλωνοποιώτας της “knock-in” κασέτας.....σελ.	55
6. 2.1 Προϊόντα πέψης.....σελ.	56
6.3 Μεταλλάγματα ζύμης.....σελ.	57-58
6.4 Colony PCR-προϊόντα.....σελ.	59
6.5 Οι Pdr5 μεταλλαγές διαμορφώνουν διαφορετικά πρότυπα αντίστασης.....σελ.	60-74
6.5.1 Δοκιμές αντίστασης φαρμάκων σε τριβλία με άγαρ.....σελ.	60-66
6.5.1.1 Δοκιμή αντίστασης στο κυκλοεξιμιδίου σε τριβλία με άγαρ.....σελ.	60-62
6.5.1.2 Δοκιμή αντίστασης στην ροδαμίνη 6G σε τριβλία με άγαρ.....σελ.	63-64
6.5.1.3 Δοκιμή αντίστασης παρουσία κετοκοναζόλης σε τριβλία άγαρ.....σελ.	65-66
6.5.2 Δοκιμές αντίστασης φαρμάκων σε υγρές καλλιέργειες.....σελ.	67-74
6.5.2.1 Αποτελέσματα αντίστασης στο κυκλοεξιμιδίου σε υγρές καλλιέργειες.....σελ.	67-68
6.5.2.2 Αποτελέσματα αντίστασης στην κετοκοναζόλη σε υγρές καλλιέργειες.....σελ.	69-70
6.5.2.3 Αποτελέσματα αντίστασης στην φλουκοναζόλη σε υγρές καλλιέργειες.....σελ.	71-72
6.5.2.4 Αποτελέσματα αντίστασης στην ροδαμίνη 6G σε υγρές καλλιέργειες.....σελ.	73-74
7. Συζήτηση.....σελ.	75-77
8. Μελλοντικές Προοπτικές.....σελ.	78
9. Ευχαριστίες.....σελ.	79
10. Αναφορές.....σελ.	80-84
11. Βιβλιογραφία.....σελ.	85

1. Περίληψη

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, το φαινόμενο της πλειοτροπικής αντίστασης στα φαρμάκα (PDR) έλαβε ιδιαίτερη προσοχή, λόγω του ότι παθογόνοι μύκητες, όπως οι *Candida Albicans*, *Canida Glabrata* και *Aspergillus Fumigatus*, εμφανίζουν αντίσταση στη θεραπεία. Ο περιορισμένος αριθμός των αντιμυκητιασικών φαρμάκων που είναι διαθέσιμα για τη θεραπεία των ασθενών με εξασθενημένα ανοσοποιητικά συστήματα (όπως ασθενείς μετά από μεταμόσχευση, αλλά και ασθενείς με AIDS και καρκίνο) γέννησε την ανάγκη για μία καλύτερη κατανόηση του φαινομένου.

Τα δίκτυα PDR του μη παθογενούς *S. cerevisiae* και των ανθρώπινων παθογόνων μυκήτων είναι πολύ παρόμοια. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η ζύμη *S. cerevisiae* αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στις μελέτες μας πάνω στο PDR φαινόμενο.

Σε όλους τους γνωστούς μύκητες η μεταφορά των ξеноβιοτικών ουσιών δια μέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης διαμεσολαβείται κυρίως μέσω των μεταφορέων ABC. Αυτοί οι μεταφορείς διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στην αναγνώριση και την εξώθηση τοξικών ουσιών, χρησιμοποιώντας την ενέργεια της υδρόλυσης ATP προκειμένου να μεταφεθούν αυτές τις ενώσεις.

Ένας από τους σημαντικότερους μεταφορείς ABC, ή ίσως ο σημαντικότερος, που συμμετέχει στο δίκτυο PDR στη ζύμη *S. cerevisiae* είναι ο Pdr5 μεταφορέας. Το PDR5 γονίδιο κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική ATP-δεσμευτική πρωτεΐνη, η οποία είναι αρμόδια για την εξώθηση μίας τεράστιας ποικιλίας τοξικών ενώσεων από τα κύτταρα της ζύμης. Πράγματι, η απώλεια του PDR5 γονιδίου οδηγεί σε δραματική ευαισθησία των κυττάρων ζύμης έναντι ενός ευρέος φάσματος διαφορετικών τοξικών πρακτόρων.

Ο Pdr5, όπως όλοι οι λειτουργικοί μεταφορείς ABC, αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές περιοχές (TMDs) και από δύο νουκλεοτιδο-δεσμευτικές περιοχές (NBDs). Όπως σε όλους τους μεταφορείς ABC, οι NBDs περιοχές περιέχουν κάποιες χαρακτηριστικές και καλά συντηρημένες ακολουθίες, όπως τα μοτίβα A και B, τον C-βρόχο και τα μοτίβα H-βρόχων. Οι NBDs ενεργούν ως οι μηχανικές περιοχές που παρέχουν στο μεταφορέα την απαραίτητη ενέργεια για να μεταφέρει τα τοξικά υποστρώματα. Από την άλλη, οι λιγότερο συντηρημένες TMDs περιοχές είναι αρμόδιες για τη σύνδεση και την εξώθηση των φαρμάκων.

Αν και οι μεταφορείς ABC, όπως και ο καλά μελετημένος Pdr5 μεταφορέας, διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο στα δίκτυα PDR στους μύκητες, μερικές κεντρικές μηχανιστικές ερωτήσεις που αφορούν τον μηχανισμό της υδρόλυσης του ATP αλλά και τον μηχανισμό αναγνώρισης και διακίνησης των υποστρωμάτων παραμένουν άλυτες. Προκειμένου να γίνουν κατανοητοί καλύτερα οι μοριακοί μηχανισμοί αυτών των πρωτεϊνών χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης για να παραγάγουμε διάφορες μεταλλαγές στο PDR5 γονίδιο και στην συνέχεια εκτελέσαμε δοκιμές αντίστασης φαρμάκων.

Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας μπορούν να συνοψιστούν σε ένα πρότυπο με πέντε κεντρικά αξιώματα:

I) Εισαγωγή των C199K, N334E, Y367H, N1011E, V1012G, E1013G Pdr5 σημειακών μεταλλαγών στα κύτταρα ζύμης *S. cerevisiae* και απόκτηση κυττάρων ζύμης που εκφράζουν τις 1) τριπλές N1011S-V1012G-E1013G Pdr5, 2) τις N1011S-V1012G-E1013G-Y367H Pdr5, και 3) τις N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K Pdr5 μεταλλαγές.

II) Η ευαισθησία στα φαρμάκα των κυττάρων ζύμης που φέρουν διαφορετικές μεταλλάξεις στον Pdr5 μεταφορέα εξαρτάται από τη φύση του φαρμάκου.

III) Τα πειράματα αντίστασης φαρμάκων αποκαλύπτουν μια «συνομιλία» μεταξύ των NBDs και των TMDs περιοχών.

IV) Η αμινοξική ασυμμετρία μεταξύ των δύο NBDs αποκαλύπτει και μια λειτουργική ασυμμετρία.

V) Η μεταλλαγή Y367H οδήγησε σε μια σημαντική αύξηση της αντίστασης ενάντια σε όλα τα δοκιμασμένα υποστρώματα, ενώ τα κύτταρα που εκφράζουν τη μεταλλαγή C-βρόχων E1013G εμφάνισαν ιδιαίτερα ευαίσθητο φαινότυπο για όλες τις δοκιμασμένες τοξικές ενώσεις.

2. Εισαγωγή

2.1 Οι ABC Μεταφορείς

Οι ABC [ATP-Binding Cassette (ABC)] μεταφορείς ανήκουν στην υπεροικογένεια μεταφορέων, η οποία χρησιμοποιεί την ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση του ATP, για να διεξάγει την μεταφορά των εκάστοτε υποστρωμάτων δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών. (Higgins, 1992). Οι αναφερόμενοι μεταφορείς εμπλέκονται στην εξώθηση ή την είσοδο μιας ποικιλίας υποστρωμάτων που περιλαμβάνει ιόντα, σάκχαρα, αμινοξέα, λιπίδια, και ξеноβιοτικές ουσίες και αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες πρωτεϊνικές οικογένειες ανάμεσα σε όλα τα είδη. Μάλιστα, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τους ABC μεταφορείς προκαλούν ποικίλες ασθένειες, όπως η Κυστική Ίνωση και το σύνδρομο Dubin-Johnson (Klein *et al.*, 2009). Επιπλέον, μερικοί ABC μεταφορείς είναι υπεύθυνοι για το φαινόμενο της πολλαπλής αντίστασης (multidrug resistance phenomenon), το οποίο ευθύνεται για την αντίσταση που εμφανίζουν οι όγκοι στην χημειοθεραπεία (Gottesman *et al.*, 1995; Kane, 1996), αλλά και για την αντίσταση που παρουσιάζουν τα παθογόνα μικρόβια στην θεραπεία (Sanglard D., 2002).

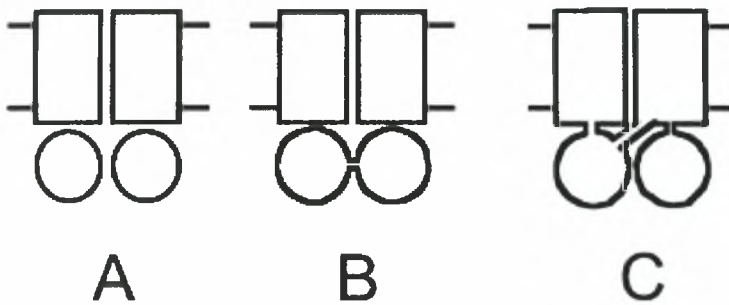
Η μοριακή αρχιτεκτονική των ABC μεταφορέων περιλαμβάνει την παρουσία δύο διαμεμβρικών δομών [transmembrane domains (TMDs)] και δύο περιοχών που δεσμεύουν ATP [nucleotide binding domains (NBDs)]. Σε κάποιους αυτές οι τέσσερις υπομονάδες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, ενώ σε άλλους η μία μονάδα TMD κωδικοποιείται παράλληλα με την μία μονάδα NBD (Christine Oswald, Barry Holland, Lutz Schmitt 2006). Βέβαια, υπάρχει και η περίπτωση και οι τέσσερις υπομονάδες να κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο (Εικόνα 1). Τέλος, μία επιπρόσθετη δομική μονάδα μπορεί να ενθεθεί και να συμπληρώσει την βασική δομή του μεταφορέα. Τέτοια συστήματα συναντώνται κυρίως σε βακτήρια (Zaitseva *et al.*, 1996, Groeger & Koster 1998, Horn *et al.*, 2003).

2.1.1 ABC συστήματα εισόδου

Η σημαντικότερη λειτουργία των συστημάτων εισαγωγών ABC, όπως της μαλτόζης (Bavoil *et al.*, 1980) ή της γλυκόζης (Albers *et al.*, 1999) είναι η παροχή θρεπτικών ουσιών στα βακτηρίδια. Βρίσκονται μόνο στους προκαρυώτες και στα αρχαία, ενώ οι τέσσερις συστατικές περιοχές τους κωδικοποιούνται συνήθως από τα ανεξάρτητα γονίδια. Οι προκαρυωτικοί εισαγωγείς απαιτούν πρόσθετες δεσμευτικές πρωτεΐνες (μια ή περισσότερες ανά συστήματα) για τη λειτουργία τους. (Hiroshi Nikaido, 2002).

2.1.2 ABC συστήματα εξώθησης

Συστήματα εξαγωγής ABC, όπως το σύστημα έκκρισης HlyB τύπου I (Holland *et al.*, 2005) και αυτό της ανθρώπινης P-Glycoprotein (Chen *et al.*, 1986, Kane, 1996), περιλαμβάνονται στην εξώθηση επιβλαβών ή τοξινών ουσιών και βρίσκονται σε όλους τους οργανισμούς. Χαρακτηριστικό των ευκαρυωτικών εξαγωγέων είναι ότι συνήθως κωδικοποιούν τις τέσσερις περιοχές στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα (Hiroshi Nikaido, 2002).



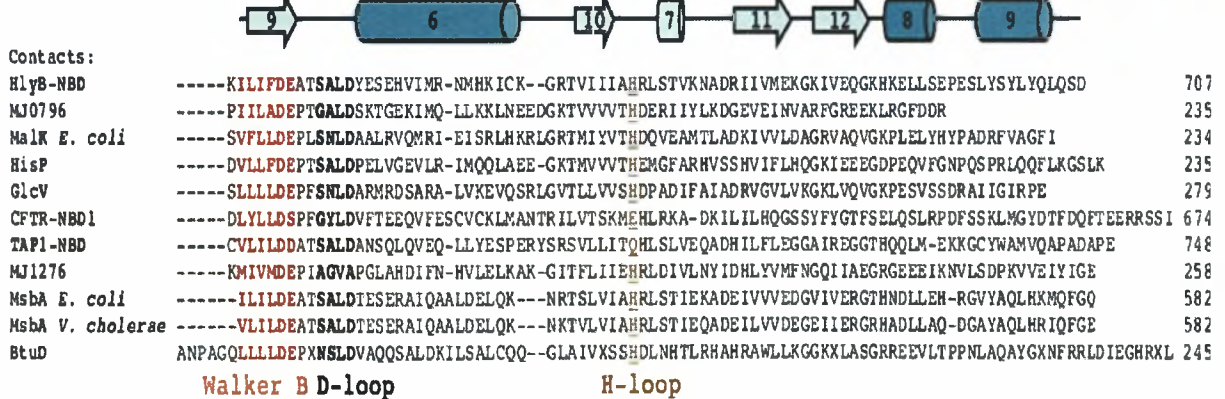
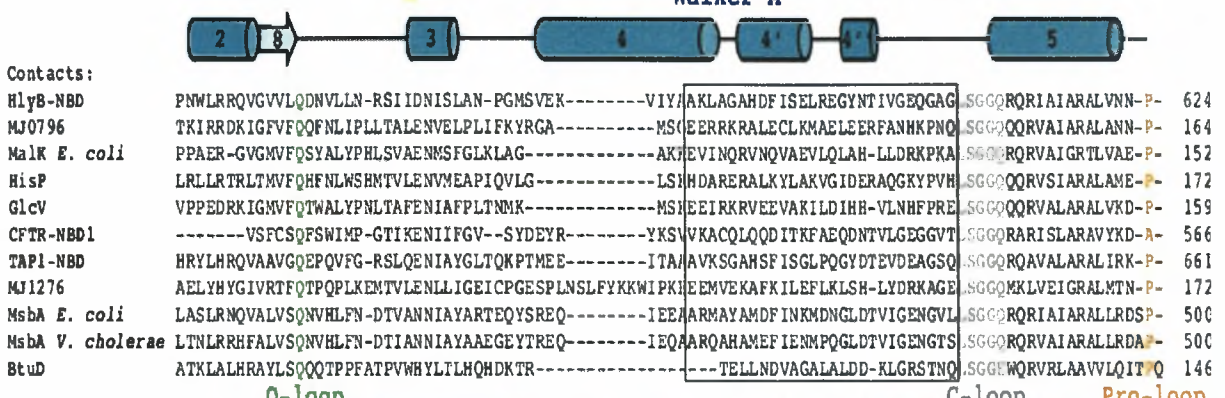
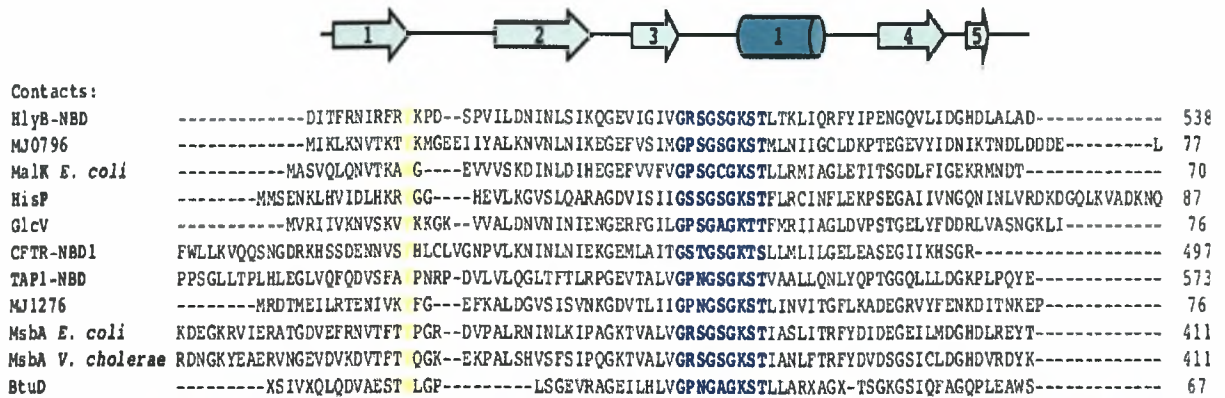
Εικόνα 1. Σχηματικές δομές μερικών μεταφορέων ABC (Hiroshi Nikaido, 2002). (α) Στα βακτηρίδια, πολλοί μεταφορείς αποτελούνται από δύο διαμεμβρανικές υπομονάδες (ορθογώνια) και δύο ATPase υπομονάδες (κύκλοι). Εάν είναι εισαγωγέας, μια πέμπτη υπομονάδα-δεσμευτική πρωτεΐνη (που δεν παρουσιάζεται) απαιτείται επίσης. (β) Σε μερικούς βακτηριακούς μεταφορείς, οι δύο ATPase περιοχές συναντώνται σε μια ενιαία πρωτεΐνη, ενώ (γ) στους πύο μύκητες και τα θηλαστικά όλες οι περιοχές του μεταφορέα κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο.

2.1.3 Οι χαρακτηριστικές δομές των ABC μεταφορέων

Οι μεταφορείς ABC αποτελούνται από τις ιδιαίτερα συντηρημένες περιοχές νουκλεοτιδικής δέσμησης (NBDs) και από τις λιγότερο συντηρημένες διαμεμβρανικές περιοχές (TMDs). Οι μονάδες των NBDs είναι γνωστό ότι δεσμεύουν και υδρολύουν ATP παρουσία ενός μορίου μαγνησίου, ενώ οι TMDs περιλαμβάνονται στην αναγνώριση και τη δυνατότητα διακίνησης των υποστρωμάτων.

Η πρωτοταγής ακολουθία των NBDs συντηρείται ιδιαίτερα και φέρνει μερικά χαρακτηριστικά μοτίβα (Εικόνα 2.), παρόντα σε όλους τους μεταφορείς ABC όπως το μοτίβο A GXXGXGKS/T (Walker A), όπου το X αντιπροσωπεύει οποιοδήποτε αμινοξύ (Walker *et al.*, 1982), και μια περιοχή που αναπτύσσει συνδέσεις με το μόριο μαγνησίου, το μοτίβο B (Walker B) hhhhD, όπου το h είναι οποιοδήποτε υδροφοβικό αμινοξύ (Vetter & Wittinghofer 1999). Εκτός από αυτές τις δύο περιοχές, τέσσερα άλλα συντηρημένα μοτίβα είναι παρόντα στην κασέτα ABC: η περιοχή διακοπών που περιέχει έναν βρόχο ιστιδίνης (Histidine-loop), το συντηρημένο μοτίβο LSGGQ (C-loop motif) που αναφέρεται ως σφραγίδα των μεταφορέων ABC (Schmitt & Tampé 2002), το Q-μοτίβο, το οποίο αλληλεπιδρά με τη γ-φωσφορική ομάδα μέσω ενός δεσμού νερού, και το αρκετά διαγνωστικό μοτίβο D-βρόχων. Οι περιοχές Walker A και B, ο Q-βρόχος, η περιοχή διακοπών και η περιοχή του C-βρόχου σχηματίζουν την περιοχή δέσμησης του ATP μορίου (Schmitt *et al.*, 2003, Christine Oswald, I, Barry Holland, Lutz Schmitt 2006).

Συγκριτικά με τις περιοχές νουκλεοτιδικής πρόσδεσης, δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία για τη λειτουργία των λιγότερο συντηρημένων διαμεμβρανικών περιοχών. Εντούτοις, η μεταλλακτική ανάλυση, όπως ο προσδιορισμός της μετάλλαξης S1360F στην διαμεμβρανική έλικα 11 του εξαγωγέα ζύμης ABC Pdr5 που οδηγεί σε μια αλλαγή της αναγνώρισης υποστρωμάτων (Egner *et al.*, 1998, 1999) κατέδειξε ότι οι TMDs είναι σημαντικοί για τη μεταφορά φαρμάκων. Επιπλέον, μελέτες στον P-gr μεταφορέα των θηλαστικών με χρήση μεταλλαξιγένεσης προσδιόρισαν τους TMD1, TMD5/6 και TMD11/12 ως σημαντικά πρωτεϊνικά τμήματα που περιλαμβάνονται στην αναγνώριση και τις μεταφορές υποστρωμάτων (Ueda *et al.*, 1997). Επίσης, παράλληλα έχει παρουσιαστεί μια φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των TMD6 και TMD12 της P-gr, αλλά και η συμμετοχή τους στη σύνδεση φαρμάκων (Loo & Clarke, 1996 & 1997 α,β). Ακόμα, είναι γνωστό ότι η Pgr-διαμεσολαβούμενη μεταφορά φαρμάκων συνοδεύεται από διαμορφωτικές αλλαγές, (Mechetner *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 1997). Τέλος, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ο μεταφορέας ζύμης Pdr5 ABC μπορεί να χρησιμοποιήσει περισσότερες από μια δεσμευτικές περιοχές υποστρωμάτων (Kolaczkowski *et al.*, 1996). Είναι λοιπόν προφανές, από τα παραπάνω, ότι στον τομέα της αναγνώρισης και της δυνατότητας διακίνησης υποστρωμάτων υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν για να γίνει κατανοητή η ανάπτυξη του φαινομένου πλειοτροπικής αντίστασης (multidrug resistance) στα καρκινικά κύτταρα άλλα στους παθογόνους μικροοργανισμούς.



Εικόνα 2. Στοιχισμός της αλληλουχίας των NBDs επιλεγμένων ABC μεταφορέων, γνωστής δομής (Christine Oswald. I. Barry Holland. Lutz Schmitt 2006). Τα μοτίβα A και B (Walker A και B) είναι χρωματισμένα με μπλε και κόκκινο, αντίστοιχα. Ο ιδιαίτερα συντηρημένος C-βρόχος (C-loop) παρουσιάζεται στο γκρι και ο D-βρόχος μετά από το μοτίβο B είναι χρωματισμένος με μαύρο. Τέλος, ο Q-βρόχος (Gln) είναι χρωματισμένος με πράσινο, ενώ ο Pro-βρόχος χρωματίζεται με πορτοκάκι και ο H-βρόχος (Histidine loop) με καφέ.

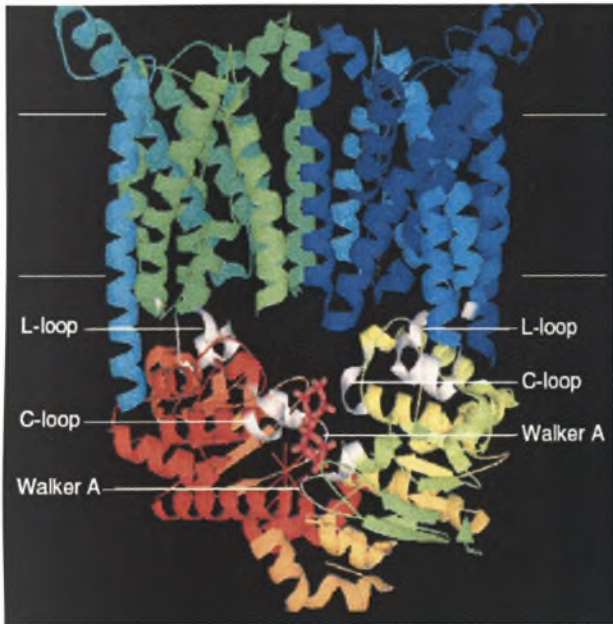
2.1.4 Η δομή των ABC μεταφορέων

2.1.4.1 Τι μπορεί να μας αποκαλύψουν οι δομές;

Σχετικά με τους μεταφορείς ABC δεν είναι ακόμα σαφές πώς το ATP αλληλεπιδρά με τις περιοχές νουκλεοτιδικής δέσμευσης (NBDs) και πως η παραγόμενη ενέργεια από την υδρόλυση του ATP προσδίδει τη δυνατότητα διακίνησης των υποστρωμάτων. Επιπλέον, ο τρόπος που η ενέργεια διαβιβάζεται από τις καταλυτικές στις μεμβρανικές περιοχές, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μεταφορά υποστρωμάτων από τις TMDs περιοχές είναι επίσης θεμελιώδη ζητήματα που παραμένουν αναπάντητα. Η δομική περιγραφή σε σχέση με τη βιοχημική ανάλυση των πρωτεϊνών ABC μπορεί να δώσει τις απαντήσεις στις ανωτέρω βασικές ερωτήσεις, και να οδηγήσει σε προώθηση της έρευνας των μεταφορών ABC. Γενικά, η δομική ανάλυση είναι ένα σημαντικό εργαλείο που μπορεί να αποκαλύψει όχι μόνο τις συνδέσεις σύνδεσης μεταξύ των διαφορετικών περιοχών αλλά και τις αλληλεπιδράσεις με τα εκάστοτε υποστρώματα.

2.1.4.2 Η τρισδιάστατη δομή του ABC BtuCD μεταφορέα

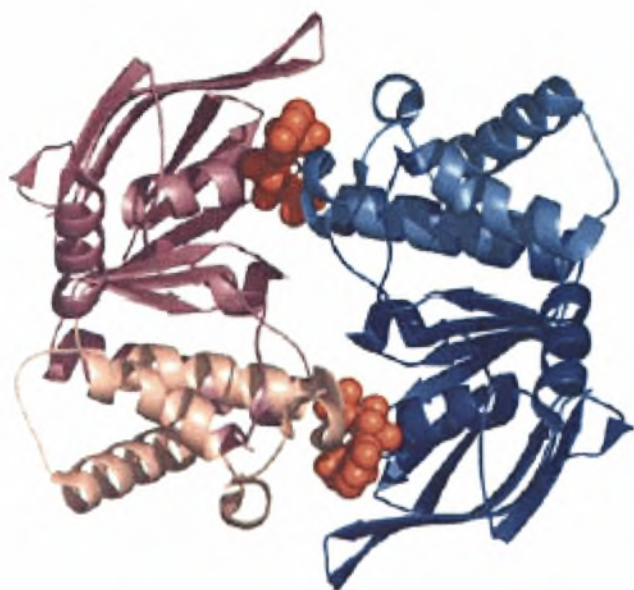
Το 2002 ο Locher και οι συνεργάτες του (Locher *et al.*, 2002) παρουσίασαν τη δομή του εισαγωγέα BtuCD της βιταμίνης B12 από τον οργανισμό *E. Coli*, ελλείψει του υποστρώματος και μορίου ATP (Εικόνα 3.). Αυτή ήταν μια από τις πρώτες δομές ενός ολόκληρου μεταφορέα ABC που μας προσέφερε μία τρισδιάστατη προσέγγιση των μεταφορέων ABC. Ο εισαγωγέας BtuCD βιταμινών B12 αποτελείται από δύο διαμεμβρανικές και δύο περιοχές νουκλεοτιδικής δέσμευσης. Κάθε διαμεμβρανική (TMD) μονάδα αποτελείται από δέκα α -έλικες, αντί του αριθμού έξι που συνήθως συναντάμε στα πρότυπα τοπολογίας των μεταφορέων ABC. Από την άλλη, στην περιοχή νουκλεοτιδικής δέσμευσης συναντούνται τα μοτίβα A και B, καθώς και τα μοτίβα H-βρόχου στο ένα μονομερές και του του C-βρόχου στο άλλο μονομερές. Οι περιοχές των δυο μονομερών αλληλεπιδρούν μεταξύ τους διαμορφώνοντας την καταλυτική περιοχή που δεσμεύει και υδρολύει ATP.



Εικόνα 3. Η δομή του εισαγωγέα βιταμινών B12 από τον οργανισμό *E. Coli*. Ο βρόγχος A και οι ακολουθίες C-βρόχων είναι χρωματισμένοι σε άσπρο.

2.1.4.3 Η δομή των περιοχών νουκλεοτιδικής δέσμευσης

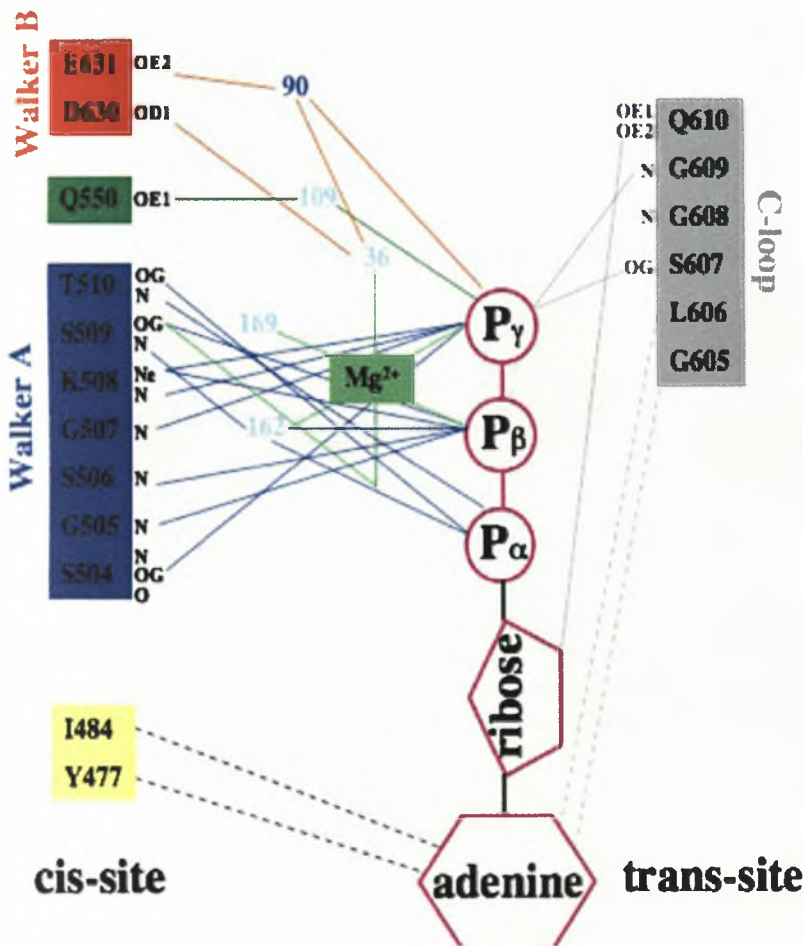
Μέχρι τώρα, έχουν προσδιοριστεί οι τρισδιάστατες δομές διαφόρων NBDs, όπως αυτή του μεταφορέα HisP της *Escherichia coli* (Hung *et al.*, 1998), του MalK από τους οργανισμούς *Thermococcus litoralis* και *E. coli* (Diederichs *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003), του MJ1276 από τον *Methanococcus jannaschii* (Karpowich *et al.*, 2001), του MJ0796 από τον *M. jannaschii* (Yuan *et al.*, 2001), του ανθρώπινου μεταφορέα TAP1 (Gaudet and Wiley, 2001), του GlcV από τον *Sulfolobus solfataricus* (Verdon *et al.*, 2003a), του HlyB από τον οργανισμό *E. coli* (Schmitt *et al.*, 2003) και του ανθρώπινου CFTR ABC μεταφορέα (Lewis *et al.*, 2004). Αυτές οι δομές παρουσιάζουν ότι η τρισδιάστατη δομή μιας νουκλεοτιδο-δεσμευτικής περιοχής υιοθετεί μια L-μορφή με δύο ευδιάκριτους βραχίονες (Εικόνα 4.). Ο ιδιαίτερα συντηρημένος βραχίονας I περιλαμβάνει τη ATP-δεσμευτική περιοχή με τα A και B μοτίβα, ενώ ο άλλος βραχίονας (βραχίονας II) περιέχει το μοτίβο του C-βρόχου. Το μοτίβο A αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες του ATP και του ADP (Hung *et al.*, 1998; Hopfner *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2001; Karpowich *et al.*, 2001; Gaudet and Wiley, 2001; Verdon *et al.*, 2003a; Chen *et al.*, 2003), και οι περιοχές του μοτίβου B συντονίζουν την πρόσδεση του Mg^{2+} στη περιοχή νουκλεοτιδικής δέσμευσης (Yuan *et al.*, 2001; Verdon *et al.*, 2003a; Karpowich *et al.*, 2003). Από την άλλη, ο βραχίονας II περιλαμβάνει μια δομικά διαφορετική περιοχή (SDR) περίπου 30 αμινοξέων (Schmitt *et al.*, 2003), και αλληλεπιδρά με το διαμεμβρανικό μέρος των μεταφορέων ABC. Η άρθρωση μεταξύ του βραχίονα I και του βραχίονα II περιλαμβάνει και τον H-βρόχο και τον Q-βρόχο, που δημιουργούν επαφή με τη γ-φωσφορική ομάδα του μορίου ATP. Η υδρόλυση του ATP οδηγεί σε διαμορφωτικές αλλαγές που θα μπορούσαν να διευκολύνουν την απελευθέρωση ADP. Στο διμερές, οι δύο κασέτες ABC έρχονται σε επαφή η μια με την άλλη μέσω των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων στο αντιπαράλληλο βήτα-φύλλο του βραχίονα I.



Εικόνα 4. Δομή του NBD MJ0796 (1L2T), (Chris van der Does & Robert Tampe', 2004). Ο βραχίονας I και ο βραχίονας II του μονομερούς είναι χρωματισμένοι μόνιμο και ρόδινο χρώμα, ενώ ο βραχίονας I και ο βραχίονας II άλλο μονομερές χρωματίζονται με σκούρο και ανοικτό μπλε. Το ATP απεικονίζεται με μορφή συμπαγών σφαιρών και χρωματίζεται με κόκκινο. Η εικόνα δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *Rymol*.

2.1.5 Δεσμευτικές αλληλεπιδράσεις ATP

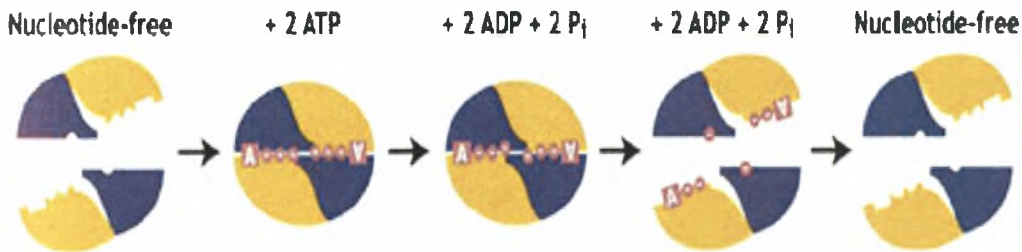
Η δομική ανάλυση του διμερούς hlyB-NBD παρουσία του ATP (Zaitseva *et al.*, 2005) αποκάλυψε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μορίου ATP και των περιοχών νουκλεοτιδικής δέσμευσης (Εικόνα 5.). Στο διμερές, το ATP ενεργεί ως “μοριακή κόλλα” και δεσμεύεται μεταξύ του μοτίβου A του *cis*-μονομερούς και του μοτίβου του C-βρόχου του αντίθετου μονομερούς (*trans*-μονομερές). Συγκεκριμένα, το μοτίβο A αλληλεπιδρά με τις φωσφορικές ομάδες του ATP, έχοντας μια εξειδικευμένη περιοχή που σχηματίζει δεσμούς με τη γ-φωσφορική ομάδα του υποστρώματος. Το μοτίβο B και ο Q-βρόχος αλληλεπιδρούν επίσης με τη γ-φωσφορική ομάδα, ενώ οι περιοχές των γ-βρόχων από το δεύτερο μονομερές δημιουργούν επαφές κυρίως με τη γ-φωσφορική ομάδα του ATP. Με εξαίρεση την αλληλεπίδραση με την ριβόζη του ATP, όλες οι άλλες αλληλεπιδράσεις του γ-βρόχου με το *trans*-μονομερές κατευθύνονται προς τη γ-φωσφορική ομάδα.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των δεσμευτικών αλληλεπιδράσεων του ATP στο Hly-NBD διμερές (Zaitseva *et al.*, 2005).

2.1.6 Ο ATP-οδηγημένος κύκλος αντίδρασης των μεταφορέων ABC

Αν και είναι γνωστό ότι η σύνδεση και η υδρόλυση ATP οδηγούν στη μεταφορά υποστρωμάτων, ο ακριβής μηχανισμός της σύνδεσης και της υδρόλυσης του ATP είναι ακόμα ασαφής. Ένα από τα δημοφιλέστερα μοντέλα παρουσιάζει ότι ο κύκλος αντίδρασης των ABC μεταφορέων οδηγείται από το διμερισμό των περιοχών νουκλεοτιδικής δέσμευσης των ABC μεταφορέων κατά τη δέσμευση του ATP (Hopfner *et al.*, 2000). Συγκεκριμένα, στην ελεύθερη μορφή, οι υδρόφιλες νουκλεοτιδο-δεσμευτικές δομές βρίσκονται σε μια ανοικτή, μονομερική διαμόρφωση. Η δέσμευση του ATP προκαλεί το σχηματισμό μίας ισχυρά κλειστής διαμόρφωσης “σάντουιτς”. Μετά από την υδρόλυση του ATP, η ηλεκτροστατική άπωση μεταξύ του προϊόντος ADP που είναι δεσμευμένο στο μοτίβο A και του ανόργανου φωσφορικού προϊόντος που δημιουργεί δεσμούς με το μοτίβο LSGGQ στο απέναντι μονομέρες οδηγεί στον χωρισμό των νουκλεοτιδο-δεσμευτικών υπομονάδων (Davidson, 2002). Τέλος, ο κύκλος της αντίδρασης ολοκληρώνεται όταν απελευθερώνεται το παραγόμενο προϊόν (ADP) από την ενεργό περιοχή, λόγω της μειωμένης συγγένειάς που παρουσιάζει έναντι του ATP (Εικόνα 6.).



Εικόνα 6. Ο ATP-οδηγημένος κύκλος αντίδρασης των μεταφορέων ABC (Paul C. Smith *et.*, *al.*, 2002). Η πορτοκαλή υπομονάδα στη μηχανιστική σχηματική αναπαράσταση αντιπροσωπεύει την *cis*-μονάδα, ενώ η μπλε υπομονάδα αντιπροσωπεύει την *trans*-περιοχή συνδεσης του ATP. Το νουκλεοτίδιο παρουσιάζεται με μοβ χρώμα, με κάθε κύκλο να αντιπροσωπεύει μία φωσφορική ομάδα.

2.2 Ο Pdr5 ABC μεταφορέας

Η εξέλιξη εξόπλισε την ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* με ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών για να μπορεί ν' αποκριθεί γρήγορα σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες. Με τον όρο δυσμενείς συνθήκες απευθυνόμαστε σε συνθήκες ακραίων για τον οργανισμό θερμοκρασιών, σε υψηλές οσμωμοριακές πιέσεις ή στην παρουσία ξενοβιοτικών ουσιών. Ένας μηχανισμός απόκρισης παρουσία τοξικών ενώσεων είναι η έκφραση των ABC μεταφορέων (πίνακας 1.), οι οποίοι μεταφέρουν τις κυτταροτοξικές ουσίες από το κυτταρόπλασμα στον εξωκυττάριο χώρο (Bauer *et al.*, 1999). Ο ανωτέρω μηχανισμός προσαρμοστικότητας είναι γνωστός ως πλειοτροπικό φαινόμενο αντίστασης στα φάρμακα (PDR) (Balzi και Goffeau, 1994) και μεσολαβείται από ένα συγκρότημα μεταφορέων όπως οι Pdr5p, Snq2p, και Yor1p. (Ernst *et al.*, 2005).

Η ανάπτυξη του δικτύου PDR στη ζύμη είναι παρόμοια με την αντίσταση στα φάρμακα στα κύτταρα των θηλαστικών (MDR). Το φαινόμενο MDR χαρακτηρίζεται από την υπερέκφραση του MDR1 μεταφορέα [P-glycoprotein (P-GP)] και ευθύνεται για την αποτυχία των χημειοθεραπευτικών μεθόδων, παραμένοντας ένα σημαντικό εμπόδιο στην επιτυχή θεραπεία του καρκίνου (Chen *et al.*, 1986, Kane, 1996).

Βέβαια, ο *Saccharomyces cerevisiae* δεν είναι ο μόνος μύκητας που εμφανίζεται αντίσταση παρουσία τοξικών ενώσεων. Η πλειοτροπική αντίσταση σε ξενοβιοτικές ουσίες είναι ένα κοινό φαινόμενο σε όλους τους γνωστούς μύκητες (παθογόνους ή μη), και αποτελεί ένα πρόβλημα ιδιαίτερης σπουδαιότητας για τον έλεγχο των μολύνσεων που προκαλούνται από τους παθογόνους μύκητες (Slavin *et al.*, 2004). Ο περιορισμένος αριθμός των αντιμυκητιασικών φαρμάκων σε σχέση με με την αύξηση της αντίστασης που εμφανίζουν οι παθογόνοι μύκητες, όπως αυτοί από το γένος *Candida* (Sanglard *et al.*, 1995, 1997, 1999) κάνει επιτακτική την ανάγκη για την κατανόηση της ρύθμισης των δικτύων πλειοτροπικής αντίστασης.

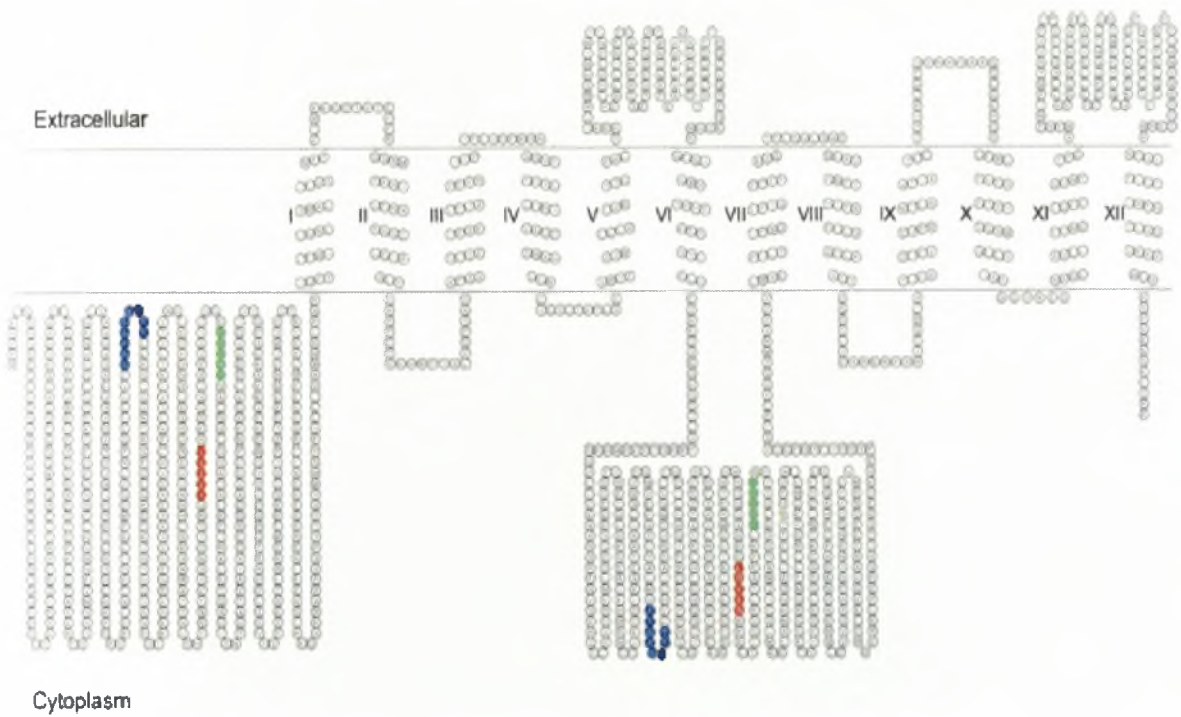
3.A.1.203	The Peroxysomal Fatty Acyl CoA Transporter (FAT) Family
3.A.1.203.2	PAT1/PAL1/PXA1 and PAT2/PAL2/PXA2: long chain fatty acyl COA importer
3.A.1.204	The Eye Pigment Precursor Transporter (EPP) Family
undetermined	ADP1: unknown substrate
3.A.1.205	The Pleiotropic Drug Resistance (PDR) Family
3.A.1.205.1	PDR5: cycloheximide/pleiotropic drug exporter
3.A.1.205.2	SNQ2: mutagen/pleiotropic drug exporter
3.A.1.205.3	PDR12: weak acid exporter.
undetermined	PDR10, PDR15 and YOR011: unknown substrates.
3.A.1.206	The Sex Pheromone Exporter (STE) Family
3.A.1.206.1	STE6: a-factor sex pheromone exporter
3.A.1.207	The Conjugate Transporter (CT1) Family
3.A.1.207.1	YCF1: vacuolar metal resistance factor
3.A.1.207.2	BAT1: vacuolar bile acid transporter
3.A.1.207.3	BPT1: vacuolar bilirubin transporter
undetermined	YHL035: unknown substrate
3.A.1.208	The Conjugate Transporter (CT2) Family
3.A.1.208.3	YOR1: oligomycin/pleiotropic drug exporter
3.A.1.209	The Major Histocompatibility Peptide Transporter (TAP) Family
undetermined	TAP1/TAP2: unknown substrate
3.A.1.212	The Mitochondrial Fe/S Protein Exporter (MPE) Family
3.A.1.212.1	ATM1: mitochondrial putative iron transporter
3.A.1.213	The Putative Transporter Family of Unknown Function
3.A.1.213.1	PDR11 and YOR011: unknown function
3.A.1.213.2	YOL075: unknown function
3.A.1.213.3	MDL1 and MDL2: unknown function

Πίνακας 1. Οι ABC μεταφορείς ζύμης, σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης (TC) μεταφορέων (Saier, 2000).

Αν και ο *Saccharomyces cerevisiae* έχει διάφορες ABC πρωτεΐνες πλειοτροπικής δράσης, ο Pdr5 μεταφορέας είναι ο εκτενέστερα χαρακτηρισμένος λόγω του πρωταρχικού ρόλου του στο πλειοτροπικό δίκτυο αντίστασης (PDR) (Egner *et al.*, 1995a), αλλά και της υψηλής ομολογίας του με τις ABC αντλίες εξώθησης φαρμάκων των παθογόνων μυκήτων (Prasad *et al.*, 1995, Sanglard *et al.*, 1995).

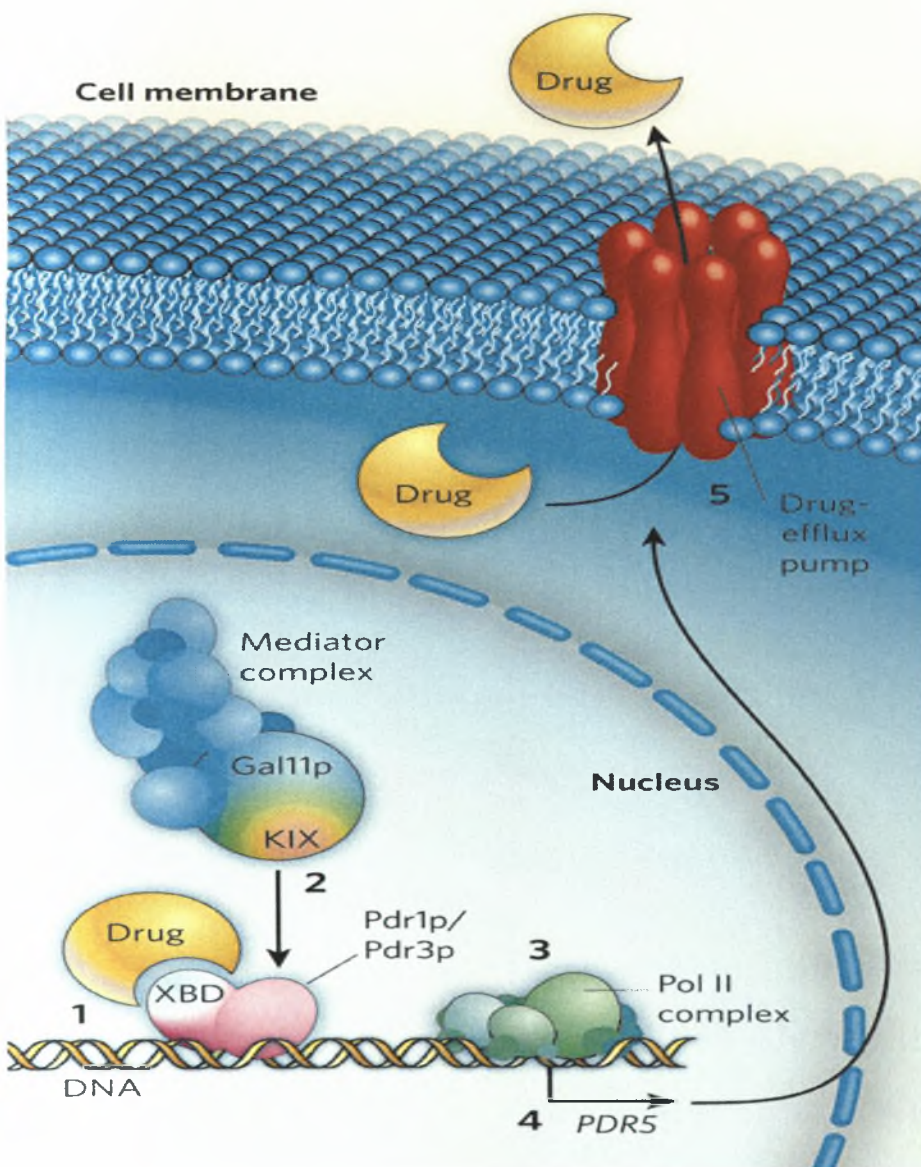
Ο Pdr5 ABC μεταφορέας μπορεί να μεταφέρει μια ευρεία ποικιλία υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του κυκλοεξιμιδίου που δρά ως ανασταλέας της πρωτεϊνοσύνθεσης (Balzi *et al.*, 1994), της μυκοτοξίνης σποριδεσμίνης (Bissinger & Kuchler, 1994), των αντιμυκησιακών αζολών, όπως η φλουκοναζόλη, η κετοκοναζόλη και η ιτρακοναζόλη (Sanglard *et al.*, 1995), των ενώσεων φθορισμού ροδαμίνης 6G και ροδαμίνης 123 (Kolaczowski *et al.*, 1996), των κατιονικών λιπόφιλων χρωστικών ουσιών που χρωματίζουν τα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων, και των στεροειδών, όπως η ντεξαμεθαζόνη (Kralli *et al.*, 1995) και η εστραδιόλη (Mahe' *et al.*, 1996a).

Ο Pdr5 συνίσταται από δύο διαμεμβρανικές περιοχές (TMDs) και δύο περιοχές νουκλεοτιδικής δέσμευσης (NBDs) (Εικόνα 7.). Οι υδρόφιλες NBDs φέρουν όλα τα χαρακτηριστικά μοτίβα των πρωτεϊνών ABC, όπως τα μοτίβα A και B, τον C-βρόχο, που αποτελεί την σφραγίδα της οικογένειας ABC, και τις ακολουθίες του H-βρόχου και του D-βρόχου (Schmitt L, Tampe' P, 2002), ενώ κάθε υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή συνίσταται από 6 α-έλικες. Ο Pdr5 είναι επίσης ένας μεταφορέας 160-kDa που και οι 4 υπομονάδες του κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο. Κάθε μισό του Pdr5 μεταφορέα αρχίζει μία NH₂-τελική NBD περιοχή που ακολουθείται από ένα TMD τομέα, σε αντίθεση με τον μεταφορέα P-gr, όπου οι διαμεμβρανικές περιοχές (TMDs) ακολουθούνται από τις νουκλεοτιδο-δεσμευτικές περιοχές (NBDs). Η σημασία αυτής της αντιστροφής των δομικών περιοχών στους μεταφορείς ζύμης ABC παραμένει μέχρι τώρα άγνωστη.



Εικόνα 7. Προβλεπόμενη τοπολογία του Pdr5 μεταφορέα (Ernst *et al.*, 2008). Οι περιοχές του ABC μεταφορέα όπου είναι παρούσα τα μοτίβα A και B παρουσιάζονται με μπλε και πράσινο χρώμα αντίστοιχα, ενώ ο C-βρόχος παρουσιάζεται με κόκκινο.

Η έκφραση του PDR5 γονιδίου είναι υπό έλεγχο των δύο ομόλογων ρυθμιστών μεταγραφής ψευδάργυρου (zinc finger transcription regulators), των Pdr1p και Pdr3p (Sarah MacPherson, *et al.*, 2006). Οι Pdr1p και Pdr3p μεταγραφικοί ρυθμιστές είναι φωσφοπρωτεΐνες που αναγνωρίζουν τα αποκαλούμενα πλειοτροπικά στοιχεία αντίστασης φαρμάκων (PDREs) στους υποκινητές των γονιδίων στόχων (Εικόνα 8.). Οι μεταλλαγές σε στα γονίδια ρυθμιστών, όπως του PDR1 ή του PDR3, ή η υπερέκφραση των μεμβρανικών πρωτεϊνών, όπως αυτή του μεταφορέα Pdr5, μπορούν να ενισχύσουν σημαντικά το επίπεδο αντίστασης (Bruce Rogers *et al.*, 2001).



Εικόνα 8. Σχηματική παρουσίαση της ρύθμισης της έκφρασης του PDR5 γονιδίου (Thakur, J. K. *et al.*, 2008). **(1)** Μέσα σε ένα μυκητιακό κύτταρο, ένα αντιμυκητιακό φάρμακο μπορεί να δεσμευτεί στην περιοχή XBD των παραγόντων μεταγραφής Pdr1p/Pdr3p, οι οποίοι συνδέονται στον υποκινητή του γονιδίου που κωδικοποιεί τον μεταφορέα Pdr5p, που είναι υπεύθυνος για την εξώθηση της ξενοβιοτικής ουσίας. **(2)** Αυτό το γεγονός επιτρέπει τη σύνδεση της υπομονάδας Gal11p του σύνθετου μεσολαβητή μέσω της περιοχής KIX του στο φάρμακο-Pdr1/Pdr3p-DNA. Ο μεσολαβητής αυτός διευκολύνει **(3)** τη στρατολόγηση της πολυμεράσης II RNA (POL II) και **(4)** οδηγεί σε αυξανόμενη μεταγραφή του PDR5 γονιδίου. Το γονίδιο PDR5 ανήκει σε μια οικογένεια των γονιδίων που κωδικοποιούν αντλίες εξώθησης φαρμάκων. **(5)** Στη κυτταρική μεμβράνη, αυτές οι αντλίες επιτρέπουν μεταφορά του αντιμυκητιακού φαρμάκου εκτός του κυττάρου, μικραίνοντας κατά συνέπεια την ευαισθησία του μυκητιακού κυττάρου στην τοξική ένωση.

3. Στόχοι Εργασίας

Μια από τις σημαντικότερες παρατηρήσεις κατά τη διάρκεια των μελετών πάνω στον Pdr5 ABC μεταφορέα είναι ότι η τρισδιάστατη αναδημιουργία του Pdr5p αποκάλυψε μια δομική ασυμμετρική οργάνωση των δύο NBDs (Antonio ferreira-Pereira, *et al.*, 2002). Ο αναφερόμενος εκφυλισμός μεταξύ των δύο NBDs στον Pdr5 μεταφορέα είναι κοινός σε όλους τους μυκητιακούς μεταφορείς ABC (Ralf Enger *et al.*, 1997) και συνδέεται πιθανά με μια λειτουργική ασυμμετρία των NBDs (Ernst *et al.*, 2008). Αφ' ετέρου, λειτουργική ασυμμετρία έχει ήδη προταθεί για τους NBDs άλλων μεταφορέων ABC συμπεριλαμβανομένου του P-gp (Takada *et al.*, 1998, Hrycyna *et al.*, 1999), του CFTR (Senior *et al.*, 1997, Aleksandrov *et al.*, 2002), και του Ste6 (Proff *et al.*, 2001), και σύμφωνα με το προτεινόμενο πρότυπο μεταφοράς της «δικυλινδρικής μηχανής» (van Veen, X. W., Higgins, C. F., & Konings, W. N., 2001) οι δύο NBDs δεν είναι ποτέ ισοδύναμοι και εμφανίζουν πάντα ασυμμετρία στη δομή.

Η ασυμμετρία μεταξύ των δύο Pdr5 ATP-δεσμευτικών περιοχών (NBDs) μπορεί εύκολα να καθοριστεί μετά από την κατά σειρά παράταξη των αμινοξέων τους (alignment) (Εικόνα 9.). Παρατηρείται εύκολα πως η ιδιαίτερα συντηρημένη λυσίνη του μοτίβου A, το γλουταμινικό του μοτίβου B και η ιστιδίνη του Η-βρόχου έχουν αντικατασταθεί στο N-τελικό NBD (NBD1) από τα αμινοξέα κυστεΐνη, ασπαραγίνη και τυροσίνη αντίστοιχα, ενώ η ακολουθία του C-βρόχου στο C-τελικό NBD (NBD2) παρεκκλίνει από τα κανονικά αμινοξέα (LNVEQ αντί LSGGQ).

Προκειμένου να γίνει κατανοητή η σημασία της ανωτέρω παρουσιαζόμενης ασυμμετρίας θα αντικαταστήσουμε τα ακόλουθα αμινοξέα, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης: Η κυστεΐνη 199 θα αντικατασταθεί με λυσίνη (μοτίβο A), η ασπαραγίνη 334 με γλουταμινικό (μοτίβο B), η τυροσίνη 367 με ιστιδίνη (Η-βρόχος), η ασπαραγίνη 1011 με σερίνη (C-βρόχος), η βαλίνη 1012 με γλυκίνη (C-βρόχος) και το γλουταμινικό 1013 με γλυκίνη (C-βρόχος). Αναμένεται ότι οι παραπάνω αμινοξικές αντικαταστάσεις θα μας δώσουν την ευκαιρία να καταλάβουμε καλύτερα τη συμβολή του κάθε NBD στη σύνδεση άλλα και στη δυνατότητα διακίνησης υποστρωμάτων, εκτελώντας δοκιμές αντίστασης φαρμάκων, ATPase μετρήσεις υπό την παρουσία ή έλλειψη τοξικών υποστρωμάτων καθώς και δοκιμές μεταφοράς ροδαμίνης 6G.

ΣΤΟΧΟΙ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

```

                10         20         30         40         50         60
161_410  ----LRKFQRSKETNTFQILKPMDCGLNPGELLVVLRPGRSGTTLKLSISSNTHGFDLG
869_1112  FHWRLNLCYEVQIKAETRRLNNDVGDWVKPGLTALMGASGAGKTLLDCLAERTMVGIVT
Prim.cons.         : : . : : * : * : : * * : : * : : * : : * * * * . : : : : :
                    GXXGXGKST (Walker A)

                70         80         90         100        110        120
161_410  ADTKISYSYGSGDDIKKHFRGEVVYNAAEDVHLPHLTVFETLVTVARLKTQPONRIKGVDR
869_1112  GDILVN--GIPRD---KSFPRSIGYCQQDLHLKTATVRESLRFSAYLRQPAEVSIEE-K
Prim.cons.         . * : : . * . * . * : : * : : * * * * : : * : : * : : : :

                130        140        150        160        170        180
161_410  ESYANHLAEVAMATYGLSHTRNRTKVGNDIVRGSVSGGERKRVSI-AEVSICGSKFQCWDIA
869_1112  ---NRYVEEVIKILEMEKYADAVVG-VAGEGIVNQRKRRLTIGVELTAKPKLLVFLDEP
Prim.cons.         * : . * : : . : : : : * * : : * * : : * * : : * : : * : :
                    (C-Loop) / LSGGQ (Walker B) hhhhDE

                190        200        210        220        230        240
161_410  TRGLDSATALEFIRALKTQADISNTSATVAIQCSQDAYDLFNKVCVLDDG-YQIYYGPA
869_1112  TSGLDSQTAWASICQLMKKLANHG-QAILCTIHQPSAILMQEFDRLLEFMQRGGKTVYFGDL
Prim.cons.         * * * * * * : : : : * : : : : * * * : : * : : : : * : : *

                    H (H-Loop)

                250
161_410  DKAKKYFEDMGYVCPS
869_1112  GEGCKTMIDYFESHGA
Prim.cons.         . : : * : : * : :

```

Εικόνα 9. Αμινοξική αλληλούχιση (alignment) των δύο κασετών ABC του Pdr5 μεταφορέα. Η στοίχιση εκτελέσθηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα *CLUSTALW*. Τα κοινά αμινοξέα παρουσιάζονται με αστρικό (*), και οι συντηρητικές αντικαταστάσεις με τελεία (.). Τα μοτίβα A και B, καθώς επίσης και το μοτίβο του H-βρόχου της ακολουθίας του C-βρόχου είναι χρωματισμένα με κίτρινο.

4. Υλικά

4.1 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

Εξοπλισμός	Εταιρεία Κατασκευής
Αναλυτικός ζυγός	Kern 220-4 Kern 440-47N
Φυγόκεντροι	Centrifuge 5415C Centrifuge 5417R Eppendorf Megafuge 1.0R Heraeus
Βολτόμετρο	LKB EPS 500/400 Pharmacia
Bio-imaging System	Gel Genius2 Syngene
Επωαστήρας <i>E.coli</i>	Function Line Heraeu
Επωαστήρας ζύμης	Bachofer
Nanodrop Σπεκτροφωτόμετρο	PEQLAB ND-1000
Πεχάμετρο	Schott
HT Αναδευτήρας	HT Ecotron/Unitron Infors
ELISA Σαρωτής	FLUOstar OPTIMA BMG Labtech
Συσκευή PCR	Fpersonal Biometra

Πίνακας 2 .Εργαστηριακός Εξοπλισμός

4.2 Βιοχημικά, χημικά προϊόντα και εμπορικά αντιδραστήρια

4.2.1 Διαλύτες

Διαλύτες	Εταιρεία Παρασκευής
Αιθανόλη	Roth
Ισοπροπανόλη	Roth
Μεθανόλη	Roth
Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)	Roth
Διπλά Απεσταγμένο νερό (ddH ₂ O)	Milli-Q50 Plus Anlage, Millipore

Πίνακας 3. Διαλύτες

4.2.2 Ένζυμα

Ένζυμα	Εταιρεία Παρασκευής
ApaI	New England Biolabs
SpeI	New England Biolabs
DpnI	Stratagene
Taq Πολυμεράση	New England Biolabs
PfuUltra HF DNA Πολυμεράση	Stratagene

Πίνακας 4. Ένζυμα

4.2.3 Υλικά για καλλιέργειες και διαλογή

Υλικά για καλλιέργειες και διαλογή	Εταιρεία Παρασκευής
Trypton-Pepton	Roth
Εκχύλισμα ζύμης	Roth
Γλυκόζη	Caesar & Loretz
Άγαρ-Άγαρ	Serva
Θειϊκό αμμώνιο	J.T. Baker
Ουρακίλη	Serva
Αδενίνη	Fluka
L-Ιστιδίνη	Fluka
L-Τρυπτοφάνη	Roth
L-Αργινίνη	Serva
L-Τυροσίνη	Sigma-Alrich
L-Ισολευκίνη	Roth
L-Φαινυλαλανίνη	Merck
L-Βαλίνη	Roth
L-Θρεονίνη	Merck
L-Λευκίνη	Merck
Αμπικιλίνη	Roth
Ισοπρόπυλο-β-θειογαλακτοσίδη (IPTG)	BTS-Biotech

Πίνακας 5. Υλικά για καλλιέργειες και διαλογή

4.2.4 Άλατα και ρυθμιστικά διαλύματα

Άλατα και ρυθμιστικά διαλύματα	Εταιρεία Παρασκευής
NaCl	J.T. Baker
MgCl ₂	Normapur
CaCl ₂	Grüssing
Οξικό Na	Fluka
LiAc	Fluka
EDTA	AppliChem
Tris	Sigma
Πολυαιθυλενογλυκόλη 4000 (PEG-4000)	Fluka
Αγαρόζη	Roth
Βρωμιούχο Αιθίδιο	Roth
Γλυκερόλη 98%	Caesar & Loretz

Πίνακας 6. Άλατα και ρυθμιστικά διαλύματα

4.2.5 Υποστρώματα

Υποστρώματα	Εταιρεία Παρασκευής
Ροδαμίνη 6G	Sigma-Aldrich
Κυκλοεξαμίδιο	Fluka
Φλουκοναζόλη	Fluka
Κετοκοναζόλη	Fluka

Πίνακας 7.Υποστρώματα

4.2.6 Υλικά ηλεκτροφόρησης

Υλικά ηλεκτροφόρησης	Εταιρεία Παρασκευής
1000bp μάρτυρας	Fermentas
6x χρωστική φόρτωσης	Fermentas

Πίνακας 8.Υλικά ηλεκτροφόρησης

4.2.7 Εμπορικά Αντιδραστήρια (Kits)

Εμπορικά Αντιδραστήρια	Εταιρεία Παρασκευής
Κίτ κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης XL	Stratagene
Κίτ καθαρισμού πλασμιδιακού DNA (Midiprep)	NucleoBond®
Κίτ καθαρισμού PCR προϊόντος	QIAquick

Πίνακας 9.Εμπορικά αντιδραστήρια

4.2.8 Ολιγονουκλεοτίδια

4.2.8.1 Εκκινητές για κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

Όνομασία	Μετάλλαξη	Αλληλουχία
c199k_pdr5	C199K (NBD1 Domain; Walker A)	5'cgtttttaggtagaccaggctctggcaaaactactttataaaatccat ctcttc 3' 5'gaagagatggattttaataaagtagttttgccagagcctggtctacc taaaacg 3'
n3334e_pdr5	N334E (NBD1 Domain; Walker B)	5'gatccaaattcaatgctgggatgaagctacaaggggttggttc 3' 5'gaatccaaaccctttagcttcatcccagcattgaaatttggtc 3'
y367h_pdr5	Y367H (NBD1 Domain; H-loop)	5'ctgccacagtggccatccatcaatgttctcaagatg 3' 5'catcttgagaacattgatggatggccactgtggcag 3'
n1011s_pdr5	N1011S (NBD2 Domain; C-loop)	5'ggtgttggtgtgctggtgaagtttatctgtgaacaaagaaaaag attaaccattg 3' 5'caatggtaatcttttctttgttcaacagataaaccttcaccagcaac accaacaac 3'
v1012g_pdr5	V1012G (NBD2 Domain; C-loop)	5'ggtgctggtgaaggtttaaacggtgaacaaagaaaaagattaacc 3' 5'ggtaatcttttctttgttaccggttaaaccttcaccagcaac 3'
e1013g_pdr5	E1013G (NBD2 Domain; C-loop)	5'ggtgctggtgaaggtttaaacggttggtcaaaagaaaaagattaaccat tggtg 3' 5'caccaatggtaatcttttctttgaccaacggttaaaccttcaccagc aac 3'
n1011s;v1012g;e 1013g_pdr5	N1011S;V1012G; E1013G (NBD2 Domain; C-loop)	5'ctgtgttggtgtgctggtgaagttatccggtggacaaagaaaa agattaaccattggt 3' 5'accaatggtaatcttttctttgtccaccggataaaccttcaccagc aacaccaacaacag 3'

Πίνακας 10. Εκκινητές/Ολιγονουκλεοτίδια για τη διαδικασία μεταλλαξιγένεσης

4.2.8.2 Εκκινητές για Colony PCR

Όνομασία	Αλληλουχία
Εκκινητής Pdr5+180-AS	5'GAGCATCACTTTTGTGGGTGCCGATTGAG 3'
Εκκινητής Checkprom	5'TTGGCAACTAGGAACTTTCG3'

Πίνακας 11.Εκκινητές/Ολιγονουκλεοτίδια για Colony PCR

4.2.8.3 Εκκινητές για αλληλούχιση

Όνομασία	Αλληλουχία
RE3	5'GGTGCTTCCGCAGATGTC 3'
RE5	5'GTTGGTAACGACATCGTC 3'
RE13	5'GGTCAATGGTATTCCCCG 3'

Πίνακας 12.Εκκινητές αλληλούχισης

4.3 Μέσα & αντιδραστήρια

4.3.1 Διαλύματα αμινοξέων για Dropout complete Medium

- 100x URA 0.4g L-Ουρακίλη σε 100ml ddH₂O
- 100x HIS 0.6g L-Ιστιδίνη σε 100ml ddH₂O
- 100x LEU 2.6g L-Λευκίνη σε 100ml ddH₂O
- 100x TRP 0.8g L-Τρυπτοφάνη σε 100ml ddH₂O

4.3.2 AS Mix (διαλύματα αμινοξέων)

	mg/L	g/14.5g mix
Αδενίνη	40	0.4
L-Αργινίνη	20	0.2
L-Τυροσίνη	30	0.3
L-Ισολευκίνη	30	0.3
L-Φαινυλαλανίνη	50	0.5
L-Γλουταμινικό οξύ	100	1.0
L-Ασπαρτικό οξύ	100	1.0
L-Θρεονίνη	200	2.0
L-Σερίνη	400	4.0
L-Βαλίνη	150	1.5
L-Μεθειονίνη	150	1.5
L-Λυσίνη	180	1.8

4.3.3 LB μέσο καλλιέργειας (Luria Broth)

- 10 g Tryptone
- 5 g Εκχύλισμα Ζύμης
- 5 g NaCl
- 1000 ml ddH₂O

4.3.4 2×LB μέσο καλλιέργειας

- 20 g Tryptone
- 10 g Εκχύλισμα Ζύμης
- 10 g NaCl
- 1000 ml ddH₂O

4.3.5 YP μέσο καλλιέργειας (Yeast extract Peptone)

- 10 g Εκχύλισμα Ζύμης
- 20 g Peptone
- 900 ml ddH₂O

4.3.6 2×YP μέσο καλλιέργειας

- 20 g Εκχύλισμα Ζύμης
- 40 g Peptone
- 800 ml ddH₂O

4.3.7 2×Dropout complete μέσο καλλιέργειας (pH 5.6)

- 740 ml ddH₂O
- 3.4 gr Bacto YNB
- 2.86 g AS Mix
- 10 g Θεϊκό αμμώνιο

4.3.8 NZY⁺ Broth (pH 7.5)

- 1000ml ddH₂O
- 10g NZ αμίνη (υδρολυσική κασεΐνη)
- 0.5g Εκχύλισμα ζύμης
- 0.5g NaCl
- 12,5 ml MgCl₂ (1 M)
- 12,5 ml MgSO₄ (1M)
- 20,0 ml Γλυκόζη (20% w/v)

4.3.9 20% Γλυκόζη

- 1000ml ddH₂O
- 400g Γλυκόζη

4.3.10 50% Γλυκερόλη

- 500 ml Γλυκερόλη
- 500 ml ddH₂O

4.4 Τρυβλία

4.4.1 LB Τρυβλία

- 250ml αποστειρωμένο 4% άγαρ
- 250ml 2xLB Μέσο καλλιέργειας

4.4.2 LB-amp⁺ Τρυβλία

- 250ml αποστειρωμένο 4% άγαρ
- 250ml 2xLB Μέσο καλλιέργειας
- 500μl αμπικιλίνη (100mg/ml)

4.4.3 LB-amp⁺ Screening Τρυβλία

Επάλλειμα στο LB-amp⁺ τρυβλίο :

- 100 μl of 10 mM IPTG
- 100 μl of 2% X-gal

4.4.4 YPD τρυβλίο (Εκχύλισμα ζύμης Peptone Δεξτρόζης)

- 250ml αποστειρωμένο 4% άγαρ
- 200ml 2xYP Μέσο καλλιέργειας
- 50ml 20% Γλυκόζη

4.4.5 Ζύμης Drop-out –TRP Τρυβλία

- 250ml αποστειρωμένο 4% άγαρ τζελ
- 185ml Drop out Μέσο καλλιέργειας
- 50ml 20% Γλυκόζη
- 5 ml 100x His
- 5 ml 100x LEU
- 5 ml 100x URA

4.4.6 Ζύμης Drop-out –His Τρυβλία

- 250ml αποστειρωμένο 4% Άγαρ τζελ
- 185ml Drop out Μέσο καλλιέργειας
- 50ml 20% Γλυκόζη
- 5 ml 100x TRP
- 5 ml 100x LEU
- 5 ml 100x URA

4.4.7 Τρυβλία άγαρ που περιέχουν τα προς εξέταση τοξικά υποστρώματα

- YPD άγαρ
- Κατάλληλος όγκος από το φάρμακο που ελέγχεται

4.5 Ρυθμιστικά Διαλύματα

4.5.1 LATE

- 1 ml 10x TE
- 1 ml 10x LiAc
- 8 ml ddH₂O

4.5.2 PLATE

- 1 ml 10x TE
- 1 ml 10x LiAc
- 8 ml 50% PEG 4000

4.5.3 10x TE

- 100 mM Tris pH 7,5
- 10 mM EDTA pH 7,5

4.5.4 10x LiAc

- 1 M LiAc pH 7,5

4.5.5 TAE Running Buffer 10X, (pH 8)

- 1000 ml ddH₂O
- Tris-base 48.4 g
- Glacial Acetic Acid 10.9 g
- EDTA (free acid f.w. 292.25) 2.92 g

4.6 Κυτταρικά στελέχη & Πλασμίδια

4.6.1 *E. Coli* Κυτταρικά στελέχη

Τα *E.Coli* κυτταρικά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτή τη μελέτη είναι τα ακόλουθα:

***E. coli* XL10-Gold[®]** TetR Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR) Amy CamR] (Stratagene)

***E. coli* DH5α (XL1-Blue)** F- Φ80lacZ ΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk -, mk +) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ- (Novagen)

4.6.2 Κυτταρικά στελέχη Ζύμης

Τα κύτταρικά στελέχη *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτή τη μελέτη είναι τα εξής:

YHW A5 (ΔPdr5) MATa; ura3-52; trp1-1; leu2-3,112; his3-11,15; ade2-1; pdr1-3; DPdr5::TRP1 (Ernst 2007)

YRE1001 (ΔPP) MATa; ura3-52; trp1-1; leu2-3,112; his3-11,15; ade2-1; pdr1-3; DPdr5prom,DPdr5::TRP1 (Ernst 2007)

4.6.3 Πλασμίδια

Πλασμίδιο	Ονομασία
PRE5	Ernst 2007
PRE5C199K	Παρούσα Εργασία
PRE5N334E	Παρούσα Εργασία
PRE5Y367H	Παρούσα Εργασία
PRE5N1011S	Παρούσα Εργασία
PRE5V1012G	Παρούσα Εργασία
PRE5E1013G	Παρούσα Εργασία
PRE5NVE	Παρούσα Εργασία
PRE5NVEY	Παρούσα Εργασία
PRE5NVEYC	Παρούσα Εργασία
pWhitescript TM	Stratagene

Πίνακας 13. *E. Coli* πλασμίδια

5. Μέθοδοι

Μοριακές & Βιολογικές Μέθοδοι (5.1-5.11)

Βιοχημικές Μέθοδοι (5.12)

5.1 Καλλιέργειες & Συλλογή Κυττάρων

5.1.1 Ανάπτυξη βακτηριακών καλλιιεργειών

Τα βακτηριακά κύτταρα *E. Coli* αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο LB (Luria Broth medium), υπό την επιλογή του αντιβιοτικού αμπικιλίνης ώστε να εξασφαλιστεί η επιβίωση των πλασμιδιακών φορέων. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C υπό διαρκή ανάδευση (200-250 rpm).

Γενικά, η παρουσία αντιβιοτικού οδηγεί σε επιλεκτική πίεση. Κάτι τέτοιο είναι σημαντικό διότι τα κύτταρα τείνουν να χάνουν το πλασμίδιό τους κατά την κυτταροδιαίρεση.

Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει τις συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού αμπικιλίνης που χρησιμοποιήθηκε:

Antibiotic	Stock solution (concentration)	Storage	Working concentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	-20°C	50-100 µg/ml

Πίνακας 14. Συγκεντρώσεις αποθήκευσης και εργασίας για το αντιβιοτικό αμπικιλίνη

5.1.1.1 Προετοιμασία εναρκτήριων βακτηριακών καλλιιεργειών

Εναρκτήριες καλλιέργειες των 3ml ενοφθαλμίστηκαν από μια μόνο αποικία, που επιλέχθηκε από πρόσφατα στρωμένο τριβλίο με άγαρ. Το τριβλίο και οι υγρές καλλιέργειες περιείχαν το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλογής, (αμπικιλίνη), η παρουσία του οποίου εγγυάται την επιβίωση των επιθυμητών πλασμιδιακών φορέων. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C και υπό ~200 rpm για ~8 h.

5.1.1.2 Προετοιμασία μεγάλων καλλιιεργειών *E. Coli* ολονύκτιας επώασης.

Οι καλλιέργειες ολονύκτιας επώασης *E. Coli* ενοφθαλμίστηκαν με διάλυση της αρχικής καλλιέργειας 1/1000 σε 50 ml LB medium, που περιείχε επίσης το αντιβιοτικό επιλογής (αμπικιλίνη). Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C και ~200rpm για 12-16 h.

5.1.1.3 Συλλογή των βακτηριακών κυττάρων

Έπειτα από την ολονύκτια επώαση τα κύτταρα *E. Coli* συλλέχτηκαν μετά από φυγοκέντρηση στις 6,000 x g για 10 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφτηκε εντελώς και το κυτταρικό ίζημα συλλέχθηκε και φυλάχθηκε στους -20°C.

5.1.2 Ανάπτυξη καλλιέργειας ζύμης

Τα διάφορα στελέχη ζύμης αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο YPD στους 30°C και υπό συνεχή ανάδευση (~200 rpm).

5.1.2.1 Προετοιμασία εναρκτήριων καλλιιεργειών ζύμης

Για τις καλλιέργειες ζύμης, μονές αποικίες ζυμομύκητα επιλέχτηκαν από πρόσφατα στρωμένο τριβλίο με στείρο στυλεό και μεταφέρθηκαν σε φιάλη με 3 ml YPD. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν ολονυκτίς στους 30°C και υπό ~200 rpm συνεχή ανάδευση.

5.1.2.2 Προετοιμασία των κύριων καλλιιεργειών ζύμης

Οι κύριες καλλιέργειες ζύμης ετοιμάστηκαν χρησιμοποιώντας 50 ml YPD με διάλυση των των εναρκτήριων καλλιέργειες σε μια αρχική OD₆₀₀ των 0, 2. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν μέχρι και την εκθετική φάση (OD₆₀₀ 0, 8-1, 0).

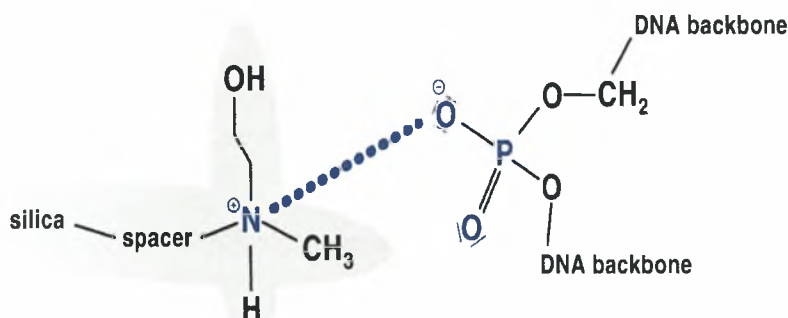
5.1.2.3 Συλλογή των κυττάρων ζύμης

Τα κύτταρα ζύμης συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση στις 3,000 rpm για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε εντελώς και το κυτταρικό ίζημα φυλάχθηκε στους -20°C.

5.2 Καθαρισμός πλασμιδιακού DNA (Midiprep)

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε από βακτηριακές καλλιέργειες με χρήση του *NucleoBond[®] Xtra* κίτ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η *NucleoBond[®] Xtra* στήλη είναι μία πατενταρισμένη ιοντοανταλλακτική ρητίνη με βάση πυριτίου, που αναπτύχθηκε από τους MACHEREY-NAGEL. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό ρουτίνας διαφορετικών τάξεων νουκλεϊκών οξέων όπως ολιγονουκλεοτίδια, RNA και πλασμίδια. Η *NucleoBond[®] Xtra Silica Resin* στήλη αποτελείται από υδρόφιλα, μακροπορώδη σφαιρίδια πυριτίου ενεργοποιημένα με (μεθυλικη-αμινο-αιθανόλη). Η παρουσία αυτών των ομάδων παρέχει μια συνολικά θετική πυκνότητα φόρτισης υπό όξινες συνθήκες, κάτι που επιτρέπει στον αρνητικά φορτισμένο σκελετό του πλασμιδιακού DNA να προσδεθεί με υψηλή ειδικότητα στην στήλη (Εικόνα 10.).



Εικόνα 10. Ιοντική αλληλεπίδραση της θετικά φορτισμένης μεθυλο-υδροξυαιθυλο-αμινο-ομάδας με το αρνητικά φορτισμένο οξυγόνο του σκελετού του DNA.

Κάθε ένα από τα βακτηριακά ιζήματα επαναδιαλύθηκε σε Buffer RES+RNase A (8 ml) και υπέστη λύση από επεξεργασία με sodium hydroxide/SDS (Buffer LYS, 8 ml). Τόσο οι πρωτεΐνες καθώς και το χρωμοσωμικό και πλασμιδιακό DNA αποδιατάχτηκαν υπό αυτές τις συνθήκες. Το RNA υδρολύθηκε από DNase-free RNase A. Το παραπάνω μίγμα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) για 5 min. Έπειτα, προστέθηκαν στα κυτταρολύματα Neutralization Buffer NEU (8 ml), που περιείχε οξικό κάλιο, προκαλώντας κατακρήμνιση του SDS παρασέρνοντας πρωτεΐνες, χρωμοσωμικό DNA και άλλα κυτταρικά υπολείμματα. Το buffer οξικού καλίου επίσης ουδετεροποιεί τα μίγματα των κυτταρολυμάτων. Έπειτα, μετά από την αλκαλική λύση το δείγμα έπρεπε να καθαριστεί από τα κυτταρικά υπολείμματα και να κατακρημνιστεί ώστε να εξασφαλιστεί η υψηλή πλασμιδιακή καθαρότητα και η γρήγορη ροή στη στήλη. Κάτι τέτοιο επιτεύχθηκε περνώντας το διάλυμα μέσα από στήλη διήθησης Buffer εξισορρόπησης EQU NucleoBond® Xtra που εξισορροπήθηκε με 12 ml Buffer εξισορρόπησης. Η υψηλή συγκέντρωση άλατος των διαλυμάτων λύσης δεν επιτρέπει στις πρωτεΐνες και το RNA να κατακρατηθούν στη στήλη NucleoBond® Xtra. Εντούτοις, προκειμένου να απομακρυνθεί κάθε ίχνος επιμόλυνσης η στήλη και το φίλτρο πλύθηκαν με 5 ml Buffer εξισορρόπησης EQU. Αφού απορρίφθηκαν τα φίλτρα, οι στήλες πλύθηκαν με 8 ml Wash Buffer WASH. Ακολούθησε έκλουση υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας και με αύξηση του pH από 6.5 σε 9.0, χρησιμοποιώντας Buffer έκλουσης (ELU, 5 ml). Υπό αυτές τις αλκαλικές συνθήκες το θετικό φορτίο της ιοντο-ανταλλακτικής ρητίνης ουδετεροποιήθηκε και το πλασμιδιακό DNA απελευθερώθηκε. Στο έκπλυμα που συλλέχθηκε προσθέσαμε 3,5 ml ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να κατακρημνιστεί το πλασμιδιακό DNA που εκπλύθηκε. Το DNA φυγοκεντρήθηκε σε 15,000 x g για 30 min στους 4°C. Έπειτα, απορρίφτηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα προστέθηκαν 2 ml αιθανόλης 70% θερμοκρασίας δωματίου (20-25°C). Τέλος, το στεγνό ίζημα του πλασμιδιακού DNA διαλύθηκε σε στείρο υδωρ.

*Τελικά, η πλασμιδιακή ανάκτηση καθορίστηκε με φασματοφωτομετρία υπεριώδους και με ηλεκτροφόρηση σε τζελ αγαρόζης.

5.3 Ηλεκτροφόρηση σε τζέλ αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε τζέλ αγαρόζης είναι ένας εύκολος τρόπος να διαχωριστούν τα θραύσματα του DNA βάσει μεγέθους και να οπτικοποιηθεί άμεσα το αποτέλεσμα διαχωρισμού. Η μέθοδος βασίζεται στην μετακίνηση του αρνητικά φορτισμένου DNA προς την άνοδο ενός ηλεκτρικού πεδίου. Ο ρυθμός της μετακίνησης των θραυσμάτων του DNA μέσω του τζέλ αγαρόζης είναι αντιστρόφως ανάλογος με το δεκαδικό λογάριθμο του συνόλου των ζευγών βάσεων. Πιο συγκεκριμένα τα μόρια φωσφορικού που σχηματίζουν το σκελετό του DNA έχουν υψηλό αρνητικό φορτίο. Όταν το DNA τοποθετείται σε πεδίο με ηλεκτρικό ρεύμα αυτά τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA μετακινούνται προς το θετικό άκρο του πεδίου που στην περίπτωση αυτή είναι τζέλ αγαρόζης μέσα σε κατάλληλο διάλυμα (TAE Running Buffer) (Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis t. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989).

DNA μάρτυρας μήκους 10 kb (Fermentas) χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστεί το μέγεθος θραύσματος DNA. Για την προετοιμασία του τζέλ, αγαρόζη 1% (w/v) διαλύθηκε σε TAE buffer (0.2 M Tris, 5 mM EDTA, όπου το pH προσαρμόστηκε στο 8 με οξικό οξύ). Το τζέλ τοποθετήθηκε σε δοχείο ηλεκτροφόρησης και βυθίστηκε εξολοκλήρου σε TAE buffer. Τα δείγματα DNA αναμίχθηκαν με κατάλληλο όγκο DNA loading buffer και η συσκευή λειτούργησε σε 12V/cm.

Τα θραύσματα του DNA, που διαχωρίστηκαν σε τζέλ αγαρόζης οπτικοποιήθηκαν με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) φθορίζει παρουσία υπεριώδους φωτός (UV). Το αιθίδιο εισέρχεται αυτόματα ανάμεσα στις βάσεις δίκλωνου DNA. Μάλιστα, η υδρόφοβη δομή του δακτυλίου του αιθιδίου μοιάζει με εκείνη των δακτυλίων των βάσεων του DNA. Το αιθίδιο μπορεί να σχηματίσει στενές επαφές Van der Waals με τα ζεύγη βάσεων και για το λόγο αυτό συνδέεται με το υδρόφοβο εσωτερικό των μορίων του DNA. Τα μόρια που συνδέονται με αυτόν τον τρόπο λέγονται παρένθετοι παράγοντες (intercalating agents) διότι εισέρχονται στη συνεχή ακολουθία των βάσεων. Κατά τη σύνδεσή τους τα μόρια αυτά παραμορφώνουν τη διπλή έλικα και εμπλέκονται σε σφάλματα κατά την αντιγραφή και τη μεταγραφή του DNA καθώς και την επιδιόρθωση και τον ανασυνδυασμό. Αυτός είναι ο λόγος που οι παράγοντες αυτοί είναι συχνά ικανά μεταλλαξιγόνα.

5.4 Σχεδιασμός εκκινητών

Οι μεταλλαξιγόνοι εκκινητές σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας το QuikChange[®] Primer Design Program της *Stratagene* που είναι διαθέσιμο στο δικτυακό τόπο <http://www.stratagene.com/qcprimerdesign>.

Κατά το σχεδιασμό μεταλλαξιγόνων εκκινητών πρέπει να έχει λάβει κανείς υπόψη τα εξής:

- ◆ Και οι δύο μεταλλαξιγόνοι εκκινητές πρέπει να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη και να μπορούν να υβριδίζονται στην ίδια αλληλουχία στις συμπληρωματικές αλυσίδες του πλασμιδίου.
- ◆ Οι εκκινητές πρέπει να έχουν μήκος από 25 έως 45 βάσεις και θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) $\geq 78^\circ\text{C}$. Εκκινητές μήκους άνω των 45 βάσεων μπορεί να χρησιμοποιηθούν αλλά η χρήση τους αυξάνει την πιθανότητα σχηματισμού δευτερευουσών δομών, κάτι που μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων μεταλλαξιγένεσης.
- ◆ Ο ακόλουθος τύπος χρησιμοποιείται συχνά για να εκτιμηθεί η T_m των εκκινητών:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% \text{ mismatch}$$

Κατά τον υπολογισμό της T_m :

- N είναι το μήκος του εκκινητή σε αριθμό βάσεων
- οι τιμές %GC και % αναντιστοιχία (mismatch) είναι ακέραιοι αριθμοί.

Για τον υπολογισμό T_m για εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν για να εισάγουν προσθήκες ή ελλείμματα, να χρησιμοποιηθεί η ακόλουθη τροποποιημένη εκδοχή του παραπάνω τύπου:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N$$

Όπου το N δεν περιλαμβάνει τις βάσεις που εισάγονται ή αφαιρούνται.

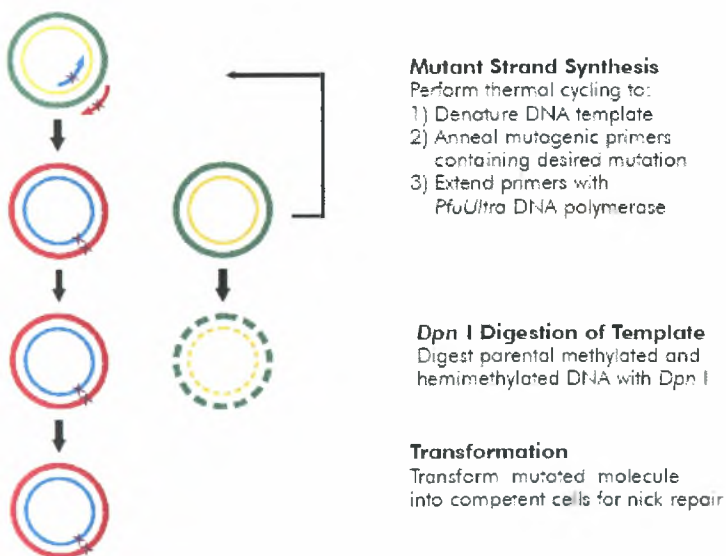
- ◆ Η επιθυμητή μετάλλαξη (προσθήκη, έλλειμμα ή αντικατάσταση) θα πρέπει να γίνει στο μέσο του εκκινητή με ~10–15 άθικτες βάσεις από κάθε πλευρά.
- ◆ Ιδανικά κάθε εκκινητής πρέπει να έχει ελάχιστο περιεχόμενο GC 40% και θα πρέπει να τερματίζει σε μία ή περισσότερες βάσεις C ή G.

5.5 Θέσιο-κατευθυνόμενη μεταλλάξιγένεση

Η *in vitro* τεχνική της θέσιο-κατευθυνόμενης μεταλλάξιγένεσης είναι μια ανεκτίμητη τεχνική για το χαρακτηρισμό των δυναμικών, σύνθετων σχέσεων μεταξύ της πρωτεϊνικής δομής και λειτουργίας, για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης και για τη μελέτη των συστατικών της γονιδιακής έκφρασης, καθώς και για την διεξαγωγή πλασμιδιακών τροποποιήσεων.

5.5.1 Θέσιο-κατευθυνόμενη μεταλλάξιγένεση (η μέθοδος)

Το κίτ της θέσιο-κατευθυνόμενης μεταλλάξιγένεσης (*site-directed mutagenesis kit*) *QuikChange II* χρησιμοποιήθηκε για να δημιουργήσει σημειακές μεταλλάξεις αντικαθιστώντας ορισμένα αμινοξέα. Η μέθοδος εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας την υψηλής πιστότητας DNA πολυμεράση PfuUltra[®], ένα υπερελικωμένο δίκλωνο DNA (dsDNA), και δύο συνθετικούς ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές, που περιείχαν την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, κάθε ένας συμπληρωματικός για την αντίθετη αλυσίδα του πλασμιδίου επιμηκύνθηκαν υπό περιοδική μεταβολή της θερμοκρασίας (*temperature cycling*), υπό την παρουσία της υψηλής πιστότητας DNA πολυμεράση PfuUltra. Έπειτα, μετά από την περιοδική μεταβολή της θερμοκρασίας το προϊόν δέχτηκε επεξεργασία με Dpn I. Η ενδονουκλεάση Dpn I (αλληλουχία στόχος: 5'-Gm6ATC-3') είναι ειδική για το μεθυλιωμένο και ημιμεθυλιωμένο DNA και χρησιμοποιήθηκε για να πέψει το μητρικό DNA και να επιλεγούν έτσι τελικά μόνο τα νεοσύστατα μόρια DNA που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη. Το DNA που απομονώθηκε από όλα σχεδόν τα στελέχη *E. coli* ήταν *dam*-μεθυλιωμένο και ως εκ τούτου ευαίσθητο σε πέψη από Dpn I. Το πλασμίδιο DNA που φέρει τις σημειακές μεταλλάξεις μεταφέρθηκε έπειτα σε κύτταρα XL10-Gold Ultracompetent, με χρήση της μεθόδου του θερμικού σοκ.



Εικόνα 11. Επισκόπηση της μεθόδου της κατευθυνόμενης μεταλλάξιγένεσης

5.5.2 Έλεγχος της μεταλλαξιγένεσης

Το πλασμίδιο ελέγχου pWhitescript™ 4.5-kb χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα των προϊόντων μεταλλαξιγένεσης που παράχθησαν με χρήση του κιτ *QuikChange II site-directed mutagenesis*. Το πλασμίδιο ελέγχου pWhitescript 4.5-kb περιέχει ένα κωδικόνιο τερματισμού (TAA) στη θέση όπου κανονικά θα εμφανιζόταν ένα κωδικόνιο γλουταμίνης (CAA) στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (ανταποκρίνεται στο 9^ο αμινοξύ της πρωτεΐνης). Τα XL1-Blue κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με αυτό το πλασμίδιο ελέγχου εμφανίζονται λευκά σε τριβλία με άγαρ με LB-ampicillin που περιείχαν IPTG και X-gal, διότι η δραστηριότητα της β-γαλακτοσιδάσης έχει “διακοπή”. Οι oligονουκλεοτιδικοί εκκινητές δημιουργούν μια σημειακή μετάλλαξη στο πλασμίδιο ελέγχου pWhitescript 4.5-kb που αντιστρέφει το κατάλοιπο T στο κωδικόνιο στάσης TAA στο 9^ο αμινοξύ του γονιδίου της β-galactosidase σε ένα κατάλοιπο C για να παραχθεί το κωδικόνιο της γλουταμίνης (CAA) όπως στην αλληλουχία άγριου τύπου. Έπειτα από τον μετασχηματισμό, οι αποικίες μπορεί να ελεγχθούν φαινοτυπικά (β-gal⁺) εφόσον εμφανίζουν μπλε χρώση σε μέσο που περιέχει IPTG και X-gal.

5.5.3 Αντίδραση μεταλλαξιγένεσης

Reaction Buffer	5 µl of 10×
Plasmid DNA PRE5	X µl (5–50 ng)
Νοηματικός εκκινητής	X µl (125 ng)
Αντινοηματικός εκκινητής	X µl (125 ng)
dNTPs mix	1.0 µl
DNA Πολυμεράση	1.0 µl
Quick Solution Reagent	3.0 µl
ddH ₂ O	Μέχρι επίτευξης τελικού όγκου 50 µl

Αντίδραση θετικού ελέγχου	
Reaction Buffer	5 μ l of 10 \times
PwhitescripControl Plasmid	2 μ l (10 ng)
Εκκινητής ελέγχου 1	1.25 μ l (125 ng)
Εκκινητής ελέγχου 2	1.25 μ l (125 ng)
dNTPs mix	1.0 μ l
DNA Πολυμεράση	1.0 μ l
Quick Solution Reagent	3.0 μ l
ddH ₂ O	35.5 μ l

Αντίδραση αρνητικού ελέγχου	
Reaction Buffer	5 μ l of 10 \times
Πλασμίδιο ελέγχου Pwhitescrip	0.0 μ l
Εκκινητής ελέγχου 1	1.25 μ l (125 ng)
Εκκινητής ελέγχου 2	1.25 μ l (125 ng)
dNTPs mix	1.0 μ l
DNA πολυμεράση	1.0 μ l
Quick Solution Reagent	3.0 μ l
ddH ₂ O	37.5 μ l

5.5.4 Παράμετροι περιοδικής μεταβολής θερμοκρασίας για τη μέθοδο της θεσιοκατευθυνόμενης μετάλλαξιγένεσης QuikChange II

Θερμοκρασία	Χρόνος
95°C	30 seconds
95°C	30 seconds
55°C	1 minute
68°C	10 minute

} 18 κύκλοι

5.5.5 Πέψη των προϊόντων επέκτασης με Dpn I

Η ενδονουκλεάση Dpn I χρησιμοποιήθηκε, μετά από τη θεσιο-κατευθυνόμενη αντίδραση για να πέψει το μητρικό DNA ώστε να γίνει επιλογή των θυγατρικών μορίων που να περιέχουν τη μετάλλαξη.

Η πέψη των προϊόντων επέκτασης με Dpn I έγινε σε δύο βήματα: Καταρχήν, 1 μl από το ένζυμο περιορισμού Dpn I (10 U/μl) προστέθηκε απευθείας σε κάθε αντίδραση επέκτασης. Έπειτα, κάθε μίγμα αντίδρασης αναδεύτηκε ελαφρά πιπετάροντας πάνω-κάτω αρκετές φορές. Τα μίγματα φυγοκεντρήθηκαν σε μικροφυγόκεντρο για 1 λεπτό και ακολούθησε άμεσα επώαση στους 37°C για 1 h ώστε να γίνει η πέψη του υπερελικωμένου μητρικού μη μεταλλαγμένου dsDNA.

5.5.6 Μετασχηματισμός των πολυδύναμων κυττάρων XL-10.

Ο μετασχηματισμός των πολυδύναμων κυττάρων XL-10 περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

Τα κύτταρα XL10-Gold τοποθετήθηκαν προσεκτικά σε πάγο. Για κάθε αντίδραση ελέγχου και δείγματος χρησιμοποιήθηκε μια ποσότητα 50 μl από τα κύτταρα. Έπειτα 2 μl μίγματος β-μερκαπτοαιθανόλης (β-ME) προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο και οι αντιδράσεις επώαστηκαν για 10 min στον πάγο, αναδεύοντάς τα κάθε 2 min. Έπειτα 1 μl από το DNA που επεξεργαστήκαμε με Dpn I μεταφέρθηκε σε κάθε αντίδραση ελέγχου και δείγματος για να διαχωριστούν τα κύτταρα από το υπόλοιπο μίγμα. Οι αντιδράσεις επώαστηκαν σε πάγο για 30 min. Μετά, τα δείγματα μετασχηματισμού τοποθετήθηκαν για 30 sec στους 42°C (θερμικό σοκ) και έπειτα σε πάγο για 2 min. Στην συνέχεια, προστέθηκε 0.5 ml NZY⁺ broth προθερμασμένου στους 42°C και οι αντιδράσεις μετασχηματισμού επώαστηκαν στους 37°C για 1 h υπό συνεχή ανάδευση στους 200 rpm. Τελικά, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 2.500×g για 5 min και το υπερκείμενο πετάχτηκε. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50 μl LB και τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τριβλία με άγαρ που περιείχαν το κατάλληλο αντιβιοτικό για το πλασμίδιο. Στην περίπτωση μας τα τριβλία περιείχαν αμπικιλίνη.

* Για τον έλεγχο της μεταλλαξιγένεσης και του μετασχηματισμού τα κύτταρα XL1-Blue μετασχηματίστηκαν με το pWhitescript™ 4.5-kb πλασμίδιο και επιστρώθηκαν σε τριβλία με άγαρ και LB-ampicillin που περιείχαν 80 μg/ml X-gal και 20 mM IPTG. Τα XL1-Blue κύτταρα μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο ελέγχου pWhitescript™ χρησιμοποιώντας την ίδια διαδικασία μετασχηματισμού που χρησιμοποιήθηκε για τα XL-10 Ultracompetent κύτταρα.

5.6 Πέψη DNA

Πριν το μετασχηματισμό του στελέχους κλωνοποίησης YRE1001 (ΔPP) έγινε ολονύκτια πέψη του πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιώντας τα περιοριστικά ένζυμα ApaI και SpeI, ώστε να ευθυγραμμιστεί η νεοεισαχθείσα κασέτα του DNA (knock-in DNA cassette). Η πέψη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας εκτός από τα ένζυμα περιορισμού ApaI και SpeI, 1xNE Buffer (20 mM Tris-acetate, 50 mM οξικό κάλιο, 10 mM οξικό μαγνήσιο, 1 mM διθειοθρεϊτόλη, pH 7.9) και BSA buffer από τα *New England Biolabs* σύμφωνα με τα πρωτόκολλα του κατασκευαστή. Το τελικό αποτέλεσμα πέψης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε τζέλ αγαρόζης.

Τα ένζυμα ApaI και SpeI αναγνωρίζουν και «κόβουν» τις ακόλουθες θέσεις περιορισμού:

ApaI Θέση Αναγνώρισης:

SpeI Θέση Αναγνώρισης:



Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει τις συνθήκες αντίδρασης (θερμοκρασία και χρόνος) και τα συστατικά της αντίδρασης:

Αντίδραση:

ApaI (ένζυμο περιορισμού)	1.5 μl
SpeI (ένζυμο περιορισμού)	3.0μl
πλασμιδιακό DNA	10.0 μg
NE Buffer 4	12.0 μl
BSA (1:10 diluted in ddH ₂ O)	12.0 μl
Ολικός όγκος αντίδρασης	120 μl
Χρόνος επώασης	Ολονύκτια
Θερμοκρασία επώασης	25oC

Πίνακας 15. Αντίδραση πέψης

*Για την αντίδραση πέψης ελήφθη υπόψη ο γενικός κανόνας ότι μια μονάδα δράσης ενδονουκλεάσης περιορισμού ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1μg υποστρώματος DNA σε ολικό όγκο αντίδρασης 50 μl μέσα σε μία 1 ώρα.

5.7 Μετασχηματισμός ζύμης

5.7.1 Προετοιμασία των κυττάρων ζύμης για μετασχηματισμό

Η προετοιμασία των ικανών κυττάρων για μετασχηματισμό περιέλαβε τα ακόλουθα βήματα: Μια αποικία ζύμης επώαστηκε σε 5 ml YPD στους 30°C και 180-200 rpm ολονυκτίς. Την επόμενη ημέρα μετρήθηκε η OD (σε $\lambda=600$) και μία κύρια καλλιέργεια 50 ml με αρχική OD₆₀₀ 0, 2 προετοιμάστηκε. Κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης (OD₆₀₀ 0, 8-1, 0) τα κύτταρα συγκομίστηκαν με φυγοκέντρηση 5 λεπτών, σε 3.000 περιστροφές/λεπτό, και 4°C. Κατόπιν, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και τα κύτταρα πλύθηκαν με 20 ml αποστειρωμένου νερού. Έπειτα, τα κύτταρα υποβλήθηκαν ξανά σε φυγοκέντρηση σε 3.000 περιστροφές/λεπτό, 4°C για 5 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Μετά από αυτό, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml LATE και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε 5 erendorf caps. Τέλος, ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 2.500 περιστροφές/λεπτό, 4°C για 5 λεπτά και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50 μ l LATE και τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν στους 4°C.

5.7.2 Μετασχηματισμός κυττάρων ζύμης με χρήση θερμικού σοκ

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός αποτελεί ένα χρήσιμο γενετικό εργαλείο στη μοριακή γενετική. Αυτό το εργαλείο μας παρέχει την ευκαιρία να διευκρινίσουμε την λειτουργία των πρωτεϊνών μετά από τροποποίηση ή την αντικατάσταση των γονιδίων που τις κωδικοποιούν. Γενικά, το DNA που μας ενδιαφέρει εισάγεται στα κύτταρα και ομόλογος ανασυνδυασμός πραγματοποιείται μεταξύ των αμφίπλευρων περιοχών ομολογίας.

Στην περίπτωση μας, η κλωνοποίηση της “knock-in” κασέτας στο γονιδίωμα της ζύμης, μέσω του ομόλογου ανασυνδυασμού, εκτελέστηκε ακολουθώντας τα επόμενα βήματα: Στην αρχή, 50 μ l των ικανών κυττάρων για μετασχηματισμό προστέθηκαν σε 10 μ g DNA. Κατόπιν, μετά από την προσθήκη 300 μ l διαλύματος PLATE το μίγμα επώαστηκε για 20 λεπτά στους 30°C. Μετά από αυτό, οι αντιδράσεις μετασχηματισμού τοποθετήθηκαν στους 42°C για 20 λεπτά (heat shock), όπου αναδεύονταν με αναστοπή κάθε 5 λεπτά. Έπειτα από το θερμικό σοκ, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά σε 2.500 \times g και θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύθηκε προσεκτικά σε 1 ml YPD και τα κύτταρα ζύμης επώαστηκαν 30°C για 2 ώρες και 180 περιστροφές/λεπτό. Στο τέλος, το μίγμα υποβλήθηκε σε φυγοκέντρωση για 10 sec στη υψηλή ταχύτητα και το υπερκείμενο νερό απορρίφθηκε. Το κυτταρικό ίζημα επαναρτήθηκε και τα κύτταρα επώαστηκαν για τουλάχιστον 2 ημέρες 30°C στο σκοτάδι σε Drop Out -His τριβλία.

5.8 Colony PCR

Η μέθοδος Colony PCR χρησιμοποιήθηκε για να εξετάσθει η παρουσία των ακολουθιών στόχων στα κύτταρα ζύμης. Συγκεκριμένα, μετά από τη διαδικασία μετασηματισμού των κυττάρων ζύμης η παρουσία της κλωνοποιημένης “knock-in” κασέτας στα κύτταρα ζύμης επιβεβαιώθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Colony PCR.

Για πραγματοποίηση της Colony PCR μεθόδου τυχαίες αποικίες επιλέχτηκαν και μεταφέρθηκαν σε PCR-tubes με στυλέο. Ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων στα μικροκύματα, για 2, 5 λεπτά και στην συνέχεια τα PCR-tubes μεταφέρθηκαν άμεσα στον πάγο.

5.8.1 Colony PCR –Η αντίδραση

Εκκινητής Checkprom (1:10)	1.0 μl
Εκκινητής Pdr5+180-AS (1:10)	1.0 μl
dNTPs mix (2 mM)	4.0 μl
10xTaq-Buffer+(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 μl
MgCl ₂	3.0 μl
Taq-DNA Πολυμεράση	1.0 μl
dH ₂ O	17.0 μl

Σ=50 μl

5.8.2 Παράμετροι περιοδικής μεταβολής θερμοκρασίας για τη μέθοδο της Colony PCR

Θερμοκρασία	Χρόνος	
94°C	2 minute	} 30 κύκλοι
94°C	1 minute	
50°C	1 minute	
72°C	1 min & 30 seconds	
72°C	10 minute	

5.9 Καθαρισμός των Colony PCR προϊόντων

Ο καθαρισμός των Colony PCR προϊόντων εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας το *QIAquick PCR Purification kit*. Η πυρίτιο-βασισμένη μεμβράνη καθαρισμού προϊόντων PCR >100 βάσεων περιλαμβάνει τη σύνδεση του DNA στη μεμβράνη, την πλύση για να αφαιρεθούν οι μολυσματικοί παράγοντες, και την έκλουση του προσροφημένου στο πυρίτιο DNA με νερό ελεύθερο από νουκλεάσες. Το δείγμα και τα αντιδραστήρια οδηγήθηκαν μέσω της μεμβράνης με χρήση φυοκέντρησης. Ένας προαιρετικός δείκτης pH επέτρεψε τον εύκολο προσδιορισμό του βέλτιστου pH για το DNA που δεσμεύεται στη στήλη πυριτίου. Γενικά, μετά τον PCR καθαρισμό τα ανακτόμενα τμήματα DNA είναι έτοιμα για αλληλούχηση, για ανάλυση σε μικροσυστοιχίες, σύνδεση (ligation), μετασχηματισμό, πέψη με χρήση ενζύμων περιορισμού, για microinjection, PCR, και για in vitro μεταγραφή. Στην περιπτώσή μας, τα καθαρισμένα Colony PCR προϊόντα εστάλησαν για την αλληλούχηση για να ελεγχθούν για την παρουσία της ενδιαφερόμενης “knock-in” κασέτας στο γονιδίωμα της ζύμης μετά από το μετασχηματισμό.

5.10 DNA Αλληλούχιση (Sequencing)

Η αλληλούχιση DNA αποτελεί μια σημαντική τεχνική στη μοριακή βιολογία, που επιτρέπει την ανάλυση των γονιδίων σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Στην περίπτωση μας, η μέθοδος αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκε για να προσδιοριστεί και να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των επιθυμητών σημειακών μεταλλαγών μετά από την κατευθυνμένη μεταλλαξιγένεση. Επιπλέον, τα προϊόντα που προέκυψαν από την Colony PCR αλληλουχίστηκαν για να επιβεβαιωθεί η παρουσία της “knock-in” κασέτας στο γονιδίωμα ζύμης, μετά από το μετασχηματισμό αυτής. Μόνο, οι σωστά αλληλουχιμένοι κλώνοι χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω πειράματική διαδικασία.

Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία της C199K μεταλλαγής χρησιμοποιήθηκε ο RE3 εκκινητής. Ο RE5 εκκινητής χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι σημειακές μεταλλαγές N334E και Y367H. Οι μεταλλαγές στον C-βρόγχο (N1001S, V1012G και E1013G) προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας τον RE13 εκκινητή. Τέλος, τα προϊόντα από την Colony PCR που περιλαμβάνουν ένα μέρος της “knock-in” κασέτας (τον υποκινητή του PDR5 γονιδίου, την ετικέτα των 14 ιστιδινών και την έναρξη του PDR5 γονιδίου) αλληλουχίστηκαν επίσης με χρήση του εκκινητή Checkprom.

*Η αλληλούχιση των ενδιαφερόμενων τμημάτων DNA εκτελέστηκε από το biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) κέντρο. (<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/mambo/>)

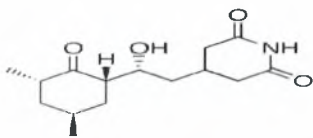
5.11 Αποθήκευση βακτηριακών στελεχών & στελεχών ζύμης

Σε 350 μl, από ολονύκτιες καλλιέργειες, των μετασχηματισμένων *E. Coli* στελεχών και στελεχών ζύμης προστέθησαν 150 μl αποστειρωμένης γλυκερίνης 50%. Το μίγμα μεταφέρθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο και αποθηκεύτηκε στους -80 °C.

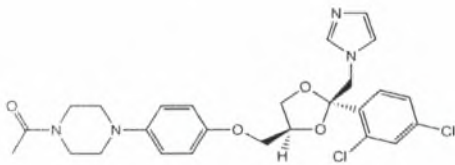
5.12 Δοκιμές αντίστασης φαρμάκων (βιοχημική μέθοδος)

Προκειμένου να εξεταστεί η ευαισθησία των κυττάρων ζύμης, που φέρουν τις διάφορες Pdr5 μεταλλαγές, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων φαρμάκων εκτελέστηκαν δοκιμές αντίστασης. Οι δοκιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν είτε σε άγαρ είτε σε υγρές καλλιέργειες, χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις κυκλοεξιμιδίου (CHX), κετοконаζόλης (KA), φλουκοναζόλης (FLUC) και ροδαμίνης 6G (R6G).

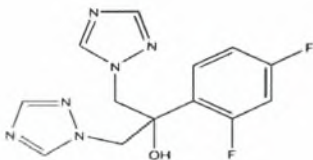
Το κυκλοεξιμίδιο είναι ένας αποτελεσματικός ανασταλτικός παράγοντας της πρωτεϊνικής βιοσύνθεσης στους ευκαριωτικούς οργανισμούς, που εμποδίζει τη μεταφραστική επιμήκυνση (Abou *et al.*, 1997). Αφ' ετέρου, η κετοконаζόλη και η φλουκοναζόλη εμποδίζουν την δράση του ενζύμου cytochrome P450 14- α -demethylase (P45014DM). Αυτό το ένζυμο συμμετέχει στη βιοσύνθεση στερόλης που οδηγεί στην μετατροπή της λανοστερόλης σε εργοστερόλη (Lyman *et al.*, 1992 Marriott *et al.*, 1987 Odds *et al.*, 1986). Η εργοστερόλη αποτελεί συστατικό της μεμβράνης κυττάρων. Τέλος, η ροδαμίνη 6G είναι μια χρωστική ουσία φθορισμού που παρουσιάζει επίσης αντιμυκητιασικές ιδιότητες (Shigefumi *et al.*, 1999).



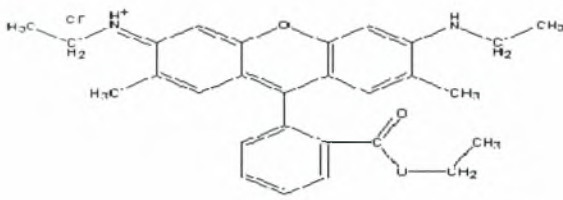
Δομή Κυκλοεξιμιδίου



Δομή Κετοκοναζόλης



Δομή Φλουκοναζόλης



Δομή Ροδαμίνης 6G

Εικόνα 12. Δομές των μορίων κυκλοεξιμιδίου, κετοκοναζόλης, φλουκοναζόλης και ροδαμίνης 6G.

5.12.1 Δοκιμές αντίστασης σε τριβλία με άγαρ

Τα τριβλία με αγάρ, που περιέχουν διάφορες συγκεντρώσεις των δοκιμαζόμενων φαρμάκων, προετοιμάστηκαν με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας των δοκιμαζόμενων υποστρωμάτων σε 50 ml αγάρ YPD εξισορροπημένο στους 50°C. Κατόπιν, 25 ml του μίγματος επιστρώθηκαν σε κάθε τριβλίο Petri.

Τα διάφορα στελέχη ζύμης επώαστηκαν μέχρι την εκθετική φάση (OD_{600} περίπου 0.8-1.0) σε υγρό μέσο YPD. Η ευαισθησία των κυτταρικών στελεχών εξετάστηκε με την επίστρωση 5 ml των κυττάρων πάνω σε τριβλία αγάρ, που περιείχαν την κατάλληλη συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης τοξικής ουσίας, αφού πρώτα αραιώθηκαν σε μία τελική OD_{600} 0.02 με χρήση YPD. Η αντίσταση στα δοκιμαζόμενα φάρμακα των διάφορων στελεχών ζύμης συγκρίθηκε με την ευαισθησία των κυττάρων ζύμης αγρίου τύπου (θετικός έλεγχος) και με την αντίσταση που εμφανίζεται τα YHW A5 κύτταρα (αρνητικός έλεγχος). Η κυτταρική αύξηση ελέγχθηκε μετά από επώαση των πιάτων καλλιέργειας για περίπου 48 ώρες 30°C στο σκοτάδι.

Τα στελέχη ζύμης, που φέρουν παραλλαγές του Pdr5 μεταφορέα, εξετάστηκαν για την αντίσταση που παρουσιάζουν σε τριβλία άγαρ παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων κετοκοναζόλης (KA), κυκλοεξιμιδίου (CHX) και ροδαμίνης 6G (R6G).

Δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις κυκλοεξιμιδίου
: 0 ng/ml, 25 ngr/ml, 50 ngr/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml.

Δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις φλουκοναζόλης
: 0 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 800 ng/ml, 1000 ng/ml.

Δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις ροδαμίνης 6G:
0 μg/ml, 20 μg/ml, 40 μg/ml, 50 μg/ml, 60 μg/ml.

5.12.2 Δοκιμές αντίστασης σε υγρές καλλιέργειες

Οι δοκιμές φαρμάκων σε υγρές καλλιέργειες εκτελέσθηκαν χρησιμοποιώντας 96 καλά αποστειρωμένα μικρο-τριβλία. Αρχικά, μία αποικία ζύμης μεταφέρθηκε με χρήση σπιλεού σε θρεπτικό μέσο YPD και επώαστηκε μέχρι την εκθετική φάση ανάπτυξης OD₆₀₀ 0,8-1.0. Εν συνεχεία, το κυτταρικό διάλυμα αραιώθηκε με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας YPD σε τελική OD₆₀₀ 0.25. Έπειτα, τα κύτταρα εμβολιάστηκαν σε YPD υγρό θρεπτικό μέσο, όπου πραγματοποιήθηκαν τμηματικές αραιώσεις των εξεταζόμενων κυτταροτοξικών φαρμάκων. Συγκεκριμένα, κάθε μικρο-τριβλίο φορτώθηκε με 180 µl μέσο καλλιέργειας YPD, 20 µl των διάφορων συγκεντρώσεων φαρμάκων και εμβολιάστηκε με 50 µl των προς μελέτη κυττάρων (OD₆₀₀ 0.25). Η δυνατότητα αύξησης των κυττάρων εξετάστηκε χρησιμοποιώντας τα τοξικά υποστρώματα κυκλοεξιμίδιο, κετοκοναζόλη, φλουκοναζόλη και ροδαμίνη 6G. Τα προαναφερθέντα φάρμακα, πριν από την προσθήκη τους στα αποστειρωμένα τριβλία, αραιώθηκαν διαδοχικά σε αποστειρωμένο νερό. Τα κύτταρα επώαστηκαν στο σκοτάδι για περίπου 40 ώρες στους 30°C και η OD₆₀₀ κάθε υγρής καλλιέργειας ζύμης καθορίστηκε χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης ELISA.

Τα στελέχη ζύμης εξετάστηκαν για τη δυνατότητα αντίστασής τους σε ξενοβιοτικές ενώσεις σε υγρές καλλιέργειες παρουσία των ακόλουθων συγκεντρώσεων κετοκοναζόλης (KA), κυκλοεξιμιδίου (CHX), ροδαμίνης 6G (R6G) και φλουκοναζόλης (FLUC):

Δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις κυκλοεξιμιδίου :

2,500 µg/ml, 1,660 µg/ml, 1,120 µg/ml, 0,740 µg/ml, 0,494 µg/ml, 0,330 µg/ml, 0,219 µg/ml, 0,146 µg/ml, 0,072 µg/ml, 0,049 µg/ml, 0,032 µg/ml, 0,0 µg/ml

Δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις κετοκοναζόλης:

6,400 µg/ml, 3,200 µg/ml, 1,600 µg/ml, 0,800 µg/ml, 0,400 µg/ml, 0,200 µg/ml, 0,100 µg/ml, 0,052 µg/ml, 0, 025 µg/ml, 0,013 µg/ml, 0,006 µg/ml, 0,000 µg/ml

Δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις ροδαμίνης 6G:

50,000 µg/ml, 25,00 µg/ml, 12,500 µg/ml, 6,250 µg/ml, 3,120 µg/ml, 1,560 µg/ml, 0,780 µg/ml, 0,390 µg/ml, 0,195 µg/ml, 0,098 µg/ml, 00,049 µg/ml, 0,000 µg/ml

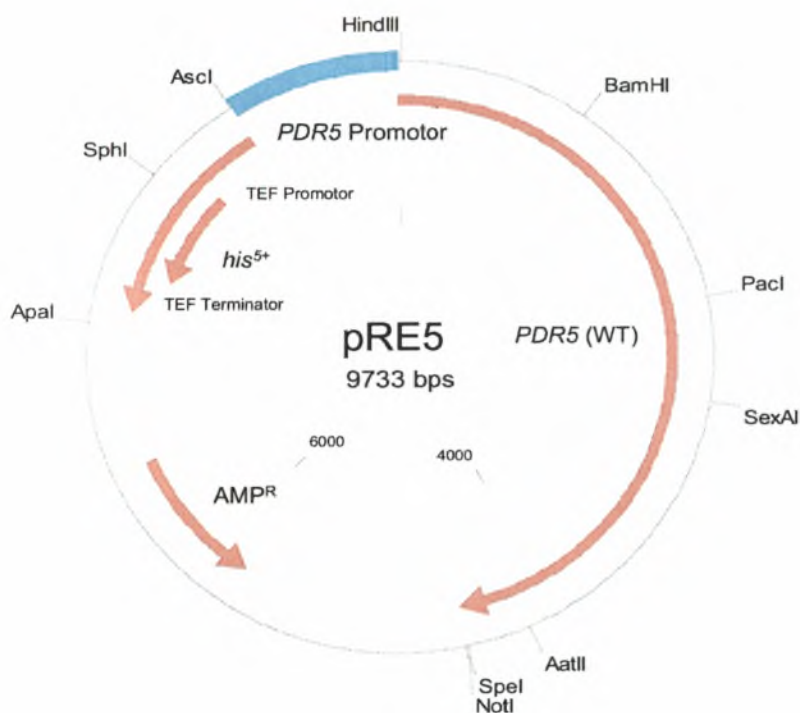
Δοκιμαζόμενες συγκεντρώσεις φλουκοναζόλης:

99,960 µg/ml, 49,980 µg/ml, 24,990 µg/ml, 12,495 µg/ml, 6,247 µg/ml, 3,124 µg/ml, 1,562 µg/ml, 0,781 µg/ml, 0,390 µg/ml, 0,195 µg/ml, 0,098 µg/ml, 0,000 µg/ml

*Τα προς μελέτη τοξικά υποστρώματα κυκλοεξιμιδίου, κετοκοναζόλης και φλουκοναζόλης διαλύθηκαν σε DMSO (dimethylsulfoide), ενώ η ροδαμίνη 6G σε αποστειρωμένο νερό.

6. Αποτελέσματα

Το pRE5 πλασμίδιο (Εικόνα 13.) χρησίμευσε ως το εκμαγείο για την περιοχολαμβανόμενη μεταλλαξιγένεση του PDR5 γονιδίου. Το pRE5 πλασμίδιο αποτελείται από το PDR5 γονίδιο, που οδηγείται από τον PDR5 υποκινητή και από τους δείκτες της επιλογής his^{5+} και AMP^R . Ο δείκτης AMP^R μας επέτρεψε να επιλέξουμε τα επιθυμητά κύτταρα *E.Coli* μετά από το μετασχηματισμό και την επίστρωση αυτών σε τριβλία με μέσο επιλογής ampicillin⁺-LB. Επιπρόσθετα, ο δείκτης his^{5+} μας παρείχε επιλεκτικότητα μετά από το μετασχηματισμό του στελέχους ζύμης YRE1001. Κατόπιν, η εισαγωγή της νουκλεοτιδικής ακολουθείας που κωδικοποιεί μία μετακινούμενη N-τελική ετικέτα 14 ιστιδινών (N-terminal 14-histidine tag) μπροστά από το PDR5 γονίδιο μας δίνει την ευκαιρία να ανακτήσουμε μελλοντικά καθαρή την προς μελέτη πρωτεΐνη χρησιμοποιώντας χρωματογραφία συγγένειας Ni^{2+} .



Εικόνα 13. Το pRE5 πλασμίδιο

6.1.1 Προϊόντα της θεσιο-κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης

Οι νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στο γονίδιο PDR5 αγρίου-τύπου παρήχθησαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (site directed mutagenesis). Η διαδικασία μεταλλαξιγένεσης εκτελέστηκε έχοντας ως εκμαγείο το pRE5 πλασμιδιακό DNA και χρησιμοποιώντας τους μεταλλαξιγόνους εκκινητές του πίνακα 10. Συγκεκριμένα, η κυστεΐνη 199 αντικαταστάθηκε με λυσίνη (Walker A), η ασπαραγίνη 334 με γλουταμινικό (Walker B), η τυροσίνη 367 με ιστιδίνη (H-βρόχος), η ασπαραγίνη 1011 με το σερίνη (C-βρόχος), η βαλίνη 1012 με το γλυκίνη (C-βρόχος) και το γλουταμινικό 1013 με γλυκίνη (C-βρόχος). Κατόπιν, τα XL-10 Ultracompetent *E. Coli* κύτταρα μετασχηματίστηκαν με τα προϊόντα της μεταλλαξιγένεσης. Τα μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα αυξήθηκαν σε LB θρεπτικό μέσο και το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το εμπορικό κίτ *NucleoBond*[®]. Όλα τα πλασμίδια εστάλησαν για αλληλούχιση προκειμένου να πιστοποιηθεί η ύπαρξη των ενδιαφερόμενων μεταλλαγών. Τέλος, η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων αгарόζης χρησιμοποιήθηκε για να οπτικοποιηθούν τα προϊόντα της μεταλλαξιγένεσης. Ο προσδιορισμός του μεγέθους του ηλεκτροφορηθέντος DNA εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας DNA μάρτυρα μοριακού βάρους 10 Kb και η οπτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Το pRE5 πλασμίδιο έχει ένα μέγεθος 9.733 BPS, επομένως οι ευδιάκριτες ζώνες μήκους περίπου 10 KB απεικονίζονται στα πηκτώματα αгарόζης 1%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 14).

A.



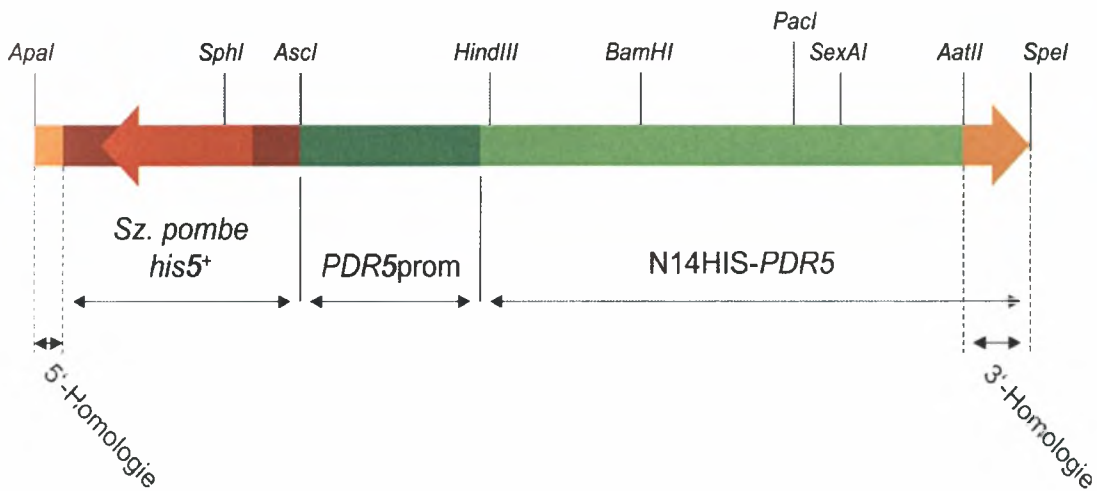
B.



Εικόνα 14. Οπτικοποίηση των προϊόντων μεταλλαξιγένεσης σε ηλεκτροφορικό πήκτωμα αгарόζης. Στην **εικόνα 14, Α.** παρουσιάζεται το DNA μήκους περίπου 10 Kb των C199K, N334E, Y367H, N1011S, V1012G και E1013G πλασμιδίων, ενώ στην **εικόνα 14, Β.** απεικονίζεται το DNA μήκους περίπου 10 Kb των πλασμιδίων N1011S-V1012G-E1013G (n-v-e), N1011S-V1012G-E1013G-Y367H (n-v-e-y) και N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K (n-v-e-y-c).

6.2 Κλωνοποιώντας την “knock-in” κασέτα

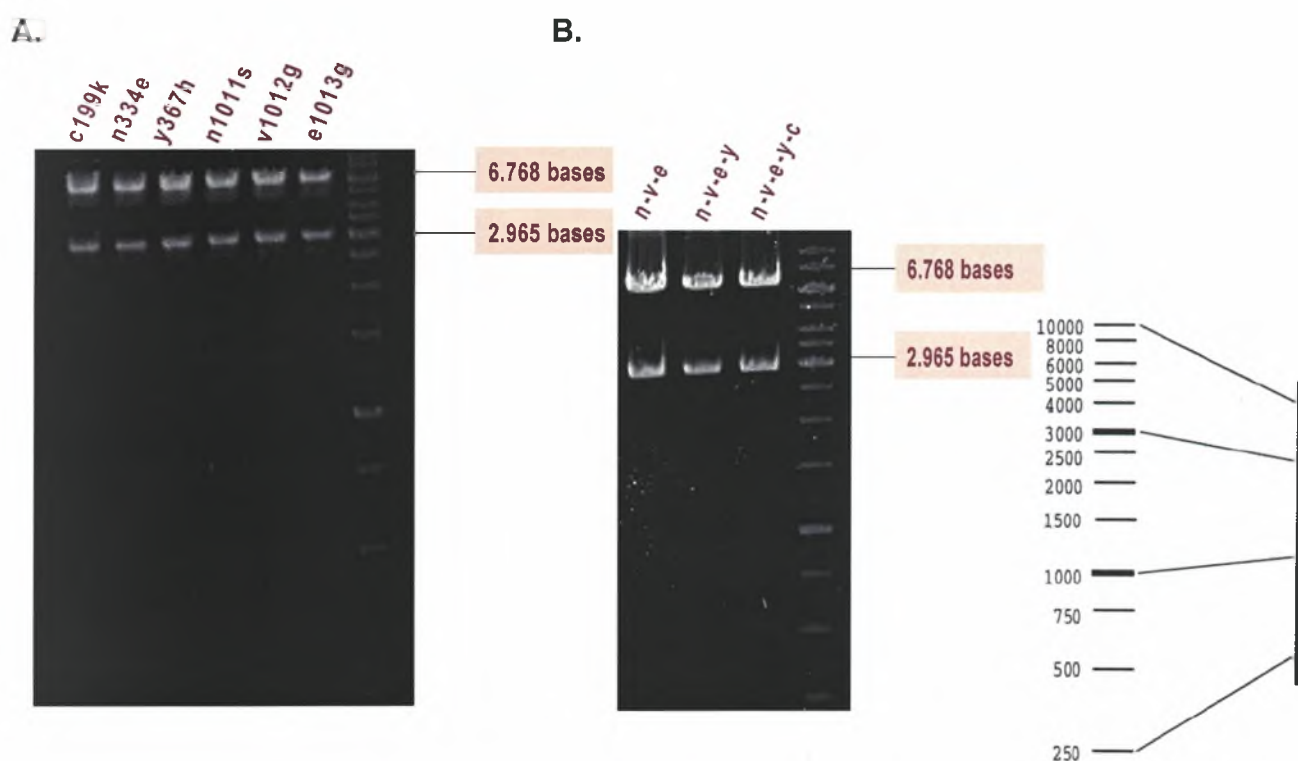
Η “knock-in” κασέτα, που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των κυττάρων YRE101, περιλαμβάνει το PDR5 γονίδιο και υποκινητή, την N-τελική ετικέτα 14 ιστοιδινών (N-terminal 14-histidine tag) και το δείκτη θετικής επιλογής his^{5+} (Εικόνα 15). Αυτή η κασέτα αντικατέστησε, μέσω ομόλογου επανασυνδυασμού, το γονίδιο επιλογής που κωδικοποιεί το αμινοξύ τρυπτοφάνη και τον υποκινητή αυτού, τα οποία έχουν εισαχθεί στην θέση του PDR5 γονιδίου και του υποκινητή αυτού στα στελέχη ζύμης YRE1001 (ΔPP).



Εικόνα 15. Η “knock-in” κασέτα κλωνοποίησης.

6. 2.1 Προϊόντα πέψης

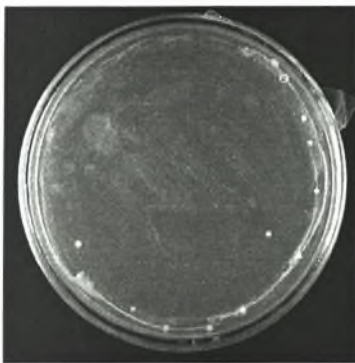
Πριν από το μετασχηματισμό των κυττάρων ζύμης YRE1001 (ΔPP) η “knock-in” κασέτα «κόπηκε» ολονύκτια με χρήση των ενζύμων περιορισμού *ApaI* και *SpeI*. Τα δύο τεμάχια DNA που προέκυψαν είχαν μέγεθος 6.768 και 2.965 βάσεις αντίστοιχα. Κατόπιν, τα προϊόντα της ενζυμικής πέψης οπτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ενώ ο προσδιορισμός του μεγέθους των τεμαχίων DNA έγινε με τη χρήση ενός μοριακού μάρτυρα DNA μεγέθους 10 Kb (Εικόνα 16.).



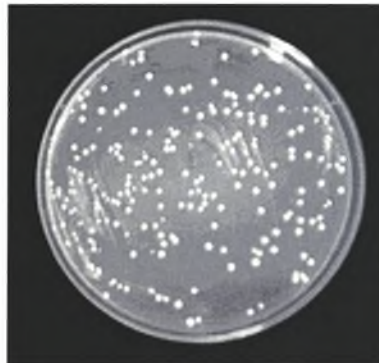
Εικόνα 16. Οπτικοποίηση των προϊόντων πέψης που σε πήκτωμάτων αγαρόζης. Η εικόνα 16, A. Παρουσιάζει τα θραύσματα DNA μετά από την πέψη με *ApaI* και *SpeI* των C199K, το N334E, Y367H, N1011S, V1012G και E1013G πλασμιδίων, ενώ η εικόνα 16, B. παρουσιάζει το αφομοιωμένο DNA των πλασμιδίων N1011S-V1012G-E1013G (n-v-e), N1011S-V1012G-E1013G-Y367H (n-v-e-y) και N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K (n-v-e-y-c).

6.3 Μεταλλάγματα ζύμης

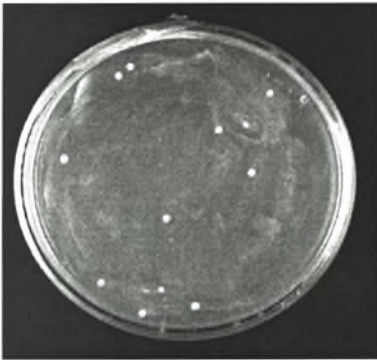
Τα ακόλουθα τριβλία παρουσιάζουν τις αποικίες ζύμης που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας τη διαδικασία μετασχηματισμού ζύμης (Εικόνα 17.). Τα κύτταρα επιστρώθηκαν, μετά από το θερμικό σοκ, σε –His Drop Out τριβλία επιλογής και επωάστηκαν για 3 ημέρες στους 30°C, απουσία φωτός. Κατόπιν, τυχαία επιλεγμένες αποικίες ζύμης μεταφέρθηκαν σε νέα –His Drop Out τριβλία και μετά από δύο ημέρες εκτελέστηκε Colony PCR για να εξετασθεί η παρουσία της “knock-in” κασέτας στο γονιδίωμα της ζύμης.



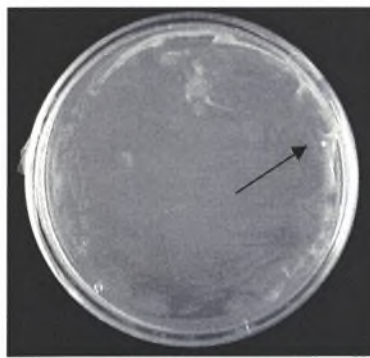
C199K plate



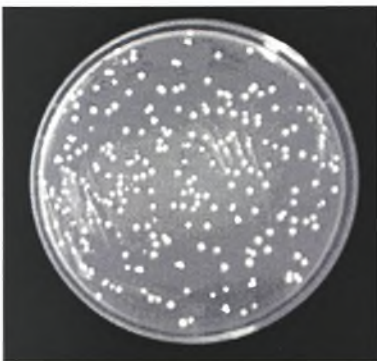
N334E plate



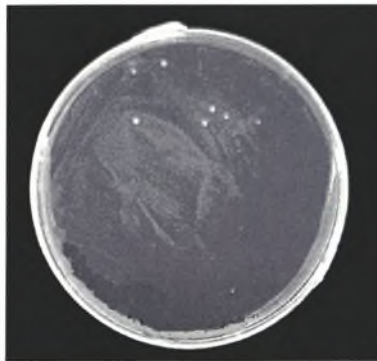
Y367H plate



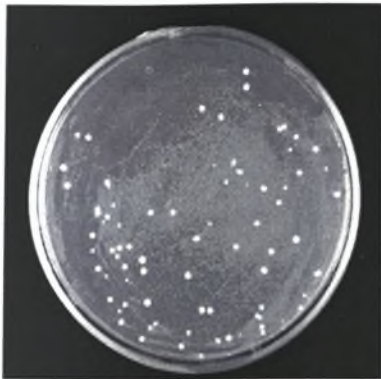
N1011S plate



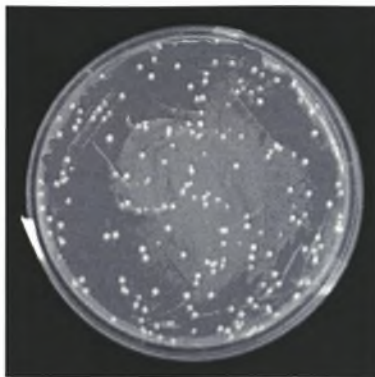
V1012G plate



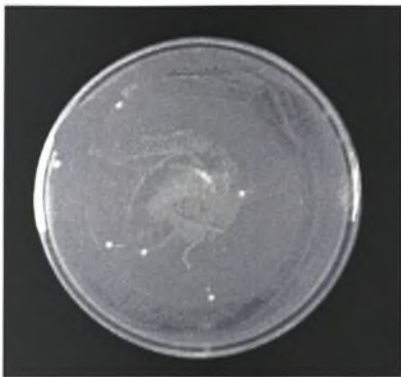
E1013G plate



**N1011S-V1012G-E1013G
plate**



**N1011S-V1012G-E1012G
-Y367H plate**

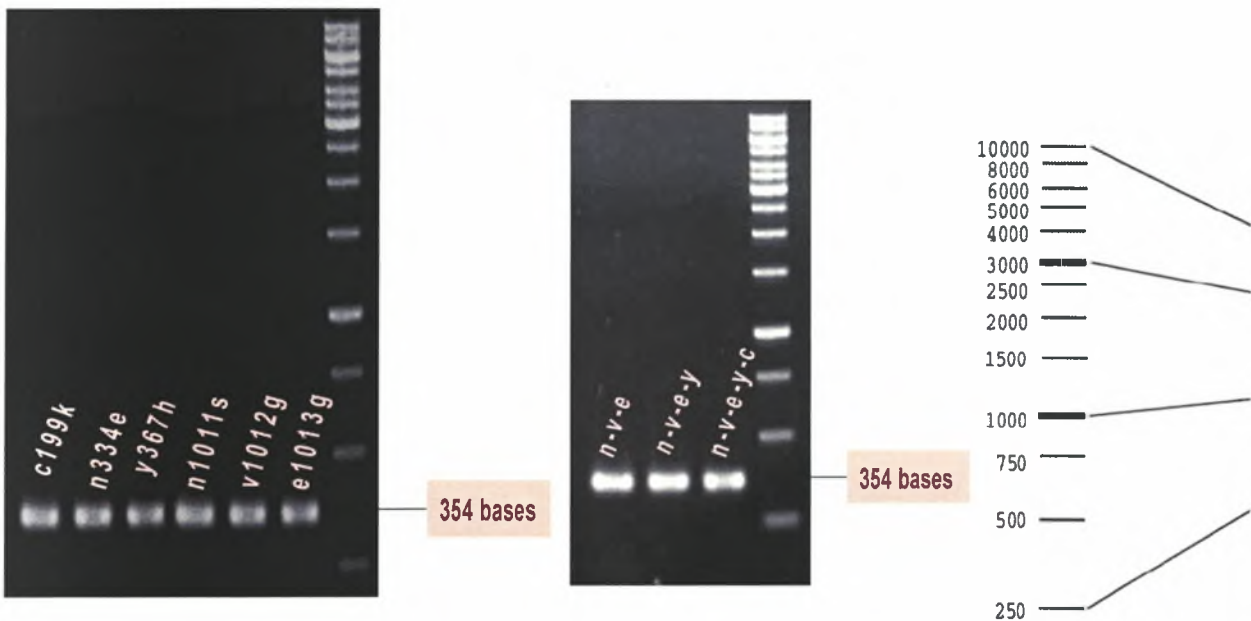


**N1011S-V1012G-E1013G
-Y367H-C199K plate**

Εικόνα 17. Μεταλλάγματα ζύμης. Τα τριβλία ονομάζονται με τις αντικαταστάσεις αμινοξέος που φέρει κάθε φορά το εισαγόμενο PDR5 γονίδιο.

6.4 Colony PCR-προϊόντα

Η παρουσία της “knock-in” κασέτας στο γενωμικό υλικό της ζύμης, μετά από το μετασχηματισμό αυτής, ελέγχθηκε εκτελώντας Colony PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές *Checkprom* και *pdr5+180-AS*. Τα προϊόντα είχαν μέγεθος 354 βάσεων και οπτικοποιήθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. [Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 18.)]. Κατόπιν, τα ενισχυμένα προϊόντα καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το *QIAquick PCR Purification Kit* και στάλτηκαν για την αλληλούχηση.



Εικόνα 18. Οπτικοποίηση των προϊόντων της Colony PCR. Η εικόνα 18, Α, παρουσιάζει τα 354 bp Colony PCR C199K, N334E, Y367H, N1011S, V1012G και E1013G προϊόντα, ενώ η εικόνα 18, Β, δείχνει τα N1011S-V1012G-E1013G (n-v-e), N1011S-V1012G-E1013G-Y367H (n-v-e-y) και N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K (n-v-e-y-c) Colony PCR οπτικοποιημένα προϊόντα.

6.5 Οι Pdr5 μεταλλαγές διαμορφώνουν διαφορετικά πρότυπα αντίστασης

Προκειμένου να εξεταστεί η ευαισθησία των κυττάρων που φέρουν τις Pdr5 μεταλλάξεις εκτελέστηκαν δοκιμές αντίστασης φαρμάκων είτε σε τριβλία με άγαρ είτε σε υγρές καλλιέργειες.

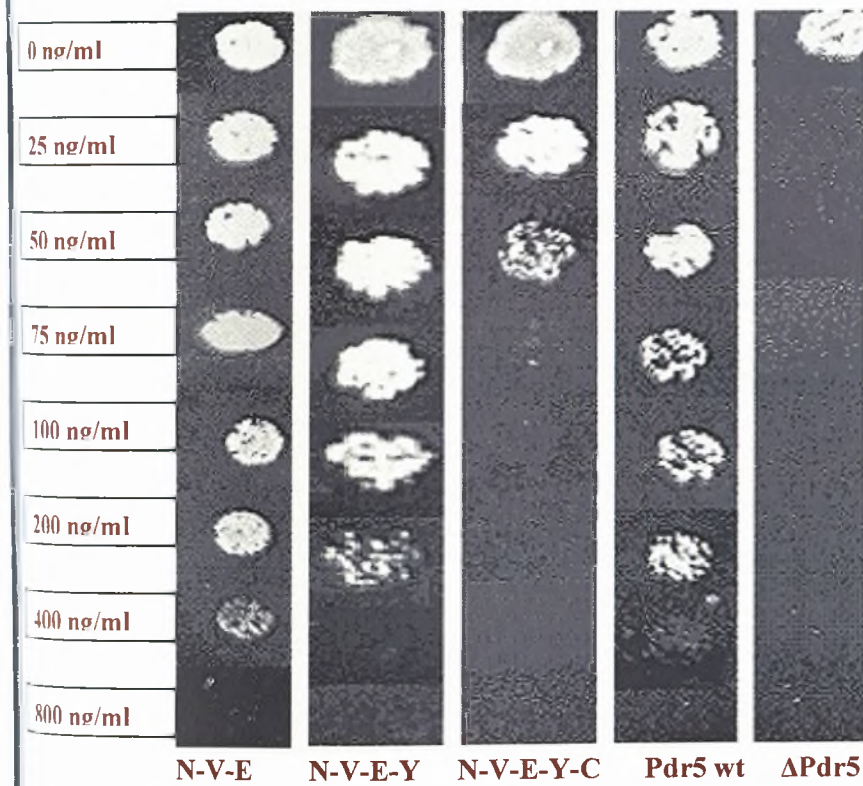
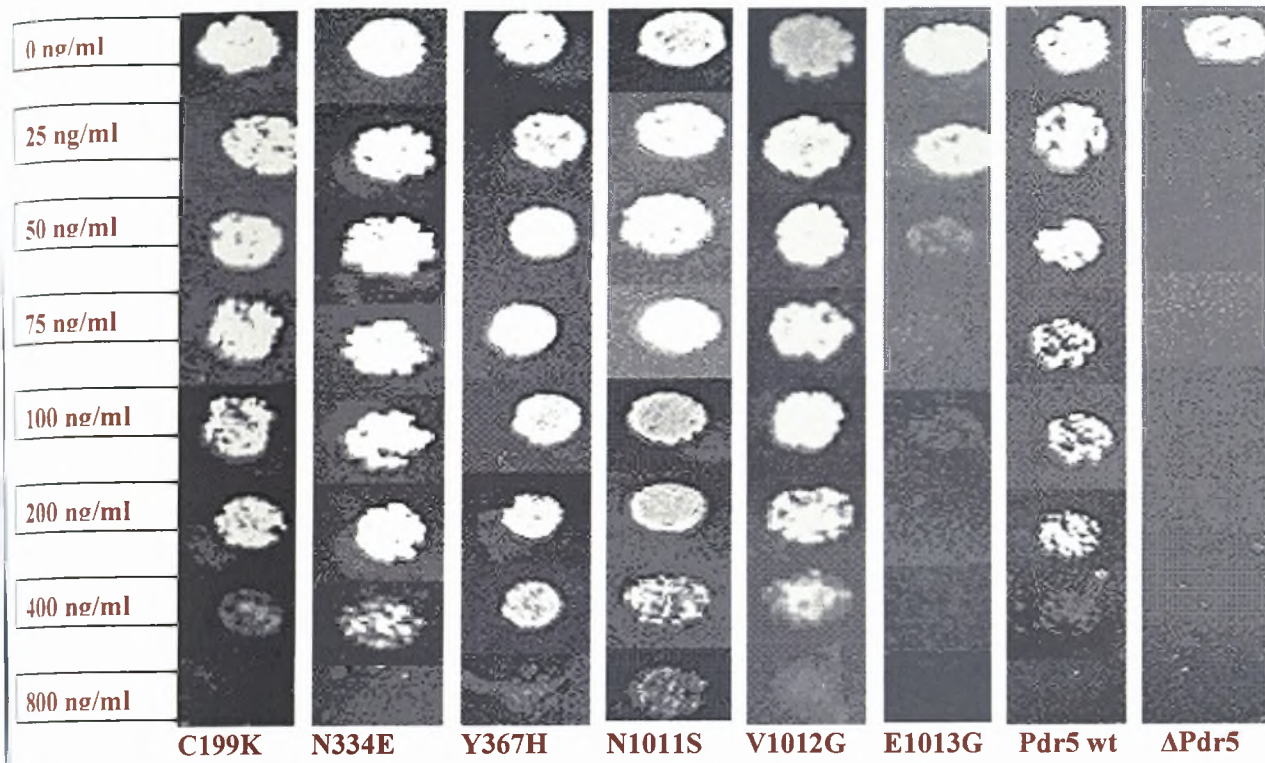
6.5.1 Δοκιμές αντίστασης φαρμάκων σε τριβλία με άγαρ

Η επιρροή των Pdr5 μεταλλαγών στην αναγνώριση και εξώθηση των υποστρωμάτων εξετάστηκε με δοκιμές παρεμπόδισης της κυτταρικής αύξησης σε τριβλία με άγαρ, που περιέχουν διάφορες συγκεντρώσεις κυκλοεξιμιδίου, κετοκοναζόλης και ροδαμίνης 6G .

6.5.1.1 Δοκιμή αντίστασης στο κυκλοεξιμιδίου σε τριβλία με άγαρ

Η ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 19.) παρουσιάζει τα προφίλ αντίστασης των Pdr5 μεταλλαγμάτων ζύμης, των κυττάρων αγρίου τλυπου και των ΔPdr5 κυττάρων, παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κυκλοεξιμιδίου. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι τα Pdr5-C199K, Pdr5-N334E, Pdr5-V1012G και τα Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G κύτταρα και τα κύτταρα αγρίου τύπου παρουσιάζουν την ίδια δυνατότητα αντίστασης παρουσία του κυκλοεξιμιδίου. Από την άλλη, η Y367H και ειδικά η N1011S μεταλλαγή φαίνονται να αυξάνουν την αντίσταση συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου. Συγκεκριμένα, τα Pdr5-N1011S και τα Pdr5-Y367H κύτταρα μπορούν να αυξηθούν παρουσία 800 ng/ml κυκλοεξιμιδίου, ενώ ο Pdr5 άγριος κυτταρικός τύπος σταματά να πολλαπλασιάζεται υπό μια τόσο υψηλή συγκέντρωση φαρμάκου. Η πιο ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι τα κύτταρα που εκφράζουν τις N1011S-V1012G-E1013G Pdr5 μεταλλαγές είναι ανθεκτικότερα από τα κύτταρα που εκφράζουν τις N1011S-V1012G-E1013G-Y367H Pdr5 μεταλλαγές, παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων κυκλοεξιμιδίου. Επιπλέον, τα στελέχη ζύμης με τις N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K Pdr5 μεταλλαγές είναι πιο ευαίσθητα σε σχέση με τα κύτταρα που φέρνουν τις μεταλλαγές N1011S-V1012G-E1013G-Y367H. Τέλος, παρατηρείται μια σημαντική έλλειψη αντίστασης για τα κύτταρα Pdr5-E1013G.

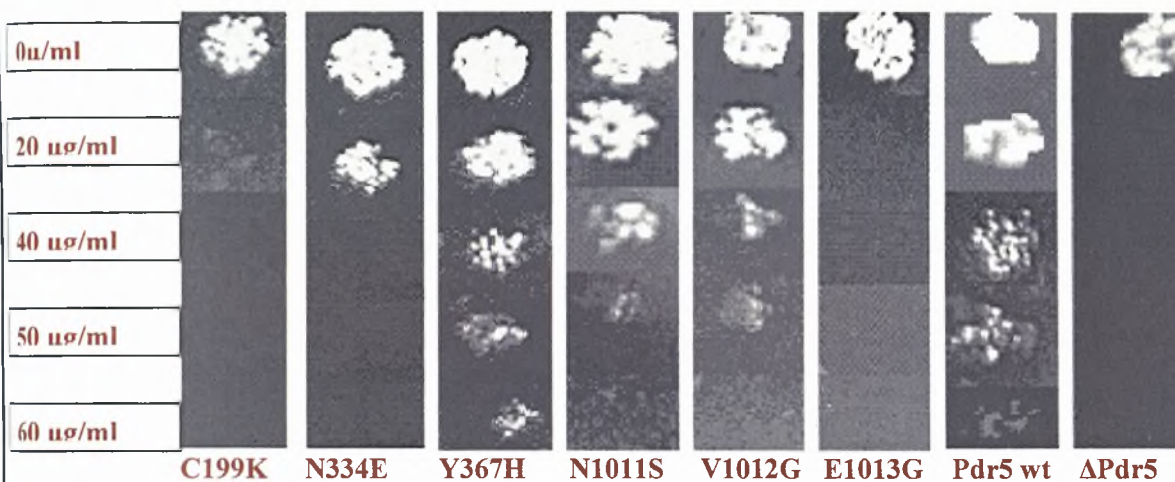
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

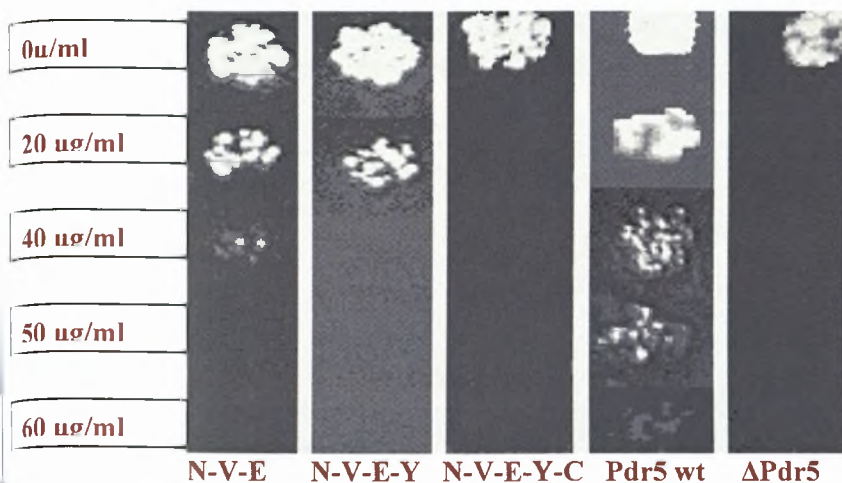


Εικόνα 19. Δοκιμή παρεμπόδισης αύξησης σε τριβλία αγάρ παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων κυκλοξιμιδίου. Τα C199K, N334E, Y367H, N1011S, V1012G, E1013G, N1011S-V1012G-E1013G (N-V-E), N1011S-V1012G-E1013G-Y367H (N-V-E-Y), N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K (N-V-E-Y-C) μεταλλάγματα εξετάστηκαν για τη δυνατότητα αντίστασής τους υπό την παρουσία κυκλοξιμιδίου. Τα Pdr5 wt και τα ΔPdr5 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τον θετικό και αρνητικό έλεγχο αντίστοιχα.

6.5.1.2 Δοκιμή αντίστασης στην ροδαμίνη 6G σε τριβλία με αγάρ

Παρουσία ροδαμίνης 6G τα Pdr5 μεταλλάγματα ζύμης εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα αντίστασης, τα οποία παρουσιάζονται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 20.) Από τις δοκιμές αντίστασης είναι προφανές ότι τα κύτταρα που φέρουν τις C199K και E1013G μεταλλάξεις χάνουν τη δυνατότητα αντίστασής τους πολύ νωρίς. Επίσης, μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε ότι σε μια συγκέντρωση ροδαμίνης 6G των 20 µg/ml τα προαναφερθείσα μεταλλάγματα αδυνατούν ν' αυξηθούν. Επιπλέον, τα κύτταρα που εκφράζουν την Pdr5 μεταλλαγή Y367H εμφανίζονται να πλεονεκτούν έναντι όλων των άλλων στελεχών ζύμης, αλλά και έναντι των Pdr5 αγρίου τύπου κυττάρων. Κατόπιν, οι Pdr5 μεταλλαγές N1011S και V1012G στον C-βρόχο οδηγούν σε δυνατότητα αύξησης των κυττάρων ζύμης που τις φέρουν μέχρι συγκεντρώσεως των 50 µg/ml, ενώ τα κύτταρα που εκφράζουν τη μεταλλαγή στο μοτίβο B N334E μπορούν να αυξηθούν μέχρι 20 µg/ml ροδαμίνης 6G. Τέλος, τα κύτταρα Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K εμφανίζουν σημαντική ευαισθησία παρουσία της ροδαμίνης 6G συγκρινόμενα με τα προφίλ αντίστασης των κυττάρων Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G και Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G-Y367H.

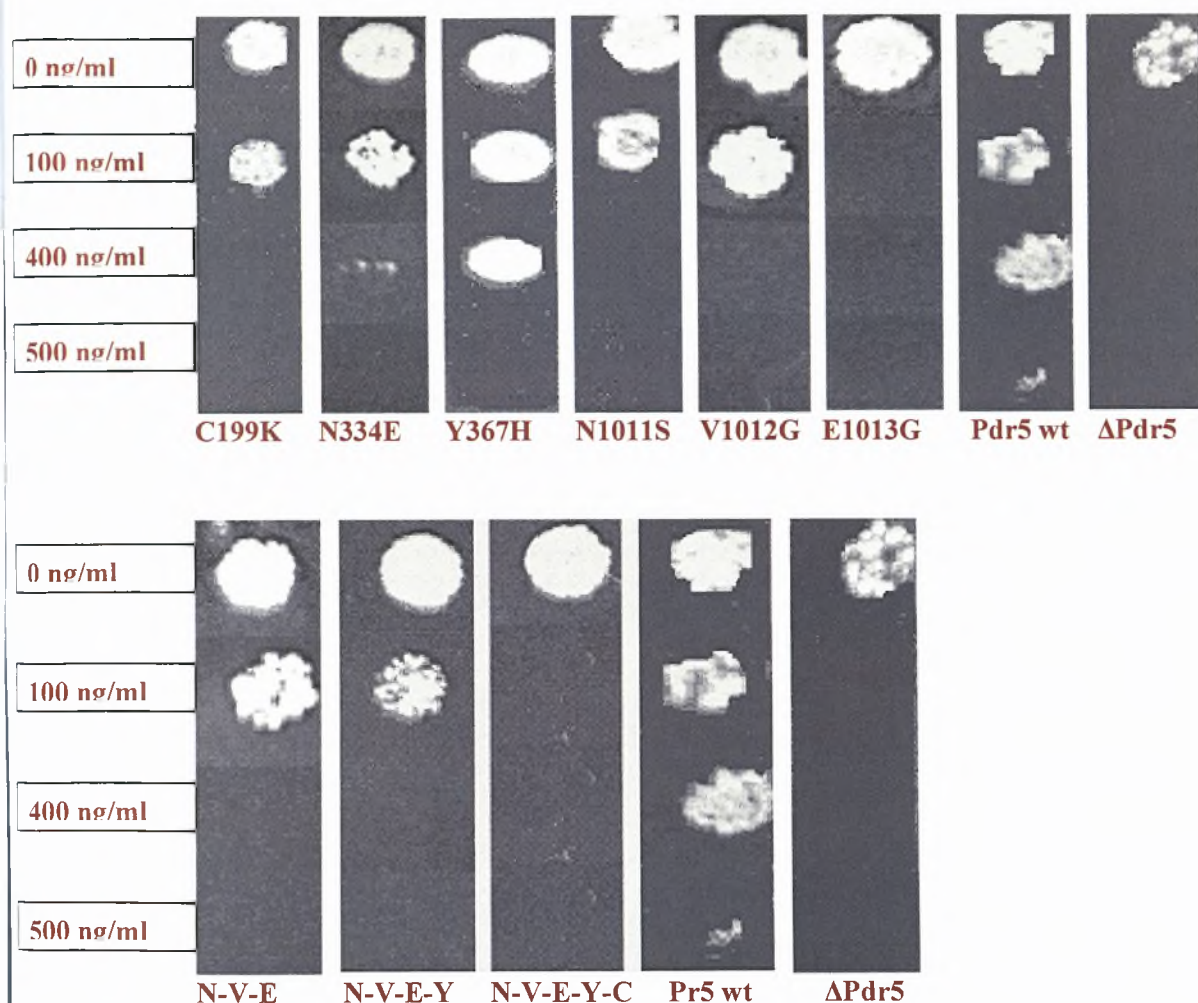




Εικόνα 20. Δοκιμή παρεμπόδισης ανάπτυξης παρουσία της χρωστικής ουσίας φθορισμού ροδαμίνης 6G σε τριβλία με άγαρ . Τα κύτταρα ζύμης που εκφράζουν τις C199K, N334E, Y367H, N1011S, V1012G, E1013G, N1011S-V1012G-E1013G (N-V-E), N1011S-V1012G-E1013G-Y367H (N-V-E-Y), και N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K (N-V-E-Y-C) Pdr5 μεταλλάγες εξετάστηκαν για τη δυνατότητα αντίστασής τους υπό την παρουσία ροδαμίνης 6G. Τα κύτταρα Pdr5 wt και ΔPdr5 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες αντίστοιχα.

6.5.1.3 Δοκιμή αντίστασης παρουσία κετοκοναζόλης σε τριβλία άγαρ

Εξετάσαμε τα κύτταρα που φέρουν τις διάφορες Pdr5 μεταλλάξεις παρουσία κετοκοναζόλης, η οποία είναι μία αζόλη με αντιμυκητιστακές ιδιότητες. Η ευαισθησία των στελεχών ζύμης στην ιδιαίτερα λιπόφιλη κετοκοναζόλη παρουσιάζεται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 21.). Συγκεκριμένα, παρατηρούμε πως η αντικατάσταση της 367 τυροσίνης με ιστιδίνη αυξάνει την ικανότητα αντίστασης και οδηγεί στον ανθεκτικότερο φαινότυπο συγκριτικά με τις άλλες μεταλλάξεις. Από την άλλη, τα κύτταρα ζύμης που εκφράζουν τις μεταλλάξεις E1013G και N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K εμφανίζονται να είναι πιο ευαίσθητα. Τέλος, τα κύτταρα που φέρουν τις μεταλλάξεις C119K, N334E, V1012G, N1011S-V1012G-E1013G και N1011S-V1012G-E1013G-Y367H δεν είναι ικανά να αυξηθούν παρουσία των 400 ng/ml κετοκοναζόλης, όπου μόνο τα κύτταρα με την Y367H Pdr5 μετάλλαξη παρουσιάζουν ευδιάκριτη αντίσταση, αλλά εμφανίζουν αντίσταση σε συγκέντρωση κετοκοναζόλης των 100 ng/ml.



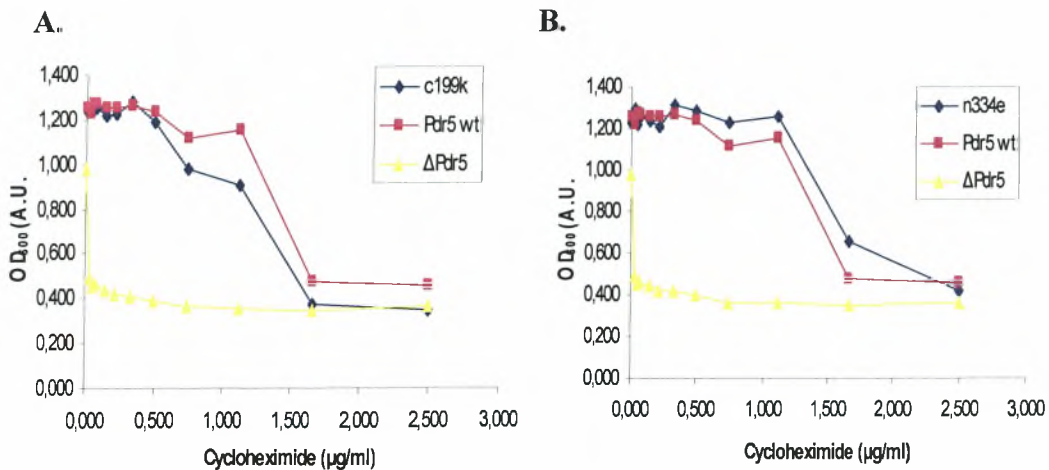
Εικόνα 21. Δοκιμή παρεμπόδισης της αύξησης παρουσία κετοκοναζόλης σε τριβλία με άγαρ. Τα Pdr5 C199K, N334E, Y367H, N1011S, V1012G, E1013G, N1011S-V1012G-E1013G (N-V-E), N1011S-V1012G-E1013G-Y367H (N-V-E-Y), και N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K (N-V-E-Y-C) μεταλλάγματα ζύμης εξετάστηκαν για τη δυνατότητα αντίστασής τους υπό την παρουσία κετοκοναζόλης. Τα κύτταρα Pdr5 wt και ΔPdr5 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες αντίστοιχα.

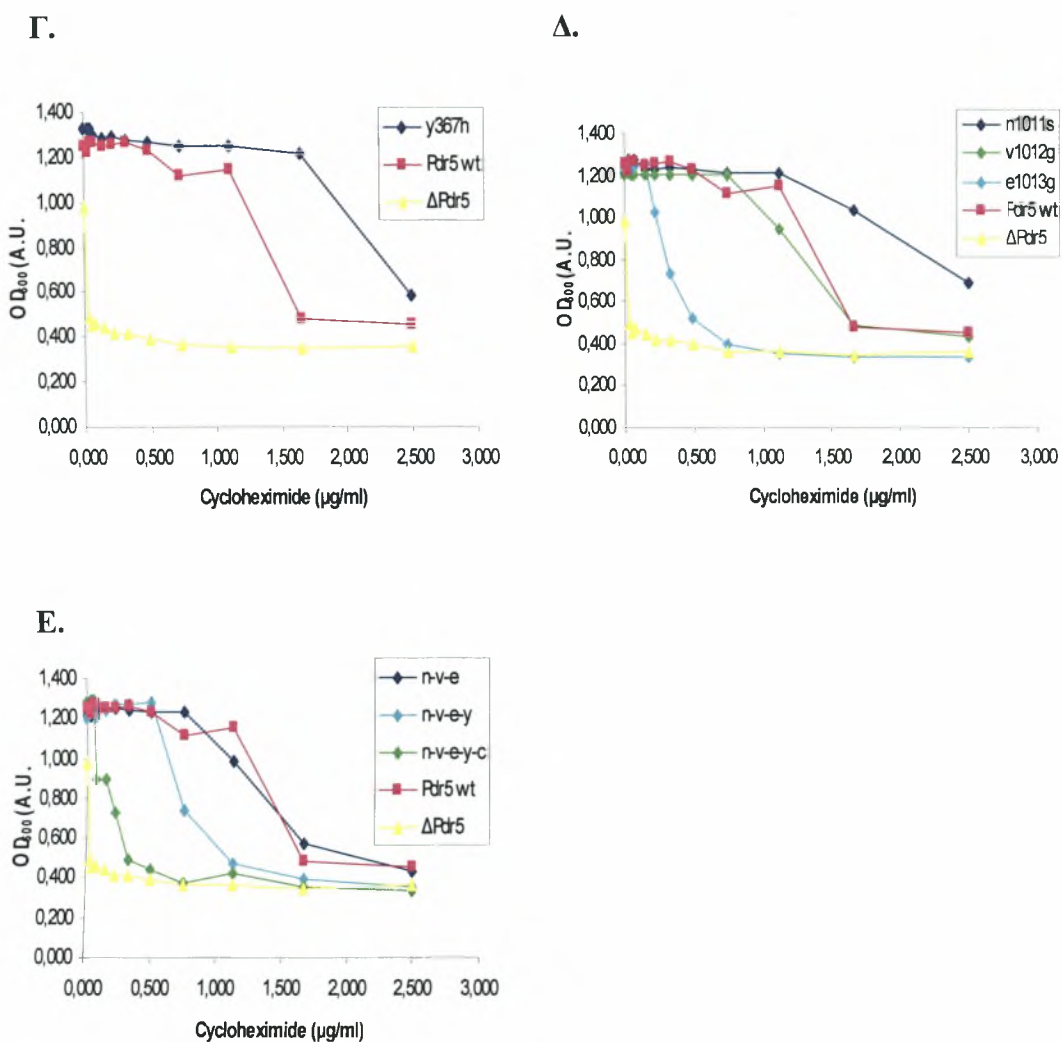
6.5.2 Δοκιμές αντίστασης φαρμάκων σε υγρές καλλιέργειες

Η λειτουργία των Pdr5 παραλλαγών μπορεί επίσης να αναλυθεί σε υγρές καλλιέργειες, όπου η τιμή OD₆₀₀ μπορεί να μετρηθεί και να παρουσιασθεί συγκριτικά με την αντίστοιχη συγκέντρωση φαρμάκου. Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση των υγρών καλλιεργειών έχουμε την ευκαιρία να εξετάσουμε την ευαισθησία των Pdr5 μεταλλαγμάτων παρουσία των ποικίλων συγκεντρώσεων φαρμάκων και να συγκρίνουμε τη δυνατότητα αντίστασής τους.

6.5.2.1 Αποτελέσματα αντίστασης στο κυκλοεξιμίδιο σε υγρές καλλιέργειες

Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 22.), μπορούμε εύκολα να παρατηρήσουμε ότι οι N1011S-V1012G-E1013G, C199K, N334E και E1012G μεταλλαγές μοιράζονται τον ίδιο φαινότυπο αντίστασης με τα κύτταρα αγρίου τύπου, παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων κυκλοεξιμιδίου (Εικόνα 22, Α, Β, Δ & Ε Διαγράμματα). Επιπλέον, μια από τις πιο ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις είναι ότι η μετάλλαξη Y367H του Η-βρόχου και η μετάλλαξη του C-βρόχου N1011S οδηγούν σε μια σημαντική αύξηση της αντίστασης (Εικόνα 22, Γ & Δ Διαγράμματα). Συγκεκριμένα, όταν φαίνεται πως τα Pdr5 wt κύτταρα χάνουν τη δυνατότητα αντίστασής τους σε μια συγκέντρωση κυκλοεξιμιδίου των 1.6 μg/ml τα κύτταρα που εκφράζουν τις προαναφερθείσες μεταλλαγές συντηρούν τη δυνατότητα αντίστασής. Από την αλλαγή, τα στοιχεία καταδεικνύουν μια σημαντική έλλειψη αντίστασης για τα στελέχη ζύμης Pdr5-E1013G, Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G-Y367H και Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου (Εικόνα 22, Δ & Ε Διαγράμματα).



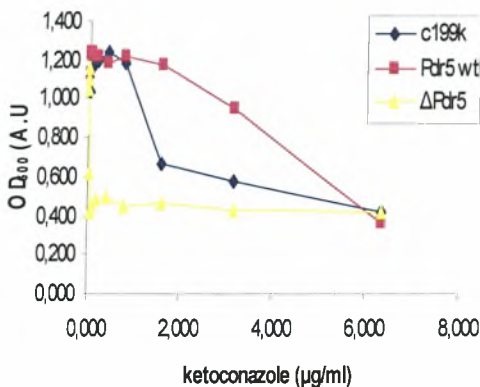


Εικόνα 22. Προφίλ αντίστασης των κυττάρων ζύμης αγρίου τύπου, των ΔPdr5 και των κυττάρων που φέρουν τις διάφορες Pdr5 μεταλλάξεις παρουσία κυκλοεξιμιδίου. Η οπτική πυκνότητα (A_{600}) μετρήθηκε μετά από επώαση 40 ωρών στους 30°C. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις κυκλοεξιμιδίου, ενώ στον κάθετο άξονα οι τιμές της οπτικής πυκνότητας, που συλλέχθησαν με χρήση ELISA Reader.

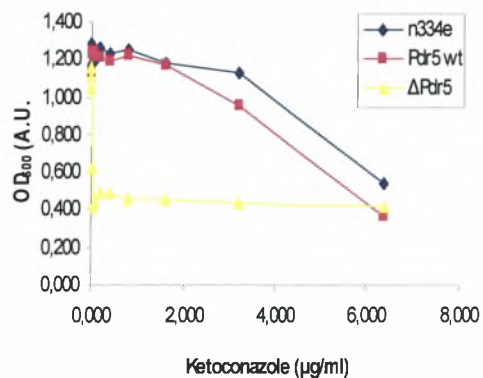
6.5.2.2 Αποτελέσματα αντίστασης στην κετοконаζόλη σε υγρές καλλιέργειες

Η κετοконаζόλη, που είναι ένα ευρέως γνωστό μόριο για τις αντιμυκητιασικές της ιδιότητες, χρησιμοποιήθηκε για να εξετασθεί η ευαισθησία των Pdr5 μεταλλαγμάτων σε υγρές καλλιέργειες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 23.). Παρουσία κετοконаζόλης τα κύτταρα ζύμης Pdr5-C199K εμφανίζονται να είναι ευαίσθητα συγκριτικά με τα Pdr5 wt κύτταρα (Εικόνα 23, Διάγραμμα Α.), ενώ τα κύτταρα Pdr5-N334E παρουσιάζουν την ίδια δυνατότητα αντίστασης με τα κύτταρα αγρίου τύπου (Εικόνα 23, Διάγραμμα Β.). Κατόπιν, η αντικατάσταση της τυροσίνης 367 με ιστιδίνη αυξάνει την αντίσταση στην κετοконаζόλη. Συγκεκριμένα, σε συγκέντρωση κετοконаζόλης 6.4 $\mu\text{g/ml}$ τα Pdr5 wt σταματούν ν' αυξάνονται, ενώ τα κύτταρα ζύμης Pdr5-Y367H συντηρούν τη δυνατότητα αντίστασής (Εικόνα 23, Διάγραμμα Γ). Επιπλέον, όλες οι μεταλλάξεις του C-βρόχου, και ειδικά η E1013G μετάλλαξη οδηγούν στη μείωση της αντίστασης, συγκριτικά με τον φαινότυπο του αγρίου τύπου (Εικόνα 23, Διάγραμμα Δ). Τέλος, τα κύτταρα που εκφράζουν τις Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G (n-v-e), N1011S-V1012G-E1013G-Y367H (n-v-e-y) και N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K(n-v-e-y-c) μεταλλάξεις εμφανίζουν επίσης έναν ευαίσθητο φαινότυπο (Εικόνα 23, Διάγραμμα Ε.).

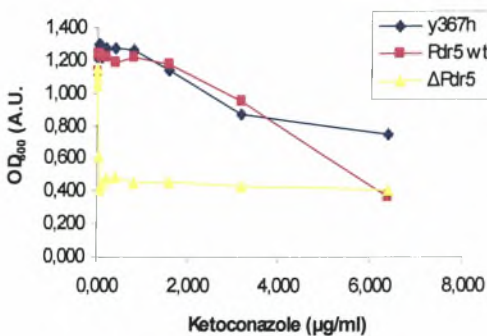
A.



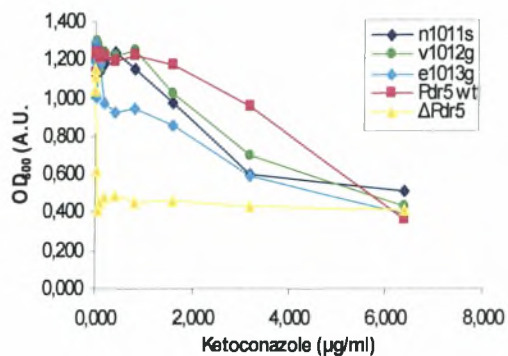
B.



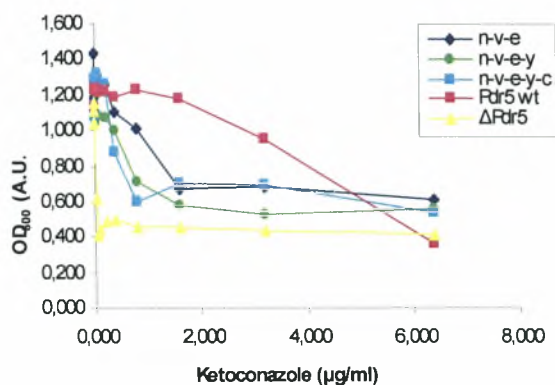
Γ.



Δ.



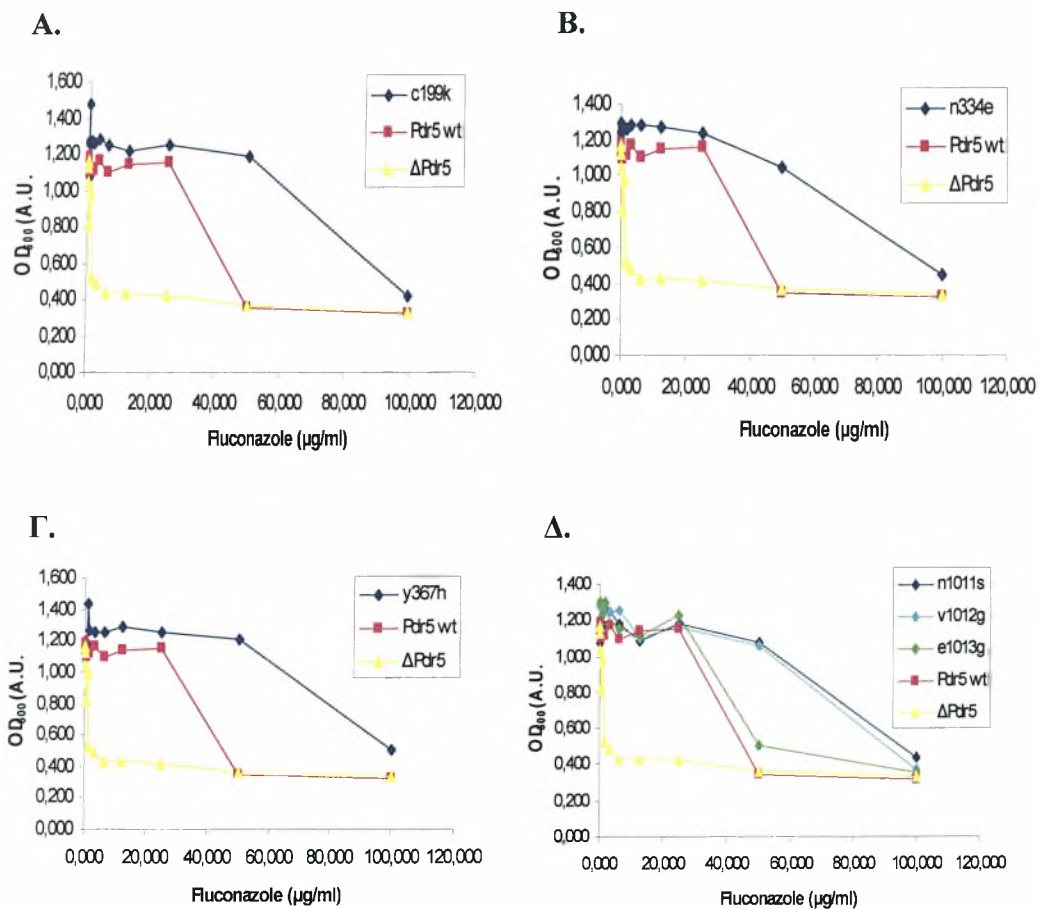
Ε.

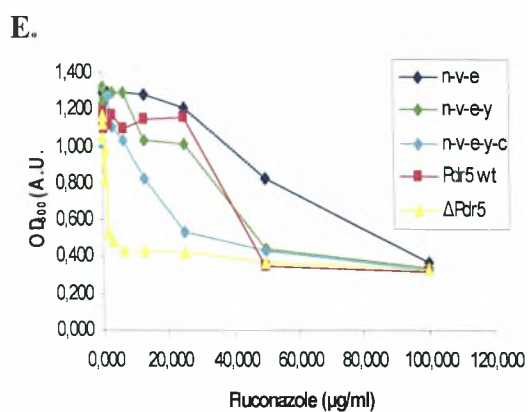


Εικόνα 23. Προφίλ αντίστασης των κυττάρων ζύμης αγρίου τύπου, των $\Delta Pdr5$ και των κυττάρων που φέρουν τις διάφορες *Pdr5* μεταλλάξεις παρουσία κετοκοναζόλης. Η οπτική πυκνότητα (A_{600}) μετρήθηκε μετά από επώαση 40 ωρών στους 30°C . Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις κετοκοναζόλης, ενώ στον κάθετο άξονα οι τιμές της οπτικής πυκνότητας, που συλλέχθησαν με χρήση ELISA Reader.

6.5.2.3 Αποτελέσματα αντίστασης στην φλουκοναζόλη σε υγρές καλλιέργειες

Η φλουκοναζόλη είναι μια αζόλη, η οποία χρησιμοποιείται την θεραπεία των μυκητιασικών μολύνσεων. Λαμβάνοντας υπόψη τη σημασία της ανωτέρω αζόλης στη θεραπεία παθογόνων μυκήτων αποφασίσαμε να εξετάσουμε την ευαισθησία των Pdr5 μεταλλάξεων παρουσία αυτού του υποσυρώματος. Η ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 24.) παρουσιάζει το προφίλ αντίστασης των στελεχών ζύμης που φέρουν τις διάφορες Pdr5 μεταλλάξεις παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων φλουκοναζόλης. Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι όχι μόνο η αντικατάσταση της κυστεΐνης 199 με λυσίνη, αλλά και οι μεταλλαγές N334E, Y367H, N1011S, V1012G και οι τριπλές μεταλλαγές στον C-βρόχο N1011S-V1012G-E1013G (n-v-e) οδηγούν σε αύξηση της αντίστασης, συγκριτικά με τα Pdr5 wt κύτταρα (Εικόνα 24, Διαγράμματα Α., Β, Γ, Δ & Ε). Από την άλλη, το στέλεχος ζύμης Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K εμφανίζεται να είναι πίο ευαίσθητο παρουσία των υψηλών συγκεντρώσεων φλουκοναζόλης σε σχέση με τα Pdr5 wt κύτταρα (Εικόνα 24, Διάγραμμα Ε). Τέλος, τα κύτταρα Pdr5-E1013G εμφανίζουν τον ίδιο φαινότυπο αντίστασης με τα κύτταρα αργίου τύπου (Εικόνα 24, Διάγραμμα Δ).

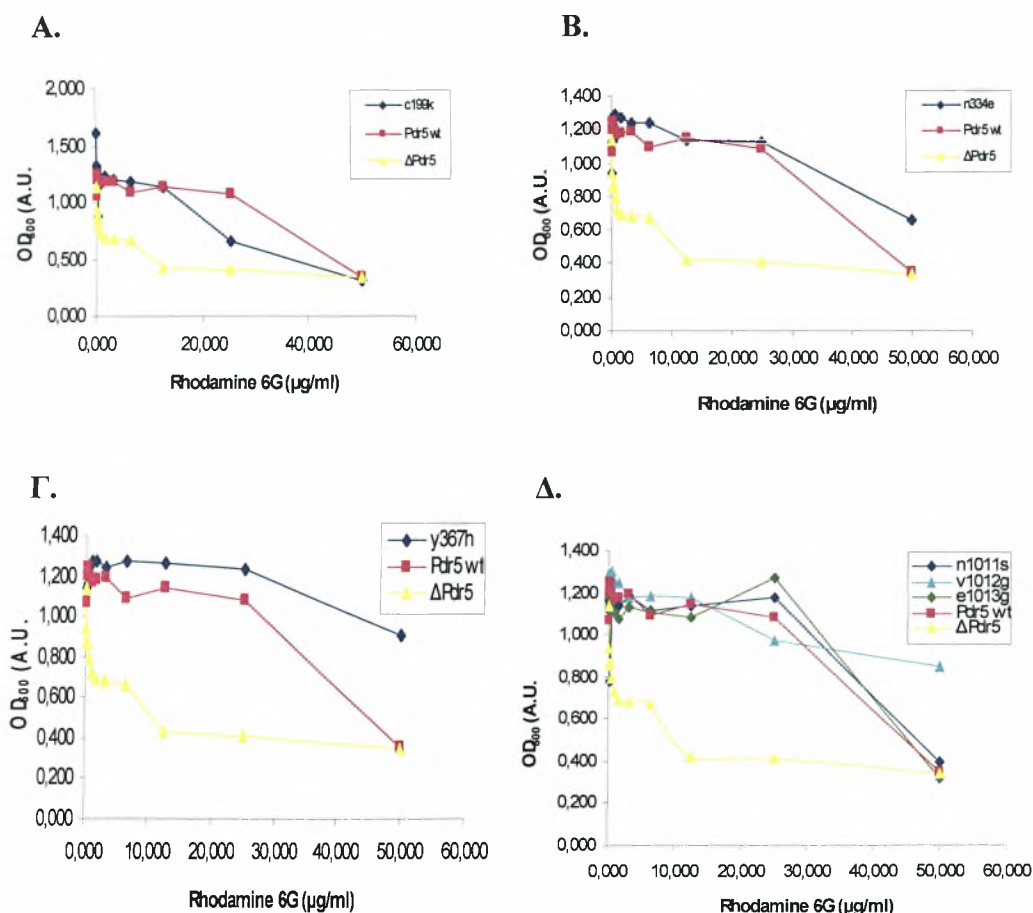




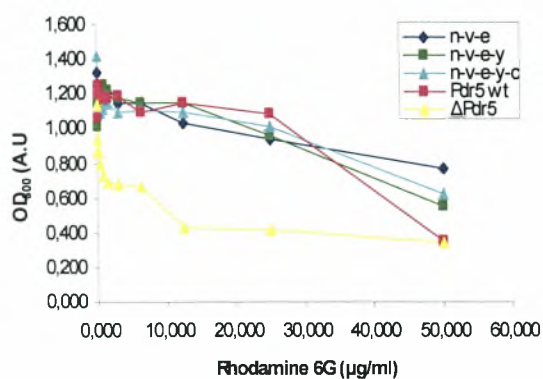
Εικόνα 24. Προφίλ αντίστασης των κυττάρων ζύμης αγρίου τύπου, των ΔPdr5 και των κυττάρων που φέρουν τις διάφορες Pdr5 μεταλλάξεις παρουσία φλουκοναζόλης. Η οπτική πυκνότητα (A_{600}) μετρήθηκε μετά από επώαση 40 ωρών στους 30°C. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις φλουκοναζόλης, ενώ στον κάθετο άξονα οι τιμές της οπτικής πυκνότητας, που συλλέχθηκαν με χρήση ELISA Reader.

6.5.2.4 Αποτελέσματα αντίστασης στην ροδαμίνη 6G σε υγρές καλλιέργειες

Επώασαμε, σε υγρές καλλιέργειες, τα Pdr5 μεταλλάγματα ζύμης παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων ροδαμίνης 6G προκειμένου να εξετασθεί η ικανότητα αντίστασής τους. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 25.) Τα στοιχεία καταδεικνύουν μια αύξηση της αντίστασης για τα κύτταρα Y367H, V1012G και N1011S-V1012G-E1013G (n-v-e) (Εικόνα 25, Γ, Δ & Ε Διαγράμματα). Αντίθετα, τα κύτταρα που εκφράζουν τη μεταλλαγή C199K εμφανίζονται να είναι πίο ευαίσθητα παρουσία της χρωστικής ουσίας φθορισμού από τα κύτταρα αγρίου τύπου (Εικόνα 25, Διάγραμμα Α). Έπειτα, τα κύτταρα που εκφράζουν τις Pdr5 N334E, N1011S, E1013G, N1011S-V1012G-E1013G-Y367H (n-v-e-y) και N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K (n-v-e-y-c) μετλλάξεις εμφανίζουν τον ίδιο φαινότυπο αντίστασης με τα Pdr5 wt κύτταρα (Εικόνα 25, Δ & Ε Διαγράμματα).



Ε.



Εικόνα 25. Προφίλ αντίστασης των κυττάρων ζύμης αγρίου τύπου, των ΔPdr5 και των κυττάρων που φέρουν τις διάφορες Pdr5 μεταλλάξεις παρουσία ροδαμίνης 6G. Η οπτική πυκνότητα (A_{600}) μετρήθηκε μετά από επώαση 40 ωρών στους 30°C. Στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις ροδαμίνης 6G, ενώ στον κάθετο άξονα οι τιμές της οπτικής πυκνότητας, που συλλέχθηκαν με χρήση ELISA Reader.

7. Συζήτηση

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να ερευνηθεί η μοριακή βάση του πλειοτροπικού φαινομένου αντίστασης φαρμάκων στη ζύμη *S. cerevisiae*. Προκειμένου να επιτευχθεί αυτό, εκτελέστηκε μεταλλακτική ανάλυση των νουκλεοτιδο-δεσμευτικών περιοχών (NBDs) του μεμβρανικού ABC μεταφορέα Pdr5. Ο Pdr5 μεταφορέας είναι μια από τις βασικές αντλίες εξώθησης κυτταροτοξικών ουσιών στην ζύμη, και αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στις μελέτες πάνω στο φαινόμενο της πλειοτροπικής αντίστασης στα φάρμακα εξαιτίας του γεγονότος ότι είναι ορθόλογος των μεταφορέων ABC των παθογόνων μυκήτων (Prasad *et al.*, 1195, Sanglard *et al.*, 1995). Γενικά, η κατανόηση της ρύθμισης και της λειτουργίας των δικτύων αντίστασης σε ξеноβιοτικές ουσίες στους μύκητες θα μας δώσει την ευκαιρία να σχεδιάσουμε χημικά θεραπευτικά μόρια ικανά να εμποδίσουν την εκδήλωση της πλειοτροπικής αντίστασης.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η κατευθυνόμενη μέθοδος μεταλλαξιγένεσης προκειμένου να παραχθούν οι διάφορες μεταλλαγές (C199K, N334E, Y367H, N1011S, V1012G, E1013G, N1011S-V1012G-E1013G, N1011S-V1012G-E1013G-Y367H, N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K). Κατόπιν, εξετάστηκαν τα αποτελέσματα των αμινοξικών αντικαταστάσεων εκτελώντας δοκιμές αντίστασης φαρμάκων. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας οδηγούν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

***Η ευαισθησία στα δοκιμαζόμενα φάρμακα εξαρτάται από τη φύση του φαρμάκου.** Τα αποτελέσματά των πειραμάτων αντίστασης δείχνουν ότι τα διάφορα στελέχη ζύμης έχουν διαφορετικές ιδιότητες αντίστασης για τα δοκιμαζόμενα φάρμακα. Για παράδειγμα, επωάζοντας τα κύτταρα Pdr5-C199K, Pdr5-N334E και Pdr5-V1012G με διαφορετικές συγκεντρώσεις φλουκοναζόλης παρατηρήσαμε ότι όταν σταματούν τα κύτταρα αγρίου τύπου ν' αυξανάνονται τα προαναφερθέντα κύτταρα φαίνονται να εμφανίζουν αντίσταση. Σε αντίθεση, οι μεταλλαγές C199K, N334E και V1012G οδηγούν στην δημιουργία πιο ευαίσθητων στελεχών, συγκρινόμενα με τα κύτταρα αγρίου τύπου, παρουσία κυκλοεξιμιδίου. Κατόπιν, προηγούμενες μελέτες (Ernst *et al.*, 2008) κατατάσσουν την φλουκοναζόλη και το κυκλοεξιμίδιο στην κατηγορία των μη-ανασταλτικών φαρμάκων. Γενικά, τα μη-ανασταλτικά φάρμακα δεν εμποδίζουν τη δραστηριότητα παραγωγής ATP όσον αφορά τον μεταφορέα Pdr5. Στον αντίποδα, τα ανασταλτικά φάρμακα όπως η κετοκοναζόλη και η ροδαμίνη 6G εμφανίζουν αντίθετη συμπεριφορά. Αυτή η γνώση καθιστά την παρατήρησή μας ακόμα πιο ενδιαφέρουσα εξαιτίας του γεγονότος ότι αποτελεί μια πρόσθετη ένδειξη για την ύπαρξη των ποικίλων φαρμακο-δεσμευτικών περιοχών στις διαμεμβρανικές περιοχές του ABC μεταφορέα Pdr5 (Kolaczowski *et al.*, 1996).

***Υπάρχει “συνομιλία” μεταξύ των NBDs και των TMDs περιοχών.** Παρατηρήσαμε πως κάθε διενεργηθείσα μεταλλαγή στους NBDs όχι μόνο έχει επιπτώσεις στην εξώθηση των δοκιμαζόμενων φαρμάκων, αλλά και πως μερικά από τα μεταλλάγματα εμφανίζονται να φέρουν διαφορετικές ιδιότητες αντίστασης. Γενικά, οι νουκλεοτιδο-δεσμευτικές περιοχές είναι αρμόδιες για την σύνδεση και την υδρόλυση του ATP. Αλλά, οι μελέτες αντίστασης φαρμάκων μας παρέχουν μια δυνατή ένδειξη ότι NBDs έχουν έναν πρόσθετο σημαντικό ρόλο στην επιλεκτικότητα σύνδεσης και μεταφοράς των τοξικών υποστρωμάτων. Υπάρχει, λοιπόν, μια συγκεκριμένη σύνδεση-γέφυρα μεταξύ των TMDs και των NBDs που ελέγχει την αναγνώριση και την δυνατότητα διακίνησης των φαρμάκων. Πλέον, είναι προφανές πως ένα μέρος αυτής της γέφυρας υποστηρίζεται από την ασυμμετρία μεταξύ των δύο NBDs.

***Η μετάλλαξη Y367H οδηγεί σε δραστική αύξηση της ανθεκτικότητας σε σχέση με τα κύτταρα αγρίου τύπου.** Υπάρχουν προηγούμενες μελέτες (Zaitseva *et al.*, 2005) που παρουσιάζουν την σημασία της ιστιδίνης του Η-βρόχου στην σύνδεση και υδρόλυση του ATP. Συγκεκριμένα, ο Η-βρόχος αλληλεπιδρά με την γ-φωσφορική ομάδα του ATP και με τον συντηρημένο D-βρόχο της αντίθετης νουκλεοτιδο-δεσμευτικής περιοχής. Εντούτοις, η συντηρημένη ιστιδίνη λείπει από τον Η-βρόχο λείπει στο N-τελικό NBD (NBD1) του Pdr5 μεταφορέα. Αντικαθιστώντας την τυροσίνη 367 με ιστιδίνη παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα Pdr5-Y367H εμφανίζουν μια εκπληκτικά σημαντικά αύξηση της αντίστασης, συγκριτικά με τα κύτταρα αγρίου τύπου και τα άλλα στελέχη, για κάθε δοκιμασμένη τοξική ένωση. Αποτελεί, λοιπόν, η αντικατάσταση της ιστιδίνης 367 με τυροσίνη στον NBD1 εξελικτικό μειονέκτημα; Προφανώς και αυτός ο εκφυλισμός έχει δυσμενείς επιπτώσεις στην αντίσταση του άγριου τύπου παρουσία των υψηλών συγκεντρώσεων διάφορων φαρμάκων. Εντούτοις, πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι η αντικατάστασή της συντηρημένης 367 ιστιδίνης είναι μόνο ένα μικρό κομμάτι της ασυμμετρίας μεταξύ του NBDs που χαρακτηρίζουν όλους τους μύκητες, και όχι μια τυχαία αντικατάσταση ενός ορισμένου αμινοξέος.

***Τα κύτταρα που εκφράζουν τη μεταλλαγή E1013G στο C-βρόχο εμφανίζουν μια ισχυρή ευαισθησία παρουσία των δοκιμαζόμενων τοξικών υποστρωμάτων.** Είναι η συμβολή της παρουσίας του αρνητικά φορτισμένου 1013 γλουταμινικού στον NBD2 τόσο σημαντική για την αντίσταση κατά των φαρμάκων; Η απάντηση είναι θετική. Συγκριτικά με όλες τις άλλες μεταλλαγές στον C-βρόχο η μετάλλαξη E1013G οδηγεί στον πίο ευαίσθητο φαινότυπο. Αφ' ετέρου, η μεταλλαγή στο C-βρόχο N1011S εμφανίζεται να δίνει ένα ανθεκτικό πλεονέκτημα όταν τα κύτταρα Pdr5-N1011S αναπτύσσονται υπό την παρουσία κυκλοεξιμιδίου και φλουκοναζόλης. Αντίθετα, υπό την παρουσία κετοκοναζόλης και ροδαμίνης 6G τα κύτταρα Pdr5-N1011S εμφανίζονται να είναι πίο ευαίσθητα. Κατόπιν, η μεταλλαγή V1012G οδηγεί σε μείωση της ικανότητας αντίστασης παρουσία κετοκοναζόλης, ενώ το προφίλ αντίστασης αλλάζει σε έναν ανθεκτικότερο φαινότυπο όταν τα κύτταρα Pdr5-V1012G επωάζονται παρουσία ροδαμίνης 6G και φλουκοναζόλης. Τέλος, όταν επωάζουμε τα κύτταρα Pdr5-V1012G παρουσία κυκλοεξιμιδίου εμφανίζουν κοινή φαινοτυπική συμπεριφορά με τα κύτταρα αγρίου τύπου.

Παράλληλα, ξέρουμε ότι το συντηρημένο μοτίβο LSGGQ εμφανίζεται να διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην σύνδεση και την υδρόλυση του ATP και πως δημιουργεί επαφές κυρίως με την γ-φωσφορική ομάδα του μορίου ATP (Zaitseva *et al.*, 2005). Αλλά, στον Pdr5 NBD2 C-βρόχο το συντηρημένο μοτίβο έχει αντικατασταθεί με την περιοχή LNVEQ. Κατόπιν, υπάρχουν προηγούμενες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η Pdr5 NBD2 σύνθετη περιοχή είναι ουσιαστική για τη μεταφορά φαρμάκων (Ernst *et al.*, 2008), ενώ η NBD1 σύνθετη περιοχή είναι κρίσιμη για την υδρόλυση του ATP. Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνουν και συμφωνούν με την ανωτέρω ιδέα, που παρουσιάζει πως ο εκφυλισμός της NBD2 επηρεάζει σημαντικά τη διακίνηση των προς εξώθηση υποστρωμάτων.

***Η αμινοξική ασυμμετρία μεταξύ των δύο NBDs αποκαλύπτει την ύπαρξη μιας λειτουργικής ασυμμετρίας.** Παρατηρήσαμε ότι τα κύτταρα που εκφράζουν τις Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G-Y367H μεταλλάξεις είναι πιο ευαίσθητα, σε όλα τα δοκιμασμένα φάρμακα, από τα κύτταρα Pr5-N1011S-V1012G-E1013G, αλλά λιγότερο ευαίσθητα από τα Pdr5-N1011S-V1012G-E1013G-Y367H-C199K. Η ανωτέρω παρατήρηση αποτελεί μια αδιάψευστη απόδειξη ότι η ασυμμετρία μεταξύ των δύο NBDs είναι αρμόδια για την ρύθμιση του φαινότυπου ανθεκτικότητας παρουσία ξενοβιοτικών ουσιών. Ο εκφυλισμός των NBDs σε όλα τα μυκητιακά είδη (Ralf Enger *et al.*, 1998) μπορεί τώρα να μεταφραστεί σε ένα πολύτιμο εξελικτικό συντηρημένο κέντρο που τους εξοπλίζει τα κύτταρα αυτά με τη δυνατότητα μιας εύκολης προσαρμογής στα διαφορετικά περιβάλλοντα.

8. Μελλοντικές Προοπτικές

Ο μελλοντικός προσδιορισμός των ATPase δραστηριοτήτων των διαφόρων Pdr5 μεταλλαγμάτων, παρουσία ή ελλείπει των ξενοβιοτικών υποστρωμάτων CHX, R6G, FLUC, KA και του Pdr5 ανασταλτικού παράγοντα FK506 (Kralli & Yamamoto 1996), θα μας δώσει την ευκαιρία να μάθουμε περισσότερα για τη “συνομιλία” μεταξύ των NBDs και των TMDs, αλλά και να κατανοήσουμε καλύτερα το λειτουργικό ρόλο του κάθε NBD τομέα. Επιπλέον, για μια πιο λεπτομερή ανάλυση των Pdr5 μεταλλαγμάτων, θα αναλυθεί επίσης η μεταφορική δραστηριότητα της R6G. Τέλος, η ενδοκυτταρική συσσώρευση της χρωστικής ουσίας φθορισμού R6G μπορεί να καθοριστεί με χρήση κυτταρομετρίας ροής, που θα αποκαλύψει σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των δοκιμών μεταφοράς R6G τον αντίκτυπο κάθε διενεργηθείσας μεταλλαγής στην αναγνώριση και τη δυνατότητα διακίνησης του παραπάνω υποστρώματος.

9. Ευχαριστίες

Καταρχήν, επιθυμώ να ευχαριστήσω τον Prof. Dr. Lutz Schmitt για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του και για το ρόλο του στην καθιέρωση μιας διμερούς συμφωνίας Erasmus μεταξύ του πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του πανεπιστημίου Heinrich-Heine.

Επιπλέον, ευχαριστώ τον Dr. Κωνσταντίνο Σταθόπουλο για την υποστήριξή του και το ενδιαφέρον του για την καθιέρωση μιας σχέσης Erasmus μεταξύ του πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του πανεπιστημίου Heinrich-Heine.

Οι ιδιαίτερες ευχαριστίες μου πηγαίνουν στην διδακτορικό φοιτήτρια Petra Kueppers. Η βοήθειά της αλλά και πολλές καρποφόρες συζητήσεις σχετικά με τις διάφορες πτυχές αυτής της εργασίας άσκησαν μεγάλη επίδραση στην επιτυχή συμπλήρωση αυτής της διατριβής.

Έπειτα, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω τον διδακτορικό φοιτητή Rakesh Gupta για την υποστήριξη και την καθοδήγησή που πρόσφερε.

Ευχαριστώ, επίσης, ολόκληρη ομάδα ABC για τη φιλοξενία που μου πρόσφεραν, αλλά και για τις καλές στιγμές που είχαμε μαζί κατά την διάρκεια παραμονής μου στην πόλη του Duesseldorf .

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Dr. Μπαλατσό Νικόλαο και Dr. Μόσιαλο Δημήτριο, μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου, καθώς και τους φίλους μου Μαρία Μαλτεζάκη, Αθανασία Μπουλάκου και Θωμά Σπυρίδωνος για την ατέρμονη υποστήριξη και συμπαράστασή τους.

10. Αναφορές

Abou Elela S, Nazar RN. Role of the 5.8S rRNA in ribosome translocation. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:1788–1794. doi: 10.1093/nar/25.9.1788.

Aleksandrov, L., Aleksandrov, A. A., Chang, X. B., and Riordan, J. R. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 15419–15425

Balzi, E. & Goffeau, A. (1994) Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1187: 152–162.

Bauer, B.E., Wolfger, H., Kuchler, K. (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim Biophys Acta* 1461: 217–236.

Bissinger, P.H., and Kuchler, K. (1994). Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* STS1 gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *J. Biol. Chem.* 269, 4180–4186.

Bruce Rogers, Anabelle Decottignies, Marcin Kolaczowski , Elvira Carvajal, Elisabetta Balzi, André Goffeau (2001). The Pleiotropic Drug ABC Transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* : 207-214.

Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., and Roninson, I.B. (1986). Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the MDR1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47, 381–9.

Chen, J., Lu, G., Lin, J., Davidson, A.L., and Quijcho, F.A. (2003). A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell* 12, 651–661.

Chris van der Does and Robert Tampe', How do ABC transporters drive transport? *Biol. Chem.*, Vol. 385, pp. 927–933, October 2004.

Christine Oswald . I. Barry Holland . Lutz Schmitt (2006). The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372: 385–399.

Diederichs, K., Diez, J., Grell, G., Müller, C., Breed, J., Schnell, C. Vonrhein, C., Boos, W., and Welte, W. (2000). Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J.* 19, 5951–5961

Ernst R., Kueppers P., Klein C. M., Schwarzmüller T., Kuchler K., Schmitt Lutz. A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5. *PNAS*, vol. 105, no. 13, 5069-5074.

Ernst R, Klemm R, Schmitt L, Kuchler K (2005) Yeast ATP-binding cassette transporters: Cellular cleaning pumps. *Methods Enzymol* 400:460–484.

- Enger R., Bauer B. E., Karl Kucher (1999). The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Molecular Microbiology*, Volume 35, Issue 5, 1255-1263
- Egner, R., Rosenthal, F.E., Kralli, A., Sanglard, D., Kuchler, K. (1998) Genetic separation of FK506 susceptibility and drug transport in the yeast Pdr5 ATP-binding cassette multidrug resistance transporter. *Mol Biol Cell* 9: 523–543
- Egner, R., Mahé, Y., Pandjaitan, R., Kuchler, K. (1995a) Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15: 5879–5887.
- Gaudet, R., and Wiley, D.C. (2001). Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J.* 20, 4964–4972.
- Gottesman, M.M., Hrycyna, C.A., Schoenlein, P.V., Germann, U.A., and Pastan, I. (1995). Genetic analysis of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Genet.* 29, 607–649.
- Groeger W, Koster W (1998) Transmembrane topology of the two FhuB domains representing the hydrophobic components of bacterial ABC transporters involved in the uptake of siderophores, haem and vitamin B-12. *Microbiology-Sgm* 144:2759–2769.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113.
- Hiroshi Nikaido (2002). How are the ABC transporters energized? *PNAS*, vol. 99, no. 15 _ 9609–9610
- Holland IB, Schmitt L, Young J (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (Review). *Mol Membr Biol* 22:29–39
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P., and Tainer, J.A. (2000). Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA doublestrand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101, 789–800.
- Horn C, Bremer E, Schmitt L (2003) Nucleotide dependent monomer/dimer equilibrium of OpuAA, the nucleotide-binding protein of the osmotically regulated ABC transporter OpuA from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 334:403–419.
- Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Germann, U. A., Cheng, P. W., Pastan, I., and Gottesman, M. M. (1999) *Biochemistry* 38, 13887–13899
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F., and Kim, S.H. (1998). Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 396, 703–707.
- Kane, S.E. (1996). Multidrug resistance of cancer cells. In: *Advances in Drug Research*, vol. 28, eds. B. Testa and U.A. Meyer, San Diego: Academic Press, 181–252.

- Karpowich, N., Martsinkevich, O., Millen, L., Yuan, Y.R., Dai, P.L., MacVey, K., Thomas, P.J., and Hunt, J.F. (2001). Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure* 9, 571–586.
- Klein I, Sarkadi B, Varadi A: An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1461: 405-419.
- Kolaczowski, M., van der Rest, M., Cybularz-Kolaczowska, 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.* 271, 31543–31548.
- Kralli, A., Bohen, S.P., and Yamamoto, K.R. (1995). LEM1, an ATPbinding cassette transporter, selectively modulates the biological potency of steroid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92, 4701–4705.
- Kralli A., and Yamamoto, K. R. (1996). An FK506- sensitive transporter selectively decreases intracellular levels an potency of steroid hormones. *J. Biol Chem.* 271, 17152-17156.
- Lewis, H.A., Buchanan, S.G., Burley, S.K., Connors, K., Dickey, M., Dorwart, M. et al. (2004). Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.* 23, 282–293.
- Locher KP, Lee AT, Rees DC: The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 2002, 296:1091-1098.
- Loo, T.W. & Clarke, D.M. (1996) Inhibition of oxidative cross-linking between engineered cysteine residues at positions 332 in predicted transmembrane segments (TM) 6 and 975 in predicted TM12 of human P-glycoprotein by drug substrates. *J Biol Chem* 271: 27482–27487.
- Loo, T.W. & Clarke, D.M. (1997a) Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein requires movement between transmembrane segments 6 and 12. *J Biol Chem* 272: 20986–20989.
- Loo, T.W. & Clarke, D.M. (1997b) Identification of residues in the drug-binding site of human P-glycoprotein using a thiol-reactive substrate. *J Biol Chem* 272: 31945–31948.
- Lyman, C. A., and T. J. Walsh. 1992. Systemically administered antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. *Drugs.* 44:9-35.
- Marriott, M. S., and K. Richardson. 1987. The discovery and mode of action of fluconazole, p. 81-92. In R. A. Fromtling (ed.), *Recent trends in the discovery, development, and evaluation of antifungal agents.* J. R. Prous Science Publishers, Barcelona.
- Mechetner, E.B., Schott, B., Morse, B.S., Stein, W.D., Druley, T., Davis, K.A., et al. (1997) P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12908–12913.
- Odds, F. C., S. L. Cheesman, and A. B. Abbott. 1986. Antifungal effects of fluconazole (UK 49858), a new triazole antifungal, in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 18:473-478

- Prasad, R., Dewergifosse, P., Goffeau, A., Balzi, E. (1995) Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Curr Genet* 27: 320–329.
- Proff, C., and Kolling, R. (2001) *Mol. Gen. Genet.* 264, 883–893.
- Ralf Egner, Friederike E. Rosenthal, Anastasia Kralli, Dominique Sanglard, Karl Kuchler (1998). Genetic Separation of FK506 Susceptibility and Drug Transport in the Yeast Pdr5 ATP-binding Cassette Multidrug Resistance Transporter, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 9, 523–543.
- Sanglard D (2002) Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol* 5:379–385.
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M., Bille, J. (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2300–2305.
- Sanglard, D., Ischer, F., Monod, M., Bille, J. (1997) Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143: 405–416.
- Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M., Bille, J. (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2378–2386.
- Sanglard, D., Kuchler, K., Ischer, F., Pagani, J.L., Monod, M., Bille, J. (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2378–2386.
- Slavin, M., J. Fastenau, I. Sukaron, P. Mavros, S. Crowley and W. C. Gerth. 2004. Burden of hospitalization of patients with *Candida* and *Aspergillus* infections in Australia. *Int. J. Infect Dis.* 8: 111-120.
- Sarah MacPherson,, Marc Larochelle, and Bernard Turcotte (2006). A Fungal Family of Transcriptional Regulators: the Zinc Cluster Proteins, *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, p. 583–604 Vol. 70, No. 3
- Schmitt L, Benabdelhak H, Blight MA, Holland IB, Stubbs MT (2003) Crystal structure of the nucleotide binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: Identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol* 330:333–342.
- Schmitt L, Tampe´ R (2002) Structure and mechanism of ABC-transporters. *Cur Opin Struc Biol* 12:754–760.
- Senior, A. E., and Gadsby, D. C. (1997) *Semin. Cancer Biol.* 8, 143–150.
- Shigefumi Maesaki, Patrick Marichal, Hugo Vanden Bossche, Dominique Sanglard and Shigeru Kohno, Rhodamine 6G efflux for the detection of *CDR1*-overexpressing azole-resistant *Candida albicans* strains, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1999) 44, 27-31.

Takada, Y., Yamada, K., Taguchi, Y., Kino, K., Matsuo, M., Tucker, S. J., Komano, T., Amachi, T., and Ueda, K. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* 1373, 131–136

Thakur, J. K. et al. *Nature* 452, 604–609 (2008).

Ueda, K., Taguchi, Y., Morishima, M. (1997) How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin Cancer Biol* 8: 151–159.

Verdon, G., Albers, S.V., Dijkstra, B.W., Driessen, A.J.M., and Thunnissen, A.M. (2003a). Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus*: nucleotide-free and nucleotide-bound conformations. *J. Mol. Biol.* 330, 343–358.

van Veen, H. W., Higgins, C. F., and Konings, W. N. (2001) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 185–192.

Vetter IR, Wittinghofer A (1999) Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. *Q Rev Biophys* 32:1–56.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (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* 1:945–951.

Wang, G., Pincheira, R., Zhang, M., Zhang, J.T. (1997) Conformational changes of P-glycoprotein by nucleotide binding. *Biochem J* 328: 897–904.

Yuan, Y.R., Blecker, S., Martsinkevich, O., Millen, L., Thomas, P.J., and Hunt, J.F. (2001). The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J. Biol. Chem.* 276, 32313–32321.

Zaitseva J, Zhang H, Binnie RA, Hermodson M (1996) The proteins encoded by the rbs operon of *Escherichia coli*: II. Use of chimeric protein constructs to isolate and characterize RbsC. *Protein Sci* 5:1100–1107.

Zaitseva J, Jenewein S, Jumpertz T, Holland IB, Schmitt L (2005) H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *Embo J.* vol. 24, NO 11, 1901–1910.

11. Βιβλιογραφία

Alberts, Bruce, et al. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Publishing, 2000.

Lodish, Harvey, et al. *Molecular Cell Biology*, 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2000.

Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis t. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989.

© Original Artist
Reproduction rights obtainable from
www.CartoonStock.com



search ID: cts0051

