

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ** ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ 0.0

## Μεταπτυχιακή Μελέτη

0300

Μελέτη του ρόλου ABC μεταφορέων στην ανθεκτικότητα του Saccharomyces cerevisiae σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα με εφαρμογή προηγμένων μεθόδων μεταβολομικής



## Δήμητρα Α. Καραμάνου

**AOHNA 2018** 

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Αλιφέρης, Λέκτορας

## ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Μεταπτυχιακή Μελέτη

## Μελέτη του ρόλου ABC μεταφορέων στην ανθεκτικότητα του Saccharomyces cerevisiae σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα με εφαρμογή προηγμένων μεθόδων μεταβολομικής

## Δήμητρα Α. Καραμάνου

### AOHNA 2018

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Αλιφέρης, Λέκτορας

## ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ & ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Μεταπτυχιακή Μελέτη

## Μελέτη του ρόλου ABC μεταφορέων στην ανθεκτικότητα του Saccharomyces cerevisiae σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα με εφαρμογή προηγμένων μεθόδων μεταβολομικής

Δήμητρα Α. Καραμάνου

## AOHNA 2018

#### Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Κωνσταντίνος Αλιφέρης, Λέκτορας (Επιβλέπων)

Ιωάννης Βόντας, Καθηγητής (Μέλος)

Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Καθηγητής (Μέλος)

### Περίληψη

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που αντιμετωπίζει ο αγροδιατροφικός τομέας είναι η μειωμένη αποτελεσματικότητα πολλών Φ.Π. λόγω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας φυτοπαθογόνων οργανισμών, εντόμων και ζιζανίων σε αυτά. Ανάμεσα στους μηχανισμούς με τους οποίους οι οργανισμοί αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε Φ.Π., αυτός της αυξημένης απέκκρισης μέσω ABC πρωτεϊνικών μεταφορέων δ.ο. με διαφορετικό μηχανισμό δράσης, παρουσιάζει αυξημένο ενδιαφέρον για την ερευνητική κοινότητα. Οι τελευταίες εξελίξεις στο τομέα των «ομικών» επιτρέπει πλέον την εις βάθος μελέτη του μεταβολισμού ενός οργανισμού και τις επίδρασης που έχουν σε αυτόν καταπονήσεις. Στα πλαίσια αυτά, χρησιμοποιώντας το σακχαρομύκητα Saccharomyces cerevisiae ως οργανισμό-μοντέλο, σε συνδυασμό με την εφαρμογή προηγμένης μεθόδου μεταβολομικής/βιοπληροφορικής, μελετήθηκε η εμπλοκή του ABC μεταφορέα YCF1, ο οποίος βρίσκεται στα κενοτόπιο των κυττάρων, και του PDR5, ο οποίος βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη, στην ανθεκτικότητά του σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα. Τα αποτελέσματα της GC/EI/MS μεταβολομικής έδειξαν ότι η μέθοδος έχει μεγάλες δυνατότητες στην υψηλής ρυθμό-απόδοσης (high throughput) μελέτη του φαινομένου της ανθεκτικότητας μυκήτων σε μυκητοκτόνα. Από τις δ.ο. που μελετήθηκαν, το τριαζολικό flusilazole, διαπιστώθηκε ότι πιθανόν αποτελεί υπόστρωμα του μεταφορέα YCF1. Με την εφαρμογή GC/EI/MS μεταβολομικής καταγράφηκε η επίδραση του γονοτύπου και της καταπόνησης μετά την εφαρμογή του flusilazole στο μεταβολισμό του S. cerevisiae. Διαπιστώθηκαν διακυμάνσεις στη δραστηριότητα βιοσυνθετικών μεταβολικών οδών συσχετιζόμενων με αντιδράσεις σε καταπονήσεις και ανακαλύφθηκαν αντίστοιχοι μεταβολίτες-βιοσημαντές. Ανάμεσα σε αυτούς οι a,a-trehalose, myo-inositol-1-phosphate, GABA, L-glutamine, alycerol. L-tryptophan, Lphenylalanine, L-tyrosine, phosphate, οι οποίοι πλέον του ρόλου τους στις αντιδράσεις οργανισμών σε καταπονήσεις, λειτουργούν και ως σήματα για την ρύθμιση του μεταβολισμού τους. Από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχουν έρευνες σχετικές με το ρόλο του YCF1 μεταφορέα στην ανθεκτικότητα μυκήτων σε Φ.Π.

Λέξεις κλειδιά: ανθεκτικότητα, αυξημένη απέκκριση, μεταβολομική

## Abstract

Among the major challenges that the agri-food sector is facing, is the reduced efficiency of several Plant Protection Products (PPPs), due to the development of resistant populations of phytopathogens, insects, and weeds. One of the mechanisms that leads to fungicide resistance is the efflux of the active ingredient, which is regulated by ATP-binding cassette transporters (ABC transporters). This mechanism has attracted the interest of researchers during the last two decades. Nonetheless, the latest developments in the so-called "omics" technologies enable the in-depth study of the metabolism of an organism and its fluctuation in response to various stimuli. Within this context, using yeast (Saccharomyces cerevisiae) as model organism, in combination with advanced metabolomics / bioinformatics, the involvement of the ABC transporter YCF1, which is located in the vacuole membrane, and that of the PDR5 transporter, which is imbedded in the cell membrane, in fungicide resistance was studied. The results of GC/EI/MS metabolomics confirmed the robustness of the method and its applicability in the high-throughput study of fungal resistance to fungicides. Amongst the fungicides being studied, flusilazole, which belongs to the azole group of DMIs inhibitors, was discovered as a possible substrate for the YCF1 transporter. Analyses also reviled the effect of genotype and fungicide application on the metabolic profile of S. cerevisiae. Fluctuations in the activity of various biosynthetic metabolic pathways associated with stress responses were recorded and corresponding metabolitesbiomarkers were discovered. Among those, the metabolites  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose, myo-inositol-1-phosphate, GABA, L-glutamine, L-tryptophan, glycerol, Lphenylalanine, L-tyrosine, and phosphate, were the major ones. Such metabolites play various roles in fungal physiology, and among others some of those serve as signaling molecules in metabolism regulation. To the best of our knowledge, this is the first report on the implication of YCF1 on fungal resistance to PPPs.

Key words: resistance, increased efflux, metabolomics

## Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Συντομογραφίες	15
1. Εισαγωγή	17
1.1 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.): Σημασία τους, εφαρμογή στη γεωργική πρακτικ σύγχρονες προκλήσεις	ή και 19
1.1.1. Μυκητοκτόνα	21
1.2.Ανθεκτικότητα μικροοργανισμών σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.)	26
1.2.1. Ανθεκτικότητα: ανάπτυξη και τύποι	26
1.2.2. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας μυκητοκτόνων	27
1.2.3. Ανθεκτικότητα φυτοπαθογόνων μυκήτων αγρού σε μυκητοκτόνα: Επισκόπησι παρούσα κατάσταση	ן και 29
1.2.4. Μηχανισμός αυξημένης απέκκρισης	30
1.3. ATP-binding Cassette (ABC) μεταφορείς	32
1.3.1.Εισαγωγή	32
1.3.2. ABC exporters: Δομή και λειτουργία	33
1.3.3. Ασθένειες και εμφάνιση ανθεκτικότητας λόγω ABC μεταφορέων	36
1.4. Ο σακχαρομύκητας Saccharomyces cerevisiae	39
1.4.1 Ιστορική αναδρομή	39
1.4.2. Saccharomyces cerevisiae: Πρότυπος οργανισμός για την έρευνα στη βιοτεχνολογ	ία 41
1.4.3. Γονότυπος και φυσιολογία	43
1.4.4. Βιολογικός κύκλος και ανάπτυξη	47
1.4.5. ATP-binding Cassette μεταφορείς που περιέχονται στα κύτταρα του σακχαρομύ	κητα 49
1.4.7. Εργαλεία βιοπληροφορικής (bioinformatics) για «ομικές» αναλύσεις Yeast	56
1.5. Μεταβολομική	57
1.5.1. Έννοια της μεταβολομικής ανάλυσης	57
1.5.2. Μεταβολομική ανάλυση: Αναλυτικά μηχανήματα και βιοπληροφορική ανάλυση	58
2. Σκοπός της μελέτης	61
3. Υλικά και μέθοδοι	65
3.1. Χημικά και αντιδραστήρια	67
3.2. Βιολογικό υλικό	67
3.3. Δομές δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και συσχέτισή τους	69

3.4. Θρεπτικά υποστρώματα για την καλλιέργεια του αγρίου και μεταλλαγμένων στελεχών του Saccharomyces cerevisiae
3.4.1. Θρεπτικό υπόστρωμα Yeast extract Peptone (YPD)
3.4.2.Θρεπτικό υπόστρωμα Standard Minimal (SD)71
3.5. Μέτρηση της πυκνότητας καλλιεργειών κυττάρων του Saccharomyces cerevisiae με χρήση αιματοκυττόμετρου
3.6. Μέτρησης οπτικής πυκνότητας καλλιεργειών κυττάρων του Saccharomyces cerevisiae με χρήση φασματοφωτόμετρου
<ol> <li>3.7. Αξιολόγηση της ζωτικότητας κυττάρων του Saccharomyces cerevisiae χρησιμοποιώντας μπλε του μεθυλενίου</li></ol>
3.8. Διατήρηση στελεχών του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3.8.1. Μικρής διάρκειας διατήρηση74
3.8.2. Μακράς διάρκειας διατήρηση75
3.9. Προετοιμασία καλλιεργειών για τη μελέτη της ευαισθησίας των στελεχών στα επιλεγμένα μυκητοκτόνα και τα πειράματα μεταβολομικής
3.10.Συσχέτιση της πυκνότητας υγρών καλλιεργειών του Saccharomyces cerevisiae με την οπτική τους πυκνότητα
3.11. Μελέτη ρυθμού ανάπτυξης υγρών καλλιεργειών των στελεχών του Saccharomyces cerevisiae
3.12. Αξιολόγηση ευαισθησίας των στελεχών pURA3 και pURA3-YCF1 του Saccharomyces cerevisiae σε μυκητοκτόνα
3.13. Αξιολόγηση ευαισθησίας του αγρίου (Wt) και μεταλλαγμένων στελεχών Δycf1, Δpdr5 του Saccharomyces cerevisiae στο cycloheximide
3.14. Αξιολόγηση ευαισθησίας του αγρίου (Wt) και μεταλλαγμένων στελεχών Δycf1, Δpdr5 του Saccharomyces cerevisiae σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα
3.15. Προσδιορισμός της δόσης μέσης παρεμπόδισης (EC <sub>50</sub> ) του τριαζολικού μυκητοκτόνου flusilazole στο Saccharomyces cerevisiae
3.16. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πρωτόκολλου εκχύλισης του ενδο-μεταβολόματος (endo- metabolome) του Saccharomyces cerevisiae
3.17. Μεταβολομική ανάλυση των στελεχών Wt και Δycf1 του Saccharomyces cerevisiae παρουσία και απουσία flusilazole
3.17.1.Πειραματικός σχεδιασμός
3.17.2. Παράμετροι αναλύσεων
3.17.3. Ανάλυση των μεταβολικών προφίλ ενδο-μεταβολόματος στελεχών του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και ταυτοποίηση μεταβολιτών
3.17.4. Κατασκευή ανοιχτής πρόσβασης βάσης μεταβολιτών του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 

3.17.5. Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση και ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του flusilazole στο μεταβολισμό στελεχών του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 90
4.Αποτελέσματα και συζήτηση93
4.1 Απεικόνιση χημικών δομών δραστικών ουσιών και μελέτη ομοιότητας τους
4.2. Καμπύλη συσχέτισης αριθμού κυττάρων του <i>Saccharomyce cerevisiae</i> και οπτικής πυκνότητας των υγρών καλλιεργειών του97
4.3. Ευαισθησία των στελεχών pURA3 και pURA3-YCF1 του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα
4.4. Ευαισθησία του αγρίου στελέχους (Wt) του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και των μεταλλαγμένων στελεχών Δycf1, Δpdr5, στο cycloheximide
4.5. Ευαισθησία του αγρίου στελέχους (Wt) του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> και των μεταλλαγμένων στελεχών Δycf1, Δpdr5 σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα
4.6. Το μυκητοκτόνο flusilazole παρουσιάζει υψηλή βιοδραστικότητα στο Saccharomyces cerevisiae
4.7. Ανάλυση μεταβολικού προφίλ του <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4.8. Επίδραση του μυκητοκτόνου flusilazole στο μεταβολισμό του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 108
4.8.1. Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης στελεχών του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> παρουσία ή απουσία του μυκητοκτόνου flusilazole
4.8.2. Η επέμβαση με το μυκητοκτόνο flusilazole είχε σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό του αγρίου (Wt) και του μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : μεταβολίτες-βιοσημαντές112
4.8.3. Συγκριτικές μεταβολικές διαφορές μεταξύ του αγρίου (Wt) και του μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 του <i>Saccharomyces cerevisiae</i> παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole: μεταβολίτες-βιοσημαντές119
4.8.4. Επίδραση της αντικατάστασης του γονιδίου YCF1 στο μεταβολισμό του <i>Saccharomyces cerevisiae:</i> μεταβολίτες-βιοσημαντές
4.8.5. Ρόλος επιλεγμένων μεταβολιτών-βιοσημαντων της επίδρασης του flusilazole και της αντικατάστασης του γονιδίου YCF1 στο μεταβολισμό και φυσιολογία του <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>
5. Συμπεράσματα
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Παράρτημα
Παράρτημα Α
Παράρτημα Β

#### Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου μελέτης, Λέκτορα κ. Κωνσταντίνο Αλιφέρη, για την βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού, υλοποίησης και συγγραφής της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Θα ήθελα να επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Βόντα, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Γεωργικής Φαρμακολογίας και κ. Επαμεινώνδα Παπλωματά, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυτοπαθολογίας, για την συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή, καθώς και για τον χρόνο που διέθεσαν, τις παρατηρήσεις και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Επίσης, θα ήθελα να ήθελαν να ευχαριστήσω τον Υποψήφιο Διδάκτορα κ. Ιωάννη Καλαμπόκη για τη βοήθεια που μου προσέφερε καθώς και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Ελευθερία Φωτοπούλου για τη συμπαράσταση στις δυσκολίες του μεταπτυχιακού.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω προς την καλή φίλη και Υποψήφια Διδάκτωρα Μάιρα Λυκογιάννη για την ενθάρρυνση και την υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ευχαριστώ ακόμα όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για το άριστο κλίμα συνεργασίας που δημιούργησαν και τη στήριξη που παρείχαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την υποστήριξή τους.

#### Δήμητρα Καραμάνου

"The first principle is that you must not fool yourself and you are the easiest person to fool." Richard Feynman

## Συντομογραφίες

ABC	ATP-binding Cassette
ATP	Adenosine Triphosphate
DMIs	Demethylation Inhibitors
FRAC	Fungicide Resistance Action Committee
FTM extraction	Freezing-Thawing in Methanol Extraction
GC	Gas Chromatography
GTP	Guanosine Triphosphate
ICL	Intracellular Loops
Kegg	Kyoto encyclopedia of Genes and Genomes
LC	Liquid Chromatography
MDR	Multidrug Resistance
MDS	MultiDimensional Scaling
MFS	Major facilitation Superfamily
MS	Mass Spectrometry
MSD	Membrane Spanning Domain
NBD	Nucleotide Binding Domains
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OPLS-DA	Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis
PBS	Phosphate-buffered saline
PDR	Pleiotropic drug resistance
PDR5	Pleiotropic drug resistance 5 transporter
PLS	Partial Least Squares
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis
pURA3	trp1 leu2 ura3 his4 can1 ∆ycf1 [2µ URA3]
pURA3-YCF1	trp1 leu2 ura3 his4 can1 Δycf1 [2μ URA3 YCF1]
Qi	Quinone inside inhibitors
Qo	Quinone outside inhibitors
rpm	revolutions per minute
SBIs	Sterol Biosynthesis Inhibitors
SD	Standard minimal

Standard minimal agar
Succinate Dehydrogenase Complex Inhibitors
Tanimoto Coefficient
Transmembrane Domain
Time of Flight
Wild type
Yeast Cadmium Factor 1 transporter
Yeast Extract Peptone Dextrose
Yeast Extract Peptone Dextrose agar
his3 leu2 met15 ura3 pdr5∆∷KAN
his3 leu2 met15 ura3 YCF1::KanMX
δραστική ουσία
Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα

1. Εισαγωγή

# 1.1 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.): Σημασία τους, εφαρμογή στη γεωργική πρακτική και σύγχρονες προκλήσεις

Η παραγωγή γεωργικών προϊόντων στηρίζεται στη χρήση **φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Φ.Π.)**, ώστε το τελικό προϊόν να είναι ασφαλές για τον καταναλωτή και ταυτόχρονα η παραγόμενη ποσότητα να είναι επαρκής και το κόστος παραγωγής χαμηλό. Οι απώλειες γεωργικών προϊόντων από φυτοπαθογόνους μύκητες, ζιζάνια, εντομολογικούς εχθρούς και ιούς, διαφέρει ανάλογα την καλλιέργεια και τη γεωγραφική περιοχή στην οποία πραγματοποιείται, και μπορεί να φτάσει έως και το 80% (Oerke, 2006).

Μέσω της εφαρμογής ολοκληρωμένων στρατηγικών φυτοπροστασίας (Wezel et al., 2014, Lamichhane et al., 2016, Bernard and Lux, 2017), είναι δυνατή η αντιμετώπιση φυτοπαθογόνων οργανισμών, εντομολογικών εχθρών και ζιζανίων με ταυτόχρονη προστασία του περιβάλλοντος, των οργανισμών μη-στόχων και των καταναλωτών (Lamichhane et al., 2016, Bonner and Alavanja, 2017)

Σύμφωνα με τη Eurostat (http://ec.europa.eu/eurostat), στην Ε.Ε. το 2014 πωλήθηκαν σχεδόν 396.000 τόνοι Φ.Π., η πλειονότητα των οποίων αποτελούσαν μυκητοκτόνα, βακτηριοκτόνα και ζιζανιοκτόνα (*Εικόνα 1*). Το οπλοστάσιο όμως της χημικής καταπολέμησης έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία 20 χρόνια, λόγω των αναθεωρήσεων των κανονισμών της Ε.Ε. σχετικών με την έγκριση και κυκλοφορία Φ.Π. (Lamichhane et al., 2016). Η μείωση των διαθέσιμων δραστικών ουσιών (δ.ο.) συνεχίζεται, όπως για παράδειγμα με την πιθανή απαγόρευση μυκητοκτόνων της ομάδας των αζολών (azoles) από την Ε.Ε. (Hillocks, 2012, Matthiessen and Weltje, 2015), ενώ ο αριθμός των υπό εξέταση δ.ο. για έγκριση χρήσης των τριών κύριων κατηγοριών Φ.Π., είναι πολύ μικρός (*Εικόνα 2*). Ταυτόχρονα, η παγκόσμια ζήτηση για γεωργικά προϊόντα αυξάνεται, ωθούμενη κυρίως από τη ραγδαία αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού. Μέχρι το 2050, έχει υπολογιστεί πως θα αυξηθεί η ζήτηση γεωργικών προϊόντων κατά 30% σε παγκόσμιο επίπεδο, ώστε να καλυφθούν οι αυξανόμενες ανάγκες (Wezel et al., 2014).

Εστιάζοντας στα μυκητοκτόνα και βακτηριοκτόνα, η εφαρμογή τους σε παγκόσμια κλίμακα είναι εκτεταμένη, ιδιαίτερα στις χώρες της Νότιας και Δυτικής Ευρώπη και της Κεντρικής Αμερικής (*Εικόνα 3*) (Liu et al., 2015).



**Εικόνα 1.** Συνολικές πωλήσεις Φ.Π στα 28 κράτη μέλη της Ε.Ε. για το έτος 2014 (http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Pesticide\_sales\_statistics)



#### Εγκεκριμένα = Μη εγκεκριμένα = Εκκρεμούν = Απαγορευμένα

**Εικόνα** 2. Καταγεγραμμένα Φ.Π. στην Ε.Ε. (EU Pesticide Database 2017, http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event= homepage& language=EN).





Εικόνα 3. Παγκόσμια χρήση μυκητοκτόνων και βακτηριοκτόνων (g·ha<sup>-1</sup>) κατά το έτος 2010 (Liu et al., 2015).

#### 1.1.1. Μυκητοκτόνα

Ανάμεσα στους οργανισμούς που προκαλούν σημαντικές απώλειες τόσο προσυλλεκτικά όσο και μετασυλλεκτικά είναι οι μύκητες. Η συστηματική χημική καταπολέμηση τους ξεκίνησε με την εφαρμογή μυκητοκτόνων 1<sup>ης</sup> γενεάς τα οποία περιλαμβάνουν ενώσεις θείου, χαλκού και 2<sup>ης</sup>, διθειοκαρβαμιδικά, κινόνες και φθαλιμίδια, με προστατευτική δράση (Angelini et al., 2015). Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν διασυστηματικά μυκητοκτόνα με θεραπευτική δράση και εκλεκτική τοξικότητα, όπως τα βενζιμιδαζολικά, καρβοξαμιδικά και φαινυλαμίδια τα οποία αποτέλεσαν την 3<sup>η</sup> γενεά μυκητοκτόνων. Η νεώτερη γενεά μυκητοκτόνων (4<sup>η</sup> γενεά), δεν είναι άμεσα τοξική στο παθογόνο αλλά μειώνει την παθογόνο ικανότητα του (π.χ. παρεμποδιστές βιοσύνθεσης μελανίνης) (Takagaki, 2015).

Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται σήμερα στη φυτοπροστασία, μπορούν να διακριθούν σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους σε 14 ομάδες (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC http://www.frac.info/) (FRAC, 2017a).

Οι πολυπληθέστερες ομάδες είναι αυτές των παρεμποδιστών της λειτουργίας της αναπνοής (Group C) και των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών (Group G) (Εικόνα 4). Περιλαμβάνουν πληθώρα δ.ο. και σκευασμάτων πολλά από τα έχουν οποία εισαχθεί πρόσφατα και συμπεριληφθεί σε στρατηγικές φυτοπροστασίας (European Food Safety, 2014, EuropeanCommission, 2015). To ενδιαφέρον της έρευνας και ανάπτυξης μυκητοκτόνων αυτών των ομάδων βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στη βιοδραστικότητά τους, φάσμα δράσης και στις πρότυπες δομές τους. Για τους λόγους αυτούς, παρακάτω αναπτύσσονται με λεπτομέρειες αυτές οι δυο ομάδες.



Εικόνα 4. Κατανομή δ.ο. σύμφωνα με το μηχανισμό δράσης τους (FRAC, 2017a)

### 1.1.1.1.Παρεμποδιστές συστημάτων αναπνοής

Τα μυκητοκτόνα της ομάδας C (Group C), περιλαμβάνουν παρεμποδιστές των συμπλόκων Ι, ΙΙ, και ΙΙΙ της αναπνευστικής αλυσίδας καθώς και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Εικόνα 5). Παρεμποδιστές του συμπλόκου Ι αποτελούν οι δ.ο. diflumetorim, tolfenpyrad, fenzaquin, οι οποίες δρουν μεταξύ του ανηγμένου NADH και του συνενζύμου Q (Aliferis and Jabaji, 2011, FRAC, 2017a).



**Εικόνα 5.** Κυτοχρωμική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Kegg, http://www.genome.jp/kegg-bin/show\_pathway?map00190).





Οι παρεμποδιστές του συμπλόκου ΙΙ ή αλλιώς παρεμποδιστές του ενζυμικού συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (Succinate Dehydrogenase Inhibitors, SDHIs), αποτελούν την πολυπληθέστερη υποομάδα των παρεμποδιστών συστημάτων αναπνοής (FRAC, 2017a). Παρεμβάλλονται στη ροή

ηλεκτρονίων μεταξύ του συμπλόκου αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (Succinate Dehydrogenase, SDH), και του συνενζύμου Q, με αποτελέσματα την συσσώρευση ηλεκτρικού οξέος και τη παρεμπόδιση του κύκλου Krebs. Το νεότερο μέλος της υποομάδας είναι το benzovindiflupyr (συνώνυμο Solatenol) της εταιρίας Syngenta Crop Protection (*Εικόνα* 6) (Guicherit et al., 2014). Πρόκειται για διασυστηματικό μυκητοκτόνο με μεγάλο εύρος δράσης (φουζικλάδιο, αλτερνάρια, ανθρακώσεις, σκωριάσεις κ.α.). Στην Ε.Ε., έχει έγκριση μόνο εναντίον σκωριάσεων σε σιτηρά, ενώ στην Ελλάδα αναμένεται η έγκριση του (EuropeanCommission, 2015).

Οι παρεμποδιστές του συμπλόκου ΙΙΙ είτε δρουν στο κέντρο οξείδωσης της ουμπικονόλης (Quinone outside inhibitors, Qo), όπως η στρομπιλουρίνη azoxystrobin, το μεθοξυκαραβαμιδικό pyractostrobin και η αζόλη famoxadone, είτε στο κέντρο αναγωγής της ουμπικινόνης (Quinone inside inhibitors, Qi), όπως το fenpricoxamid (FRAC, 2017a). Τέλος, η ομάδα C περιλαμβάνει τους παρεμποδιστές της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Group C6) και δ.ο. που προκαλούν απόζευξη (uncoupling) της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο κυτοχρωμικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Group C5).

# 1.1.1.2. Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών στις κυτταρικές μεμβράνες

Οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης στερολών (Sterol biosynthesis inhibitors, SBIs), χωρίζονται σε τέσσερις τάξεις (FRAC, 2017a). Η πρώτη, αποτελείται από τους παρεμποδιστές απομεθυλίωσης του άνθρακα 14 (Demethylation Inhibitors, DMIs) (*Εικόνα 7*), όπως η ιμιδαζόλη prochloraz και το τριαζολικό flusilazole. Τη δεύτερη τάξη αποτελούν τα μορφολινικά, τα οποία παρεμποδίζουν την αναγωγή του διπλού δεσμού Δ<sup>14</sup> και τη μετατόπιση του διπλού δεσμού από τη θέση Δ<sup>8,9</sup> στη θέση Δ<sup>8,7</sup> (*Εικόνα 7*) (Ζιώγας and Μαρκόγλου, 2010), χαρακτηριστικά παραδείγματα των οποίων είναι οι δ.ο. fenpropimorph και spriroxamine. Στην 3<sup>η</sup> τάξη περιλαμβάνονται η υδροξυανιλίνη fenhexamid και η αμινο-πυραζολινόνη fenpyrazamine, που δρουν στη απομεθυλίωση του άνθρακα 4 (*Εικόνα 7*). Η 4<sup>η</sup>

τάξη των SBIs περιλαμβάνει το θειο-καραβαμιδικό pyributicarb και τη αλυλαμίνη terbinafine (FRAC, 2017a). Η χημικές δομές επιλεγμένων παρεμποδιστών βιοσύνθεσης εργοστερόλης παρουσιάζονται στην *Εικόνα 8*.

Η συνεχής άσκηση πίεσης επιλογής στους πληθυσμούς των φυτοπαθογόνων μυκήτων μέσω της εφαρμογής μυκητοκτόνων με τον ίδιο μηχανισμό δράσης, οδηγεί στην εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών στον αγρό και κατά επέκταση τη μείωση της αποτελεσματικότητας των μυκητοκτόνων. Για τη διαχείριση των ανθεκτικών πληθυσμών καθώς και για την καλύτερη κατανόηση του φαινομένου είναι απαραίτητη η μελέτη της ανθεκτικότητας και των μηχανισμών που την προκαλούν.



**Εικόνα 7**. Βιοχημικό μονοπάτι βιοσύνθεσης εργοστερόλης και αντίστοιχα σημεία δράσης μυκητοκτόνων που ανήκουν των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών (SBIs) (Ziogas and Malandrakis, 2015).



Εικόνα 8. Χημική δομή επιλεγμένων δ.ο. που ανήκουν στην ομάδα των παρεμποδιστών βιοσύνθεσης στερολών (SBIs)

## 1.2.Ανθεκτικότητα μικροοργανισμών σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Φ.Π.)

#### 1.2.1. Ανθεκτικότητα: ανάπτυξη και τύποι

Η ανθεκτικότητα ορίζεται ως «η σταθερή και κληρονομούμενη στους απογόνους προσαρμογή στην παρουσία μιας αντιμικροβιακής ένωσης που έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ευαισθησίας του πληθυσμού στο συγκεκριμένο παρεμποδιστή» (FRAC). Η εμφάνιση ανθεκτικών πληθυσμών φυτοπαθογόνων μυκήτων, επηρεάζεται από βιοχημικούς, επιδημιολογικούς και γενετικούς παράγοντες, όπως η γονοτυπική σύσταση (π.χ. ύπαρξη μηχανισμών ανθεκτικότητας), ο βιολογικός κύκλος του παθογόνου και η συχνότητα μεταλλαγών και από βιοχημικούς, φυσικοχημικούς παράγοντες της δ.ο. καθώς και από χαρακτηριστικά της εφαρμογής του μυκητοκτόνου (π.χ. αλληλεπίδραση με το μεταβολισμό του οργανισμού-στόχου, σταθερότητα της δ.ο., τυποποίηση) (Hollomon, 2015). Σύμφωνα με στοιχεία της FRAC, περισσότερες από 440 περιπτώσεις ανθεκτικότητας έχουν καταγραφεί στο σύνολο των φυτοπαθογόνων μυκήτων, σε πληθυσμούς αγρού και εργαστηριακά στελέχη (FRAC, 2017b).

Η ανθεκτικότητα διακρίνεται σε διασταυρωτή (cross resistance), η οποία αφορά την ανθεκτικότητα που καταγράφεται για δ.ο. που εμφανίζουν τον ίδιο

μηχανισμό δράσης, και **πολλαπλή** (Multidrug Resistance, MDR), η οποία αναφέρεται σε μυκητοκτόνα με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης και σχετίζεται με πρωτεϊνικούς μεταφορείς που εξάγουν τοξικές ουσίες από τα κύτταρα των οργανισμών (Hollomon, 2015).

Από γενετική σκοπιά, η εμφάνιση ανθεκτικότητας εξαρτάται από τον αριθμό των γονιδιακών τόπων (loci) που σχετίζονται με τη δ.ο., τον αριθμό των παραλλαγών των αλληλογράφων (allelic variants) σε κάθε τόπο, από την προσθετική ή συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των γόνων ανθεκτικότητας και τέλος από το αν οι αλληλουχίες μεταξύ ανθεκτικών και αγρίων στελεχών είναι κυρίαρχες ή υπολειπόμενες (Angelini et al., 2015).

Σε σχέση με το γενετικό της έλεγχο, η ανθεκτικότητα που οφείλεται σε μεταλλαγή ενός μόνο γονιδίου ονομάζεται **ανθεκτικότητα μειζόνων γόνων** (ή ολιγονική) και σχετίζεται με μυκητοκτόνα με εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης. Ως αποτέλεσμα, το επίπεδο ανθεκτικότητας που παρουσιάζει χαρακτηρίζεται ως υψηλό. Αντίθετα, η **πολυγονική ανθεκτικότητα** οφείλεται στην προσθετική δράση των μεταλλαγών και σχετίζεται με μυκητοκτόνα με πολλαπλό μηχανισμό δράσης και μικρό επίπεδο ανθεκτικότητας (Angelini et al., 2015). Συνήθως, η εμφάνιση ανθεκτικότητας συνοδεύεται με μείωση των παραμέτρων προσαρμοστικότητας (fitness cost) του φυτοπαθογόνου μύκητα, όπως η παραγωγή κονιδίων, ο ρυθμός μυκηλιακής αύξησης και η ανταγωνιστικότητα μεταξύ στελεχών. Η μείωση αυτών των παραμέτρων στα ανθεκτικά στελέχη δεν αποτελεί κανόνα, αφού έχουν καταγράφει ανθεκτικά στελέχη αγρού που δεν υπολείπονται των αγρίων σε προσαρμοστικότητα (Mikaberidze and McDonald, 2015).

#### 1.2.2. Μηχανισμοί ανθεκτικότητας μυκητοκτόνων

Οι πληθυσμοί των φυτοπαθογόνων μυκήτων βρίσκονται συνέχεια υπό την πίεση επιλογής από τα εφαρμοζόμενα μυκητοκτόνα. Τα στελέχη που επιβιώνουν της εφαρμογής παρουσιάζουν ανθεκτικότητα, λόγω της γενετικής τους παραλλακτικότητας και των βιοχημικών μηχανισμών που επιστρατεύουν για να

επιβιώσουν. Εν συντομία, οι κύριοι μηχανισμοί ανθεκτικότητας σύμφωνα με τη FRAC είναι τέσσερις:

#### i. Αλλαγή στη θέση δράσης του μυκητοκτόνου

Μεταλλαγές που επηρεάζουν την δομή της πρωτεΐνης-στόχου οδηγούν στη μείωση της συγγένειας (affinity) μεταξύ δ.ο. και στόχου και ως αποτέλεσμα μειώνεται, συχνά σημαντικά, η αποτελεσματικότητα της δ.ο.

#### ii. Αποτοξικοποίηση του μυκητοκτόνου

Μεταβολίτες του παθογόνου μπορούν να αλλάξουν τη δομή της δ.ο. και να μειώσουν την τοξικότητα της ή στην περίπτωση των μυκητοκτόνων που εφαρμόζονται σε μη τοξική μορφή, παρατηρείται μη-ενεργοποίηση της δ.ο.

#### iii. Υπερέκφραση του στόχου

Λόγω της καταπόνησης που βρίσκονται τα κύτταρα του παθογόνου υπό την επίδραση ενός μυκητοκτόνου, είναι δυνατό να υπερεκφράσουν το βιοχημικό στόχο σε βαθμό που καθιστά δυνατή τη διατήρηση στοιχειώδους μεταβολικής λειτουργίας και ως αποτέλεσμα την επιβίωση του οργανισμού.

#### iv. Απέκκριση ή απομάκρυνση από το στόχο

Μέσω των πρωτεϊνικών μεταφορέων, είναι δυνατή η απομάκρυνση μεγάλης ποσότητας δ.ο. που έχει εισέλθει στο κύτταρο πριν φτάσει στο σημείο δράσης της. Οι πρωτεϊνικοί μεταφορείς απέκκρισης (efflux) μεταφέρουν πληθώρα δ.ο. με μη κοινό μηχανισμό δράση.

Οι παραπάνω μηχανισμοί αποτελούν τους πιο σημαντικούς για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας, αλλά έχουν καταγραφεί και δευτερεύουσας σημασίας, όπως η λειτουργία εναλλακτικών συστημάτων (π.χ. εναλλακτική αναπνοή) και η μειωμένη περατότητα μεμβρανών (π.χ. μεταφορείς που εισάγουν ουσίες, importers) (Ma and Michailides, 2005).

#### 1.2.3. Ανθεκτικότητα φυτοπαθογόνων μυκήτων αγρού σε μυκητοκτόνα: Επισκόπηση και παρούσα κατάσταση

Η μελέτη της ανθεκτικότητας αποτελείται από την καταγραφή και μελέτη των ανθεκτικών στελεχών αγρού και από την ταυτόχρονη μελέτη πιθανών μηχανισμών που θα οδηγήσουν στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο εργαστήριο. Από τη μελέτη στελεχών αγρού είναι η δυνατή η εκτίμηση του προβλήματος της ανθεκτικότητας και η ανακάλυψη των μηχανισμών που ευνοούνται και επιλέγονται στη φύση. Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας που θα καταγραφεί σε στελέχη αγρού έχει άμεση σχέση με το μηχανισμό δράσης του μυκητοκτόνου στο οποίο θα εκτεθεί ο πληθυσμός (Hollomon, 2015).

Η ανθεκτικότητα φυτοπαθογόνων στα βενζιμιδαζολικά ήταν από τις πρώτες που καταγράφηκαν λίγα χρόνια μετά την εισαγωγή τους στα προγράμματα φυτοπροστασίας (Ishii, 2015). Πλέον, πάνω από 100 φυτοπαθογόνοι μύκητες έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα βενζιμιδαζολικά και παρουσιάζουν διασταυρωτή ανθεκτικότητα με άλλα μυκητοκτόνα της ομάδας. Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται σε μεταλλαγές στο γονίδιο στόχο των βενζιμιδαζολικών, τη β-τουμπουλίνη, με συχνότερες τις μεταλλαγές Ε198Α/G/K/Q και F200Y (Young, 2015).

Μετά την εφαρμογή των SDHIs καταγράφηκαν ανθεκτικά στελέχη των φυτοπαθογόνων μυκήτων Botrytis cinerea, Corynespora cassiicola, Alternaria alternate, Alternaria solani, Didymella bryoniae, Podosphaera xanthii και Sclerotinia sclerotiorum στον αγρό, λόγω σημειακών μεταλλαγών στις 3 υπομονάδες της αφυδραγονάσης (Stammler et al., 2015).

Ανθεκτικότητα στις στρομπιλουρίνες, που δρουν στο Σύμπλοκο ΙΙΙ της αναπνευστικής αλυσίδας, έχει καταγραφεί σε πληθυσμούς Ασκομυκήτων, Δευτερομυκήτων και Βασιδιομυκήτων, Ωομυκήτων κυρίως λόγω της μεταλλαγής G143A στο γονίδιο στόχο (*cyt b*) (Sierotzki, 2015).

Από τους SBIs, ανθεκτικότητα έχει αναπτυχθεί στην ομάδα των DMIs με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς. Στελέχη αγρού των *B. cinerea, Penicillium italicum, Penicillium digitatum Oculimacula yallundae, Sclerotinia homeocarpa, Mycosphaerella graminicola, Monilinia fructicola* είναι ανθεκτικά στους DMIs μέσω του μηχανισμού αυξημένης απέκκρισης, ενώ έχει καταγραφεί και ανθεκτικότητα που οφείλεται σε μεταλλαγές στο αμινοξύ Y136 του γονιδίου *cyp51* των μυκήτων

Blumeria graminis f. sp. tritici, Cercospora beticola, Erysiphe necator, Mycosphaerella fijiensis, M. graminicola, Phakopsora pachyrhizi, Puccinia triticina, Pyrenopeziza brassicae (Ziogas and Malandrakis, 2015). Τέλος έχει καταγραφεί υπερέκφραση του γονιδίου στόχου (*cyp51*) λόγω εισαγωγής ενός μεταθετού στοιχείου στη αλληλουχία πριν το γονίδιο (upstream) στους φυτοπαθογόνους μύκητες Blumeriella jaapii, C. beticola, M. fructicola M. graminicola, P. digitatum, P. pachyrhizi, P. triticina P. brassicae, S. homeocarpa, Venturia inaequalis (Ziogas and Malandrakis, 2015).

Στελέχη αγρού του *B. cinerea* και *Botrytis pseudocinerea* έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στους παρεμποδιστές απομεθυλίωσης του C-4 (fenhexamid), που αποτελεί υποομάδα των SBIs, έχοντας μεταλλαγές στο γονίδιο στόχο *erg27* (Debieu and Leroux, 2015).

Με βάση τα παραπάνω, είναι προφανές πως ο κυριότερος μηχανισμός ανθεκτικότητας που απαντάται στον αγρό είναι η αλλαγή στη θέση δράσης και αυτός είναι ο λόγος που έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε πληθώρα φυτοπαθογόνων και δ.ο. Αντίθετα ο μηχανισμός αυξημένης απέκκρισης είναι ακόμα υπό μελέτη καθώς περιλαμβάνει πολύπλοκα βιοχημικά μονοπάτια για την ενεργοποίηση του και η συγγένεια μεταξύ των πρωτεϊνικών μεταφορέων και των δ.ο. που αποτελούν τα υποστρώματα τους, είναι συχνά άγνωστη.

#### 1.2.4. Μηχανισμός αυξημένης απέκκρισης

Οι μεταφορείς που σχετίζονται με τη μεταφορά τοξικών ουσιών δεν απαντώνται με μεγάλη συχνότητα στα κύτταρα, όμως όταν αυτά εκτεθούν σε συνθήκες καταπόνησης, αυξάνεται η έκφρασή τους ως φυσικός μηχανισμός άμυνας του οργανισμού (de Waard et al., 2006).

Η αυξημένη απέκκριση τοξικών ουσιών στα κύτταρα των φυτοπαθογόνων μυκήτων πραγματοποιείται μέσω των ATP-binding Cassette (ABC), και Major Facilitator Superfamily (MFS) πρωτεϊνικών μεταφορέων. Οι ABC είναι οι κύριοι μεταφορείς των κυττάρων με ευρύ φάσμα υποστρωμάτων και λειτουργούν με υδρόλυση μορίων τριφωσφορικής αδενοσίνης (Adenosine Triphosphate, ATP), ενώ οι MFS είναι δευτερεύοντες μεταφορείς και μεταφέρουν μικρότερα μόρια μέσω αντιμεταφοράς πρωτονίων (Perlin et al., 2014).

Τα ανθεκτικά στελέχη με πολλαπλή ανθεκτικότητα παρουσιάζουν αύξηση της έκφρασης των ABC μεταφορέων μέσα στα πρώτα 15 λεπτά της έκθεσης τους στα μυκητοκτόνα, με αποτέλεσμα τη μειωμένη συγκέντρωση της δ.ο. στο εσωτερικό τους σε σχέση με το άγριο στέλεχος (*Εικόνα* 9) και την επιβίωση τους (Hahn and Leroch, 2015).

Τα πρώτα στελέχη με πολλαπλή ανθεκτικότητα που βρέθηκαν σε πληθυσμούς του παθογόνου *B. cinerea* σε αμπελώνες στη Γαλλία, διαχωρίστηκαν σε δυο φαινοτύπους ανθεκτικότητας. Ο φαινότυπος MDR1 (AniR2) παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε ανιλινοπυριμιδίνες (cyprodinil, pyrimethanil) και φαινοπυριλικά (fludioxonil) μυκητοκτόνα. Η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα οφείλεται σε υπερέκφραση του ABC μεταφορέα, AtrB, λόγω σημειακών μεταλλαγών στο μεταγραφικό παράγοντα Mrr1, από τον οποίο ρυθμίζεται η έκφραση του μεταφορέα (Kretschmer et al., 2009). Ο δεύτερος φαινότυπος MDR2 (AniR3), παρουσιάζει χαμηλή ανθεκτικότητα σε ανιλινοπυριμιδίνες. υδροξυανιλιδίνες (fen-



Εικόνα 9. Αντίδραση ευαίσθητων κυττάρων (πάνω) και ανθεκτικών με πολλαπλή ανθεκτικότητα (MDR) (κάτω) στην παρουσία μυκητοκτόνου μετά το πρώτο και το τριακοστό λεπτό από την έκθεση τους σε τοξική ουσία (Hahn and Leroch, 2015).

hexamid), δικαρβοξαμιδικά (iprodione) και παρεμποδιστές της αφυδρογονάσης του συμπλόκου της αφυδρογονάσης του ηλεκτρικού οξέος (boscalid). Αιτία της ανθεκτικότητας, είναι η υπερέκφραση του MFS μεταφορέα mfsM2, λόγω εισαγωγής μεταθετού στοιχείου (retroelement) στον υποκινητή του μεταφορέα (Mernke et al., 2011). Ο τρίτος φαινότυπος MDR3, προήλθε από σύζευξη στελεχών των φαινοτύπων MDR1 και MDR2 και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε όλα τα προαναφερθέντα μυκητοκτόνα.

Στελέχη με MDR φαινότυπο έχουν καταγραφεί και σε Γερμανικούς αμπελώνες, με 21-42 % του πληθυσμού του *B. cinerea* να αποτελείται από MDR1 στελέχη (Leroch et al., 2013). Αξιοσημείωτο είναι πως στα MDR στελέχη, δεν έχει καταγραφεί μείωση των παραμέτρων προσαρμοστικότητας (Hahn and Leroch, 2015).

Από τα παραπάνω είναι αντιληπτό, πως η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στον αγρό είναι ένα σύγχρονο πρόβλημα το οποίο εντείνεται λόγω της μη ορθολογικής χρήσης Φ.Π. Η ανάπτυξη πολλαπλής ανθεκτικότητας στον αγρό μέσω του μηχανισμού αυξημένης απέκκρισης, είναι ένα φαινόμενο που συνεχίζει να δημιουργεί προβλήματα στη φυτοπροστασία και η μελέτη των ABC μεταφορέων που αποτελούν το κύριο βιολογικό κομμάτι του μηχανισμού είναι αναγκαία.

#### 1.3. ATP-binding Cassette (ABC) μεταφορείς

#### 1.3.1.Εισαγωγή

Οι ABC μεταφορείς (ATP-binding Cassette transporters) αποτελούν σημαντικό κομμάτι στη βιολογία των κυττάρων όλων των οργανισμών και τη μεγαλύτερη καταγεγραμμένη οικογένεια πρωτεϊνών (Wilkens, 2015).

Χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τους ABC «εισαγωγείς» (ABC importers) οι οποίοι απαντώνται μόνο στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και τους ABC «εξαγωγείς» (ABC exporters), που απαντώνται σε ευκαρυωτικούς και

προκαρυωτικούς οργανισμούς (ter Beek et al., 2014). Οι ABC εισαγωγείς μεταφέρουν κυρίως υδατοδιαλυτά θρεπτικά συστατικά και οι ABC «εξαγωγείς» μεταφέρουν λιπίδια, λιπαρά οξέα, δ.ο. καθώς και πρωτεΐνες (ter Beek et al., 2014). Και τα δυο είδη μεταφορέων λειτουργούν μέσω της υδρόλυσης μορίων ATP. Η πλευρά που πραγματοποιείται η υδρόλυση ονομάζεται πλευρά cis (cis-side). Εξαίρεση αποτελούν οι μεταφορείς που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες, όπου η αντίδραση της υδρόλυσης πραγματοποιείται στο εσωτερικό της μεμβράνης (ter Beek et al., 2014).

Η μη λειτουργικότητα ABC μεταφορέων σε ανθρώπινα κύτταρα λόγω μεταλλαγών, έχει ως αποτέλεσμα πληθώρα ασθενειών όπως κυστική ίνωση, σύνδρομο Stargardt, νόσος Tangier, κ.ά. (Stefkova et al., 2004, Theodoulou and Kerr, 2015). Αντίθετα, υπερέκφραση των μεταφορέων σε καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, σε αντικαρκινικά φάρμακα (Fletcher et al., 2016) και ανθεκτικότητα σε Φ.Π. στην περίπτωση των φυτοπαθογόνων μυκήτων (de Waard et al., 2006).

#### 1.3.2. ABC exporters: Δομή και λειτουργία

Όπως όλοι οι ABC μεταφορείς, οι ABC «εξαγωγείς» αποτελούνται από την περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (Nucleotide binding Domain, NBD) και την διαμεμβρανική περιοχή (Transmembrane Domain, TMD) (*Εικόνα 10*). Ο αριθμός αυτών των περιοχών ποικίλει ανάλογα με την υποοικογένεια μεταφορέων (ter Beek et al., 2014) και ταυτόχρονα ανά μεταφορέα παρουσιάζονται και άλλες μικρές δομές στο διαμεμβρανικό χώρο ή στις cis και trans περιοχές (Seeger et al., 2016).

Κάθε TMD περιοχή αποτελείται από 6 έως 10, *α*-ελικάσες που διαπερνούν τη μεμβράνη και δημιουργούν έναν πόρο για τη μεταφορά διαφόρων υποστρωμάτων (Wilkens, 2015). Η παραλλακτικότητα της γεωμετρίας του πόρου καθώς και τα πολλαπλά σημεία πρόσδεσης δ.ο. (polyspecificity), δημιουργεί το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων τα οποία μεταφέρονται από τους ABC «εξαγωγείς» (Wilkens, 2015).



**Εικόνα 10.** Γενικευμένη μορφολογία ABC «εξαγωγέων». Στη cis πλευρά της μεμβράνης, όπου γίνεται η υδρόλυση των μορίων ATP, βρίσκονται 2 περιοχές πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (NBD (με μπλε και μοβ χρώμα). Στο εσωτερικό της μεμβράνης, βρίσκονται 2 διαμεμβρανικές περιοχές (TMD) (με κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα) (ter Beek et al., 2014).



Εικόνα 11. Δομή της διμερούς NBD περιοχής της υποοικογένειας ABCB1 όπου διακρίνονται οι επιμέρους δομές (Szöllősi et al., 2017)

Σε αντίθεση, η περιοχή πρόσδεσης νουκλεοτιδίων (NBD) είναι πολύ συντηρημένη και χρησιμοποιείται για το φυλογενετικό διαχωρισμό των μεταφορέων (ter Beek et al., 2014). Κατά τη λειτουργία των μεταφορέων, οι περιοχές NBD συνδέονται με αντίθετο προσανατολισμό και δημιουργείται το διμερές NBD, με 2 θέσεις πρόσδεσης νουκλεοτιδίων, στο οποίο περιέχονται διακριτές περιοχές με ιδιαίτερη δομή και ρόλο για τη λειτουργία του μεταφορέα (Εικόνα 11) (Szöllősi et al., 2017). Οι περιοχές αυτές περιλαμβάνουν τη δομή Aloop που βοηθά στην σωστή τοποθέτηση της ATP, τη δομή Walker A motif που βοηθά στη πρόσδεση φωσφορικού (phosphate), τις δομές Q-loop και X-loop που συνδέουν τις διαμεμβρανικές περιοχές με τις NBD περιοχές, τη δομή C-loop (signature motif), όπου γίνεται ο πρόσδεση του φωσφορικού οξέος (phosphate), τις δομές Walker B motif και H-loop όπου πραγματοποιείται η υδρόλυση της ATP και τη δομή D-loop, η οποία επηρεάζει τη γεωμετρία της θέσης υδρόλυσης της ATP (Szöllősi et al., 2017, ter Beek et al., 2014).

Κατά τη λειτουργία του μεταφορέα επαναλαμβάνεται ένας καταλυτικός κύκλος (*Εικόνα 12*), ο οποίος αποτελείται από τα εξής στάδια (Wilkens, 2015):

- i. ο μεταφορέας βρίσκεται στη "apo" θέση (inward conformation) όπου εισέρχεται το υπόστρωμα στη περιοχή TMD
- πραγματοποιείται πρόσδεση δυο μορίων ΑΤΡ στις NBD περιοχές και διμερισμός των NBDs
- iii. τα TMDs αλλάζουν προσανατολισμό (outward conformation)
- iv. πραγματοποιείται υδρόλυση ATP, απελευθέρωση ADP, phosphate και υποστρώματος
- ν. αποσύνδεση των NBDs και επαναφορά στην αρχική "apo" θέση και ακολουθεί επανάληψη του καταλυτικού κύκλου.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση σημαντικών βημάτων του καταλυτικού κύκλου των ABC «εξαγωγείς», που περιλαμβάνει την πρόσδεση του υποστρώματος (D) και 2 μορίων ATP, όταν ο μεταφορέας βρίσκεται στη διάταξη με εσωτερικό προσανατολισμό (inward facing) και αποδέσμευση του υποστρώματος και την αποσύνδεση των NBD με τον εξωτερικό προσανατολισμό (outward facing) (Wilkens, 2015).

# 1.3.3. Ασθένειες και εμφάνιση ανθεκτικότητας λόγω ABC μεταφορέων

Οι ABC μεταφορείς στα ανθρώπινα κύτταρα σχετίζονται με διάφορες ασθένειες και ταυτόχρονα είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πληθώρα δ.ο. (*Πίνακας 1*).

Η μείωση της λειτουργικότητας ABC μεταφορέων, λόγω μεταλλαγών σε ανθρώπινα κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα ασθένειες, όπως κυστική ίνωση (μεταφορέας ABCC7), σύνδρομο Stargardt (μεταφορέας ABCA4), νόσος Tangier (μεταφορέας ABCA1) και άλλες (Wilkens, 2015). Αντίθετα, υπερέκφραση των μεταφορέων σε καρκινικά κύτταρα, οδηγεί σε ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε
αντικαρκινικές δ.ο. (μεταφορείς ABCB1, ABCC1, ABCC10 και ABCG2) (Kathawala et al., 2015). Επιπλέον, φαίνεται πως η παύση ή παρεμπόδιση λειτουργίας τους οδηγεί στη μετατροπή των καρκινικών κυττάρων σε κακοήθη (Fletcher et al., 2016).

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας λόγω υπερέκφρασης ABC μεταφορέων έχει καταγραφεί και σε ανθρωποπαθογόνους μύκητες, με κύριους εκπροσώπους τους μεταφορείς CDR1 και CDR2 του μύκητα *Candida albicans*, το μεταφορέα AFR1 του μύκητα *Cryptococcus neoformans*, το μεταφορέα atrF του μύκητα *Aspergillus fumigatus* και τους μεταφορείς CgCDR1, CgCDR2, CgSNQ2 του μύκητα *Candida glabrata* (Xie et al., 2014, Sanglard, 2016).

Οι ABC μεταφορείς των φυτοπαθογόνων μυκήτων μπορούν να επηρεάσουν την παθογένεια (FgABC1 μεταφορέας, *Fusarium graminearum*), την άμυνα εναντίον μεταβολιτών του ξενιστή (FgABC3 μεταφορέας), καθώς και τη παθογόνο ικανότητα (MgABC1, *Magnaporthe oryzae*) (Hahn and Leroch, 2015). Στο παθογόνο *B. cinerea*, ο μεταφορέας BcatrB έχει βρεθεί πως παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια καθώς και στη μη ευαισθησία σε μυκητοκτόνα, ενώ ο μεταφορέας BcatrD σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στις αζόλες (azoles) (Hahn and Leroch, 2015).

Ο κύριος τρόπος μελέτης των ABC μεταφορέων και των πολύπλοκων συστημάτων λειτουργίας τους είναι μέσω της μελέτης των μεταφορέων οργανισμών—μοντέλων, όπου η γνώση της βιολογικών τους συστημάτων είναι εκτεταμένη. Ένας τέτοιος οργανισμός, που έχει χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο είναι ο σακχαρομύκητας *S. cerervisiae* (Oliver, 2002, Castrillo and Oliver, 2006, Nislow et al., 2016).

Πίνακας 1. ATP-binding Cassette (ABC) μεταφορείς και οι ανθρώπινες ασθένειες με τις οποίες σχετίζονται (Theodoulou and Kerr, 2015).

ΑΒC μεταφορείς	Ασθένεια
ABCA1	Tangier disease and familial high density lipoprotein (HDL) deficiency; atherosclerosis; Alzheimer's disease
ABCA3	Neonatal surfactant deficiency and pulmonary fibrosis; congenital cataract
ABCA4	Stargardt macular degeneration
ABCA7	Alzheimer's disease
ABCA12	Harlequin and lamellar ichthyosis
ABCB1/transporter associated with antigen processing (Tap)2, ABCB2/Tap1	Immune deficiency; arthritis risk
ABCB4/MDR2	PFIC3; other types of cholestasis
ABCB7	Sideroblastic amaemia and ataxia
ABCB11/bile salt export pump (BSEP)	PFIC2; intrahepatic cholestasis of pregnancy; neonatal respiratory distress syndrome
ABCC2/MRP2	Dubin–Johnson syndrome
ABCC5/MRP5	Inherited hypertrichosis
ABCC6/MRP6	Pseudoxanthoma elasticum
ABCC6/MRP6 ABCC7/CFTR	Pseudoxanthoma elasticum CF
ABCC6/MRP6 ABCC7/CFTR ABCC8/SUR1	Pseudoxanthoma elasticum CF Diabetes
ABCC6/MRP6 ABCC7/CFTR ABCC8/SUR1 ABCC9/SUR2	Pseudoxanthoma elasticum CF Diabetes Diabetes
ABCC6/MRP6 ABCC7/CFTR ABCC8/SUR1 ABCC9/SUR2 ABCD1/adrenoleukodystrophy protein (ALDP)	Pseudoxanthoma elasticum CF Diabetes Diabetes X-linked adrenoleukodystrophy, X- linked adrenomyeloneuropathy
ABCC6/MRP6 ABCC7/CFTR ABCC8/SUR1 ABCC9/SUR2 ABCD1/adrenoleukodystrophy protein (ALDP) ABCD3/peroxisome membrane protein (PMP70)	Pseudoxanthoma elasticum CF Diabetes Diabetes X-linked adrenoleukodystrophy, X- linked adrenomyeloneuropathy Hepatosplenomegaly; liver disease
ABCC6/MRP6 ABCC7/CFTR ABCC8/SUR1 ABCC9/SUR2 ABCD1/adrenoleukodystrophy protein (ALDP) ABCD3/peroxisome membrane protein (PMP70) ABCD4/PMP69	Pseudoxanthoma elasticum CF Diabetes Diabetes X-linked adrenoleukodystrophy, X- linked adrenomyeloneuropathy Hepatosplenomegaly; liver disease Inborn error of vitamin B12 metabolism
ABCC6/MRP6 ABCC7/CFTR ABCC8/SUR1 ABCC9/SUR2 ABCD1/adrenoleukodystrophy protein (ALDP) ABCD3/peroxisome membrane protein (PMP70) ABCD4/PMP69 ABCG2/breast cancer resistance protein (BCRP)	Pseudoxanthoma elasticum CF Diabetes Diabetes X-linked adrenoleukodystrophy, X- linked adrenomyeloneuropathy Hepatosplenomegaly; liver disease Inborn error of vitamin B12 metabolism Gout and hyperuricaemia
ABCC6/MRP6 ABCC7/CFTR ABCC8/SUR1 ABCC9/SUR2 ABCD1/adrenoleukodystrophy protein (ALDP) ABCD3/peroxisome membrane protein (PMP70) ABCD4/PMP69 ABCG2/breast cancer resistance protein (BCRP) ABCG5; ABCG8	<ul> <li>Pseudoxanthoma elasticum</li> <li>CF</li> <li>Diabetes</li> <li>Diabetes</li> <li>X-linked adrenoleukodystrophy, X-linked adrenomyeloneuropathy</li> <li>Hepatosplenomegaly; liver disease</li> <li>Inborn error of vitamin B12 metabolism</li> <li>Gout and hyperuricaemia</li> <li>Sitosterolemia; coronary heart disease; gallstone disease</li> </ul>
ABCC6/MRP6 ABCC7/CFTR ABCC8/SUR1 ABCC9/SUR2 ABCD1/adrenoleukodystrophy protein (ALDP) ABCD3/peroxisome membrane protein (PMP70) ABCD4/PMP69 ABCG2/breast cancer resistance protein (BCRP) ABCG5; ABCG8 ABCB1/P-gp; ABCC1/MRP1, ABCG2/BCRP	Pseudoxanthoma elasticum CF Diabetes Diabetes X-linked adrenoleukodystrophy, X- linked adrenomyeloneuropathy Hepatosplenomegaly; liver disease Inborn error of vitamin B12 metabolism Gout and hyperuricaemia Sitosterolemia; coronary heart disease; gallstone disease Multi-drug resistance

## 1.4. Ο σακχαρομύκητας Saccharomyces cerevisiae

#### 1.4.1 Ιστορική αναδρομή

To είδος Saccharomyces cerevisiae, γνωστό και ως σακχαρομύκητας, ζυμομύκητας ή ζύμη, είναι στενά συνδεδεμένο με τον άνθρωπο από τους αρχαίους χρόνους καθώς έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στη οινοποίηση, ζυθοποιία και τη παραγωγή ψωμιού (Chambers and Pretorius, 2010, Mattanovich et al., 2014, Stewart, 2014).

Αρχαιολογικά ευρήματα έχουν δείξει πως η χρήση ζυμών ήταν διαδομένη στους αρχαίους πολιτισμούς. Τα παλαιότερα ευρήματα έχουν καταγραφεί στην Κίνα, όπου το 7000 π.Χ. παρήγαγαν αλκοολούχα ποτά μέσω του ζυμομύκητα. Το 6000 π.Χ. φαίνεται να πραγματοποιούνταν ζυμώσεις στην περιοχή του σημερινού Ιράν, και στην Αίγυπτο το 3000 π.Χ. Με την πάροδο των αιώνων η γνώση για την ζύμη επεκτάθηκε στη Μεσοποταμία και από εκεί στην Ελλάδα (2000 π.Χ.) και Ιταλία (1000 π.Χ.) και στον υπόλοιπο κόσμο (Legras et al., 2007).

Σήμερα, οι ζύμες αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι σημαντικών κλάδων της επιστήμης και της βιομηχανίας, με σημαντική εφαρμογή και συνεισφορά στους ταχύτατα αναπτυσσόμενους επιστημονικούς κλάδους των γεωργικών και περιβαντολλογικών επιστήμων, τεχνολογίας τροφίμων, επιστήμων υγείας, και βιολογίας (*Εικόνα 13*) (Walker, 1998, Nandy and Srivastava, 2018).

Το είδος *S. cerevisiae* μελετήθηκε πρώτη φορά το 1838 από τον Meyer και περιγράφηκε το 1870 από τον Rees (Stewart, 2014). Πρόκειται για ένα ασκομύκητα (*Πίνακας* 2) με την ικανότητα να παράγει αλκοόλες μεταβολίζοντας σάκχαρα, κάτι που συνείσφερε στην επιλογή του ως προς μελέτη οργανισμό, καθώς η βιομηχανοποίηση των αλκοολούχων ποτών ήταν στα πρώτα της βήματα (Goddard and Greig, 2015). Το αίτιο και τον μηχανισμό πίσω από την ζύμωση περιέγραψε πρώτος ο Pasteur το 1876 (Pasteur, 1876).

Η επιστημονική κοινότητα με αμείωτο ενδιαφέρον, συνεχίζει να μελετά τις ζύμες και πιο συγκεκριμένα το *S. cerevisiae* με εφαρμογή πρωτοποριακών πειραμάτων και μεθόδων, το οποία μπορούν στη συνέχεια να εφαρμοστούν σε πολυπλοκότερους οργανισμούς (Botstein and Fink, 2011). Μια από τις σημαντικότερες πρωτοποριακές μελέτες σχετική με το *S. cerevisiae* ήταν η

αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματός του, η οποία δημοσιεύτηκε το 1996 (Goffeau et al., 1996).



**Εικόνα 13.** Εφαρμογές ζυμών στους κλάδους επιστήμης και βιοτεχνολογίας (Walker, 1998, Nandy and Srivastava, 2018).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση του σακχαρομύκητα Saccharomyces cerevisiae (Walker, 1998).

Βασίλειο:	Μύκητες
Φύλο:	Ascomycota
Τάξη:	Saccharomycetales
Οικογένεια:	Saccharomycetaceae
Γένος:	Saccharomyces
Είδος:	S. cerevisiae

# 1.4.2. Saccharomyces cerevisiae: Πρότυπος οργανισμός για την έρευνα στη βιοτεχνολογία

Ο S. cerevisiae είναι πρότυπος οργανισμός για τη βιολογία, καθώς παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το κυτταρικό τοίχωμα που περικλείει τις ζύμες, αποτελεί τη μοναδική δομική διαφορά μεταξύ των κύτταρων του ζυμομύκητα και των ζωικών κύτταρων (Walker, 1998). Επιπλέον, ως μονοκύτταρος οργανισμός έχει μικρό χρόνο γενεάς, με το διπλασιασμό των κυττάρων να ολοκληρώνεται με 2 ώρες επώασης στους 30°C, ενώ και η καλλιέργεια του είναι εύκολη σε εργαστηριακές συνθήκες (Stewart, 2014). Το γονιδίωμα του είναι μικρό και απλό, κάνοντας δυνατή την προσθήκη και δυνατότητα διαγραφή γονιδίων. Έχει тην χρωμοσωμικού ομόλογου ανασυνδυασμού και δυνατότητα εναλλαγής μεταξύ απλοειδούς και διπλοειδούς φάσης (Hartwell et al., 2014).

Μετά την αλληλούχιση του γονιδιώματος του σακχαρομύκητα, έγινε ακόμα πιο εμφανής ο ρόλος του ως οργανισμού-πρότυπο στη μοριακή βιολογία, καθώς ήταν δυνατή η μελέτη και ανάπτυξη νέων κλάδων της, όπως η λειτουργική γονιδιωματική (Functional Genomics) (Oliver, 2002, Nislow et al., 2016) και η βιολογία συστημάτων (Systems Biology) (Mustacchi et al., 2006). Παραδείγματα κάποιων βιολογικών θεμάτων για τη μελέτη των οποίων χρησιμοποιήθηκε ο *S. cerevisiae*, αποτελούν:

- Σχέσης γονιδίου-πρωτεϊνης-λειτουργικότητα πρωτεϊνης, μέσω λειτουργικής γονιδιωματικής και της αντικατάστασης ενός γονιδίου με γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό (Giaever and Nislow, 2014) (Saccharomyces Genome Deletion, http://wwwsequence.stanford.edu/group/yeast\_deletion\_project/deletions.html).
- Ομολογία συντηρημένων γονιδίων του ζυμομύκητα με άλλους οργανισμούς καθώς και χαρακτηρισμός του ρόλου και των προϊόντων τους (Ashburner et al., 2000) (Gene Ontology Consortium http://www.geneontology.org/)
- Ρύθμιση έκφρασης γονιδίων που οφείλεται σε μεταγραφικά ρυθμιστικά
   δίκτυα και παράγοντες μεταγραφής. Η έρευνα ήταν δυνατή λόγω της

καταγεγραμμένης λειτουργίας και ρόλου των μεμονωμένων γονιδίων του S. cerevisiae.

- Δίκτυα πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που περιγράφουν την αλληλεπίδραση πρωτεϊνών που προέρχονται από σύνολο των εκφραζόμενων πρωτεϊνών του γονιδιώματος, και αφορούν σχέσεις φυσικής αλληλεπίδρασης, όπου δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες συνδέονται για την παραγωγή πρωτεϊνικών συμπλόκων.
- Δίκτυα αλληλεπίδρασης γονιδίων, όπου μελετώνται οι λειτουργικές συνδέσεις γονιδίων μέσω ταυτόχρονων γονιδιακών μεταλλαγών. Όταν υπάρχει λειτουργική σύνδεση μεταξύ γονιδίων, πειραματικά αντικατοπτρίζεται με την θανάτωση του οργανισμού (synthetic lethality) λόγω ταυτόχρονης παρουσίας μεταλλαγών στα δυο γονίδια, ενώ ταυτόχρονα, οι καθεμία από τις μεταλλαγές χωριστά δεν επιφέρει αυτό το φαινότυπο.
- Λειτουργικότητα πρωτεϊνών που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες. Η έκφραση ετερόλογων γονιδίων στο S. cerevisiae βοήθησε στην κατανόηση της λειτουργίας πρωτεϊνών που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες καθώς και την ανακάλυψη μηχανισμών καταστολής και θεραπείας αυτών (Botstein and Fink, 2011).

### 1.4.2.1. Εφαρμογές στις γεωπονικές επιστήμες

Ως μοντέλο οργανισμός ο *S. cerevisiae,* έχει βοηθήσει στην κατανόηση πολυπλοκότερων οργανισμών, όπως φυτά και φυτοπαθογόνοι οργανισμοί, αλλά αξιοσημείωτη είναι η προσφορά του στο τομέα της πράσινης βιοτεχνολογίας η οποία περιλαμβάνει τη γεωργική φαρμακολογία, οικοτοξικολογία και τη βιοτεχνολογία φυτών (dos Santos and Sá-Correia, 2015).

Πιο συγκεκριμένα, μέσω της εφαρμογής σύγχρονων «ομικών» τεχνικών στο *S. cerevisiae* είναι δυνατή η εύρεση μηχανισμών δράσης Φ.Π., η ταυτοποίηση βιοσημαντών ως αποτέλεσμα της τοξικότητας των Φ.Π., η εύρεση νέων τρόπων βελτίωση καλλιεργούμενων φυτών μέσω γενετικής μηχανικής (dos Santos and Sá-

Correia, 2015) καθώς και η αύξηση των διαθέσιμων πόρων στη γεωργία όπως η άρδευση, μέσω της ανακύκλωσης νερού από βιομηχανικές μονάδες (Balcιoğlu and Gönder, 2014).

Έχουν πραγματοποιηθεί οικοτοξικολογικές μελέτες στο σακχαρομύκητα μέσω αναλύσεων transciptomics και proteomics στα Φ.Π. 2,4-D, atrazine, flusilazole lidane, benomyl, mancozeb, pyrimethanil, dimethyldithiocarbamoyl, thiuram, zineb, maneb tribenuromethyl καιglyphosate για την καταγραφή αλλαγών στα γονίδια και πρωτεΐνες κατά την αντίδραση του οργανισμού στην εφαρμογή Φ.Π. (Teixeira et al., 2006, Braconi et al., 2016). Μέσω της μεθόδου chemogenomics στο σακχαρομύκητα, ανιχνεύθηκαν μηχανισμοί δράσεις των δ.ο. 4-Chlorophenol (4-CP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP), acetamiprid, imidaclprid, thaimethoxam, dieldrin, mancozeb, toxaphene (Braconi et al., 2016). Τέλος μέσω της μεταβολομικής ανάλυσης (metabolomics) όπου διαπιστώνεται η επίδραση του τοξικού παράγοντα στο μεταβολικό προφίλ στελεχών του σακχαρομύκητα, έχει βρεθεί ο επίδραση υπολειμμάτων των δ.ο. cyprodinil, fludioxonil και pyrimethanil στις οργανοληπτικές ιδιότητες του κρασιού (Braconi et al., 2016).

Τα παραπάνω καταδεικνύουν τις δυνατότητες και δυναμική της χρήσης του *S. cerevisiae* ως οργανισμού προτύπου στις γεωπονικές επιστήμες σε συνδυασμό με νέες στρατηγικές προσέγγισης των προβλημάτων που χρήζουν λύσης, όπως οι «ομικές» τεχνικές.

#### 1.4.3. Γονότυπος και φυσιολογία

Το *S. cerevisiae* διαθέτει μικρό και απλό γονιδίωμα, με 16 γραμμικά χρωμοσώματα, με το μέγεθός του να είναι της τάξης των 12 Mb (περίπου 3 φορές μεγαλύτερο από εκείνο του *Escherichia coli*) και περιέχονται 6000 γονίδια (Goffeau et al., 1996). Είναι μονοκύτταρος οργανισμός ο οποίος παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια με οργανισμούς του ζωικού και φυτικού βασιλείου (Walker, 1998). Η κύρια διαφορά της ζύμης από τα κύτταρα των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών είναι η παρουσία του άκαμπτου κυτταρικού τοιχώματος, καθώς και η απουσία χλωροπλαστών. Τα οργανίδια που απαντώνται σε ένα κύτταρο του

ζυμομύκητα είναι: πυρήνας, μιτοχόνδρια, κενοτόπια, εκκριτικά κυστίδια, υπεροξυσώματα, σύστημα Golgi και ενδοπλασματικό δίκτυο (Walker, 1998).

Αξιοσημείωτη, είναι η δομή του κυτταρικού φακέλου που περιβάλλει το κυτόπλασμα και συνολικά αποτελεί το 15% του συνολικού όγκου του κυττάρου (*Εικόνα 14*). Από το εσωτερικό του κυττάρου προς το εξωτερικό, αρχικά απαντάται η **κυτταρική μεμβράνη** όπου αποτελείται από ρευστό μωσαϊκό λιπιδίων και πρωτεϊνών, όπου αποτρέπει τη μεταφορά υδρόφιλων ουσιών προς το εξωτερικό του κυττάρου. Τα λιπίδια που την αποτελούν είναι κυρίως στερόλες ενώ η πρωτεΐνες που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη εμπλέκονται στη μεταφορά ουσιών από και προς το κύτταρο (ATP binding cassette, ATP-ase, κανάλια, περμεάσες), στη μεταφορά σημάτων (πχ.G-proteins), καθώς και στην πρόσδεση του κυτταροσκελετού. Στο εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης είναι το **περίπλασμα** (periplasm), μια μικρή περιοχή περιέχει κυρίως μαννοπρωτεΐνες και στην εξωτερική πλευρά του οποίου απαντάται το **κυτταρικό τοίχωμα** (Walker, 1998).

Ο κυτταρικός φάκελος αποτελείται κατά 30-50% του ξηρού του βάρους από μαννοπρωτεΐνες, 5-10% από 1,6-β-γλυκάνη, 30-45% από 1,3-β-γλυκάνη και 1,5-6% χιτίνη (Klis et al., 2006). Η λειτουργία και η δομή του κυτταρικού φακέλου είναι άμεσα συνδεδεμένες με το στάδιο του κυτταρικού κύκλου στο οποίο βρίσκεται η ζύμη (Klis et al., 2006).

Οι ζύμες διαθέτουν επίσης **κενοτόπια** (**vacuoles**), τα οποίο έχουν αντίστοιχη λειτουργία με τα κενοτόπια των φυτών και τα λυσσοσώματα των ζωικών κύτταρων (Richards et al., 2010). Είναι οργανίδια στα οποία γίνεται αποθήκευση θρεπτικών ουσιών (αμινοξέων, φωσφορικών ιόντων, μεταλλικών ιόντων κ.α.), αποδόμηση πρωτεϊνών (protein degradation) και αποτοξικοποίηση ουσιών (Li and Kane, 2009). Το φωσφορικό οξύ (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> ή Pi ) αποθηκεύεται στο κενοτόπιο με τη μορφή πολυφωσφορικών (polyP) (Saiardi, 2016). Η δημιουργία των πολυφωσφορικών γίνεται μέσω του Vacuole Transport Complex (VTC) (Jiménez et al., 2016). Τα polyP εμπλέκονται στο μηχανισμό ενοποίησης των κενοτοπίων, στη μικροαυτοφαγία (microau-tophagy) καθώς και σε άλλους μηχανισμούς όπως η αντίδραση σε δίαφορες καπόνησεις (Albi and Serrano, 2016, Kulakovskaya et al., 2016).



**Εικόνα 14.** Δομή κυτταρικού φακέλου του Saccharomyces cerevisiae που περιλαμβάνει τη κυτταροπλασματική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από φωσφολιπίδια και στερόλες, τον περιπλασματικό χώρο και το κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από χιτίνη, γλυκάνες και μαννοπρωτεΐνες (Talavera et al., 2013).

Στο εσωτερικό του, το κενοτόπιο διατηρεί όξινο περιβάλλον (pH < 5-6,5), ενώ η μεμβράνη του διαφέρει από την κυτταρική μεμβράνη καθώς αποτελείται από χαμηλό λόγο εργοστερόλης προς φωσφολιπίδια και ταυτόχρονα απαντώνται λιγότερα σφιγγολιπίδια (Stewart, 2014).

Η μορφολογία του κενοτοπίου διαφοροποιείται ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης της καλλιέργειας, καθώς και από εξωτερικά ερεθίσματα. Πιο συγκεκριμένα, τα κενοτόπια κατά την εκθετική φάση είναι πολλαπλά (2-3 κενοτόπια μεσαίου μεγέθους) (*Εικόνα 15B*), ενώ στη στατική φάση τροποποιούνται σε ένα διογκωμένο κενοτόπιο. Η ίδια μορφολογία παρατηρείται και στην περίπτωση ανάπτυξης του σακχαρομύκητα χωρίς γλυκόζη ή σε περιβάλλον με υψηλή ωσμωτική πίεση (*Εικόνα 15A*).



**Εικόνα 15.** Μορφολογία κενοτοπίων Saccharomyces cerevisiae, με σημασμένη V-ATPase (C-terminally GFP-tagged V-ATPase subunit). **A)** Διογκωμένο κενοτόπιο λόγω αυξημένης ωσμωτικής πίεσης στο περιβάλλον του κυττάρου. **B**) Κανονική ανάπτυξη κενοτοπίων κατά την εκθετική φάση (Li and Kane, 2009).



**Εικόνα 16.** Λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα στο κενοτόπιο. **Α)** αποικοδόμηση πρωτεϊνών, **Β)** αποθήκευση αμινοξέων, ιόντων και μετάλλων **Γ)** εμπλουτισμός κυτοπλάσματος με αμινοξέα, ιόντα και μέταλλα, **Δ)** απομόνωση τοξικών ουσιών (Li and Kane 2009).

Ο ρόλος του κενοτοπίου είναι πολλαπλός (*Εικόνα 16*). Στο κενοτόπιο πραγματοποιείται αποικοδόμηση πρωτεϊνών και άλλων στοιχείων του κυττάρου από τα πεπτικά ένζυμα υδρολάσες, μετά τη μεταφορά των μορίων μέσω εκκριτικών κυστιδίων. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, το κενοτόπιο λειτουργεί ως αποθηκευτικός χώρος αμινοξέων, ιόντων και μετάλλων, ενώ επιπρόσθετα έχει και ρόλο ρύθμισης αυτών των ουσιών στο κυτταρόπλασμα. Τέλος στο εσωτερικό του μεταφορέων με κατανάλωση ενεργείας, τους ABC μεταφορείς (Li and Kane, 2009). Ένα άλλο χαρακτηριστικό των κενοτοπίων είναι πως μπορούν να κληρονομηθούν στην επόμενη γενεά. Κατά την αγενή αναπαραγωγή μεταφέρεται ένα μικρό τμήμα του γονικού κενοτοπίου στο θυγατρικό κύτταρο, κάτι που δεν συμβαίνει κατά την εγγενή αναπαραγωγή (sporulation) (Li and Kane, 2009).

### 1.4.4. Βιολογικός κύκλος και ανάπτυξη

To *S. cerevisiae* αναπαράγεται με εκβλάστηματα (buds) που μεγαλώνουν και αποχωρίζονται από το μητρικό κύτταρο αφήνοντας μια ουλή (bud scar). Τα κύτταρα του σακχαρομύκητα μπορεί να είναι απλοειδή ή διπλοειδή. Τα απλοειδή έχουν δυο συζευκτικούς τύπους, *MATa* και *MATa* και πολλαπλασιάζονται μιτωτικά, με τα θυγατρικά κύτταρα να διατηρούν τον πατρικό συζευκτικό τύπο. Σύζευξη δυο απλοειδών με αντίθετο συζευκτικό τύπο έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διπλοειδούς κυττάρου (*Εικόνα 17*). Το θυγατρικό κύτταρο μέσω της μείωσης γίνεται ξανά απλοειδές σε ένα από τους δυο συζευκτικούς τύπους (Hartwell et al., 2014).

Κατά την καλλιέργεια του σακχαρομύκητα σε υγρό θρεπτικό, η ανάπτυξη δεν είναι γραμμική αλλά χωρίζεται σε 4 διακριτές φάσεις ανάπτυξης (*Εικόνα 18*): Αρχικά στη λανθάνουσα φάση (Lag phase) η ανάπτυξη είναι μηδενική καθώς τα κύτταρα του εμβολίου έρχονται σε επαφή με το νέο περιβάλλον ανάπτυξης. Η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης, από τη πυκνότητα του εμβολίου και από την «ηλικία» των κυττάρων που το αποτελούν.



**Εικόνα 17**. Βιολογικός κύκλος του Saccharomyces cerevisiae (πηγή: Hartwell, Hood 2014).



#### Μέρες ανάπτυξης

Εικόνα 18. Φάσεις ανάπτυξης του Saccharomyces cerevisiae σε υγρή καλλιέργεια.

Ακολουθεί η **εκθετική φάση** ανάπτυξης (Log phase) όπου ο ρυθμός αύξησης των κυττάρων είναι εκθετικής μορφής. Στο περιβάλλοντα χώρο των κυττάρων αρχίζουν να μειώνονται τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά όπως γλυκόζη και συσσωρεύονται διάφορες ουσίες που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων. Στην **επιβραδυνόμενη φάση** (Diauxic phase), αφού έχει καταναλωθεί μεγάλο ποσοστό της γλυκόζη, τα κύτταρα αναπτύσσονται με μικρότερο ρυθμό χρησιμοποιώντας αιθανόλη ως πηγή ενέργειας. Τέλος, τα κύτταρα οδηγούνται στη **στατική φάση** (Stationary phase), όπου ο ρυθμός ανάπτυξης είναι μηδενικός. Μετά από παραμονή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα στη στατική φάση, τα κύτταρα πεθαίνουν ή αυτολύονται (Walker, 1998, Herman, 2002).

# 1.4.5. ATP-binding Cassette μεταφορείς που περιέχονται στα κύτταρα του σακχαρομύκητα

Το γονιδίωμα του *S. cerevisiae* περιέχει 22 γονίδια που κωδικοποιούν ABC μεταφορείς (ATP-binding Cassette superfamily) (Paumi et al., 2009). Πρόκειται για μεγάλα πρωτεϊνικά συμπλέγματα, ο ρόλος των οποίων είναι η απέκκριση τοξικών ουσιών (μεταφορέας PDR5) (Golin and Ambudkar, 2015), η απομόνωση ουσιών στο κενοτόπιο (μεταφορέας YCF1) (Mason and Michaelis, 2002), η απέκκριση φερμονών (μεταφορέας STE6), (Michaelis and Barrowman, 2012), η μεταφορά λιπιδίων (φωσφογλυκερίδια κ.α.) και η ρύθμιση της λιπιδιακής σύστασης των μεμβρανών (Prasad et al., 2016).

Η κατηγοριοποίηση των ABC μεταφορέων του σακχαρομύκητα (Εικόνα 19) σε

7 υποοικογένειες, έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα του Human Genome Organization (HUGO, http://www.hugo-international.org/) που ορίζει την ονοματολογία των ανθρώπινων ABC μεταφορέων. Οι ομάδες ABCE και ABCF δεν

αποτελούν λειτουργικούς μεταφορείς, αλλά αποδίδουν ενέργεια μέσω της υδρόλυσης μορίων ATP που στη συνέχεια χρησιμοποιείται σε διεργασίες, όπως η επιδιόρθωση βλαβών του DNA (DNA repair) (Paumi et al., 2009). Κάποιοι από τους μεταφορείς των υποοικογενειών ABCB και ABCD αποτελούνται από μόνο μια

		20 <u>.</u>	S. cerevisiae	
Subfamily		ORF	Published	Topology
			/Suggested name	
	Г	YOR153w	ScPdr5p	AAAAAA
		YOR406w	ScPdr15p	AAAAAA
		YOR328w	ScPdr10p	AAAAAA
		YDR011w	ScSnq2p	_AAA_AAA
		YNR070w	ScPdr18p	AAA_AAA
Abed / DR		YPL058c	ScPdr12p	AAAAAA
		YIL013c	ScPdr11p	AAAAAA
		YOR011w	ScAus1p	AALAAA
		YOL075c	ScYol075cp	-AAA-AAA
	L	YCR011c	ScAdp1p	A.MA
	Γ	YMR301c	ScAtm1p	ANG
ABCB/MDR		YLR188w	ScMdl1p	M
,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		YPL270w	ScMdl2p	M
L	L	YKL209c	ScSte6p	JUUL_JUUL_
	Г	YHL035c	ScVmr1p	MAMA_MA_
		YLL048c	ScYbt1p	MANA_MA_
ABCC/MRP		YKR103w	ScNft1p	MAMA
ABCC/ WIRF		YDR135c	ScYcf1p	MUMLMA.
		YLL015w	ScBpt1p	MANA_MA_
		YGR281c	ScYor1p	AAA_AAA_
ABCD/ALDP -		YPL147w	ScPxa1p	, MAL_
	l	YKL188c	ScPxa2p	AN _
	Г	YLR249w	ScYef3p	-0-0-
ABCF/YEF3 –		YNL014w	ScHef3p	-0-0-
	-	YPL226w	ScNew1p	-0-0-
		YFR009w	ScGcn20p	-0-0-
	L	YER036c	ScArb1p	-0-0-
ABCE/RL1	-[	YDR091c	ScRli1p	-0-0-
Othors	5	YFL028c	ScCaf16p	-0-
Others	1	YDR061w	ScYdr061wp	-0-

**Εικόνα 19.** Κατηγοριοποίηση ABC μεταφορέων του Saccharomyces cerevisiae σύμφωνα με την ομοιότητα των περιοχών δέσμευσης νουκλεοτιδίων, NBDs (γαλάζιοι κύκλοι) (Prasad et al., 2016).

περιοχή δέσμευσης νουκλεοτιδίων (Nucleotide Binding Domains, NBD) συνδεδεμένη με μια διαμεμβρανική περιοχή (Transmembrane Domain, TMD) και ονομάζονται half transporters. Οι ABC μεταφορείς στο σακχαρομύκητα απατώνται όχι μόνο στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και στις μεμβράνες του κενοτοπίου, πυρήνα, μιτοχονδρίου και περοξισώματος (peroxisome) (*Εικόνα 20*).

Μέσω της μελέτης των ABC μεταφορέων του σακχαρομύκητα έχουν ανακαλυφθεί πολλές λεπτομέρειες για τα ευκαρυωτικά κύτταρα, μεταξύ άλλων τα υποστρώματα των μεταφορέων, ο τρόπος διαβίβασης σημάτων που εμπλέκονται στην ενδοκύττωση, η λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου, ρόλος των half-transporters (Ernst et al., 2005) καθώς και ο μηχανισμός της πολλαπλής ανθεκτικότητας (Pleiotropic Drug Resistance, PDR) (Paumi et al., 2009).

Σημαντικοί μεταφορείς είναι οι PDR5, YOR1 και SNQ2, οι οποίοι μαζί με άλλους μεταφορείς βρίσκονται υπό τον έλεγχο των μεταγραφικών ρυθμιστικών παραγόντων PDR1 και PDR5 και ο μεταφορέας STE6, ο οποίος ήταν ο πρώτος ABC μεταφορέας που ταυτοποιήθηκε στο σακχαρομύκητα και μεταφέρει φερομόνες σύζευξης (a-factor lipoptide pheromone) (Jungwirth and Kuchler, 2006, Snider et al., 2013).



**Εικόνα 20.** Τοπολογία ABC μεταφορέων στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και στις μεμβράνες οργανιδίων κύτταρου του Saccharomyces cerevisiae (V; κενοτόπιο, M; μιτοχόνδρο, P; peroxisome, N; πυρήνας, ER; ενδοπλασματικό δίκτυο) (Paumi et al., 2009).

# 1.4.5.1 Ο μεταφορέας Pleiotropic Drug Resistance 5 (PDR5)

Ένας από τους πιο καλά μελετημένους ABC μεταφορείς είναι ο μεταφορέας PDR5 (Rutledge et al., 2011, Golin and Ambudkar, 2015). Πρόκειται για τον κύριο εκπρόσωπο της υποοικογένειας μεταφορέων PDR (Pleiotropic Drug Resistance) ή ABCG υποοικογένειας. Η δομή των ABCG μεταφορέων διαφέρει σημαντικά από τη δομή άλλων υποοικογενειών, καθώς είναι ασύμμετρη με χαρακτηριστικές NBDs (*Εικόνα 21*), αντίστροφη διάταξη μεταξύ NBDs και TMDs περιοχές. Επίσης, διαθέτει πολύ σύντομους ενδοκυτταρικούς βρόχους (Intracellular Loops, ICLs) (Golin and Ambudkar, 2015).

Η λειτουργία του PDR5 βασίζεται στην υδρόλυση μορίων ATP στις περιοχές δέσμευσης νουκλεοτιδίων και μεταφορά υποστρωμάτων που προσδένονται στον κοίλο χώρο που δημιουργείται από τις TMDs περιοχές (Golin and Ambudkar, 2015). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν μόρια GTP για τη παραγωγή ενέργειας για τη λειτουργία του μεταφορέα (Golin et al., 2007). Μετά τη μεταφορά των υποστρωμάτων στον περιβάλλοντα χώρο του κυττάρου φαίνεται ότι τροποποιείται η δομή του μεταφορέα ώστε να μην επιτραπεί η εκ νέου πρόσδεση των υποστρωμάτων και η μεταφορά στο εσωτερικό του κυττάρου ακόμη και αν η συγκέντρωση του υποστρώματος στο εξωτερικό του κυττάρου είναι μεγαλύτερη (Golin and Ambudkar, 2015).



**Εικόνα 21**. Δομή του PDR5 μεταφορέα. Αποτελείται από δυο διαμεμβρανικές περιοχές (TMD) με σύντομους ενδοκυτταρικούς βρόχους (intracellular loops, ICL), στις οποίες παρεμβάλλονται δυο περιοχές δέσμευσης μορίων ATP(Nucleotide Binding Domain, NBD) (Golin and Ambudkar, 2015). Το ευρύ φάσμα των υποστρωμάτων που μεταφέρονται από το μεταφορέα περιλαμβάνουν τις δ.o. rhodamines (Kolaczkowski et al., 1996), cycloheximide (Golin et al., 2000), μυκητοκτόνα της ομάδας των αζολών (azoles) (Kolaczkowski et al., 1998, Rogers et al., 2001), αντικαρκινικές δ.o. (Kolaczkowski et al., 1996, Demir and Koç, 2015), τοξίνες (deoxynivalenol, DON) (Gunter et al., 2016), καθώς και πληθώρα άλλων ουσιών (Hiraga et al., 2001).

Η φάση ανάπτυξης του κυττάρου φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί τον μεταφορέα, καθώς παρουσιάζεται αυξημένη κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης, ενώ μετά από αυτή παρατηρείται σημαντική μείωση (Jungwirth and Kuchler, 2006).

Η μελέτη του μεταφορέα PDR5 έχει προσφέρει πολλές πληροφορίες για τη δομή των ABC μεταφορέων, την εξειδίκευση (specificity) των υποστρωμάτων που μεταφέρονται, το μηχανισμό και τον ρόλο των ATP-binding sites (Golin and Ambudkar, 2015). Επιπλέον, λόγω της λειτουργικής ομοιότητας με το μεταφορέα P-glycoprotein (P-gp) των κυττάρων των θηλαστικών, έχει χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της ανθεκτικότητας καρκινικών κυττάρων που οφείλεται σε ABC μεταφορείς (Decottignies et al., 1994, Golin and Ambudkar, 2015).

Τέλος, η σημασία του μεταφορέα στις γεωπονικές επιστήμες είναι μεγάλη καθώς αποτελεί μεταφορέα-πρότυπο της οικογένειας ABCG μεταφορέων των μυκήτων, για τη μελέτη της ανθεκτικότητας λόγω αυξημένης απέκκρισης δ.ο. (Downes et al., 2013, Golin and Ambudkar, 2015)

#### 1.4.5.2. Μεταφορέας YCF1

Ο YCF1 μεταφορέας ανήκει στους υποοικογένεια των ABCC μεταφορέων (*Εικόνα* **19**). Ανακαλύφθηκε το 1994 ως μεταφορέας που προσδίδει ανθεκτικότητα στο κάδμιο όταν υπερεκφράζεται (Yeast Cadmium Factor, YCF) και σε αντίθεση με την πλειονότητα των μεταφορέων, δεν βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη αλλά στη μεμβράνη του κενοτοπίου (Szczypka et al., 1994).

Ο YCF1 μεταφορέας μαζί με τους περισσότερους μεταφορείς της υποοικογένειας ABCC, αποτελούνται από τον "ABC πυρήνα" (ABC core), με δυο

διαμεμβρανικές περιοχές (Membrane Spanning Domain, MSD) και δυο θέσεις NBDs, και μια επέκταση στο N-άκρο (N-terminal extension, NTE) με 5 διαμεμβρανικές περιοχές που διασχίζουν πλήρως τη λιπιδιακής σύστασης κυτταροπλασματική μεμβράνη (MSD) και ένα βρόχο που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (cytosolic Linker, L0) (*Εικόνα 22*) (Paumi et al., 2009). Για τη λειτουργία του, είναι απαραίτητες κάποιες μετά-μεταγραφικές τροποποιήσεις (post-translational modulation). Πιο συγκεκριμένα, οι θέσεις Ser-908 και Thr-911 φωσφορυλίωνονται στο τμήμα του ABC πυρήνα του μεταφορέα, όπου γίνεται η υδρόλυση των μορίων ATP (Paumi et al., 2008).

Ο ρόλος του μεταφορέα YCF1 είναι η μεταφορά τοξικών ουσιών στο εσωτερικό του κενοτοπίου, που πραγματοποιείται σε τρία στάδια (*Εικόνα 23*), κυρίως μέσω συμπλόκων γλουταθειόνης, όπως ο μηχανισμός του μεταφορέα MRP1 των κυττάρων των θηλαστικών, και δευτερεύοντος μέσω συμπλόκων glucuronate (Sharma et al., 2002, Lazard et al., 2011). Στην πρώτη φάση, πραγματοποιείται η «ενεργοποίηση» της τοξικής ουσίας με τη προσθήκη υδροξύλιου από το κυτόχρωμα P-450. Στη συνέχεια ακολουθεί η «σύζευξη» του τοξικού μορίου με μόρια γλουταθειόνης (glutathione, GSH) και τέλος «απομόνωση» του παραγόμενου συμπλόκου μέσω του YCF1 μεταφορά στο εσωτερικό του κενοτοπίου.

Οι ουσίες που μεταφέρονται από το μεταφορέα εκτός από τα βαρέα μέταλλα κάδμιο, μόλυβδο, αντιμόνιο, υδράργυρος και αρσενικό είναι το διαμύδιο (diamide) και το 1-χλωρο-2,4-δυνιτροβενζολιο. Για τη λειτουργία του μπορεί να χρησιμοποιηθούν μόρια ATP και τριφωσφορική γουανοσίνη (Guanosine Triphosphate, GTP) (Paumi, Chuk et al. 2009). Ο μεταφορέας YCF1 βρίσκεται υπό τη ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα Yap1p, ο οποίος οδηγεί στην υπερέκφραση του μεταφορέα YCF1 όταν το κύτταρο βρίσκεται σε οξειδωτική καταπόνηση (Wemmie, Szczypka et al. 1994, Rodrigues-Pousada, Nevitt et al. 2004).

Πλέον, τα διαθέσιμα εργαλεία βιοπληροφορικής και η ανάπτυξη ισχυρών αναλυτικών μηχανημάτων, μας δίνει τη δυνατότητα εις βάθους μελέτης του μεταβολισμού ενός οργανισμού με βάση «ομικές αναλύσεις» (Reaves and Rabinowitz, 2011, Mülleder et al., 2016, Zampieri and Sauer, 2017). Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε μεταβολομική για τη μελέτη της επίδραση του

τριαζολικού μυκητοκτόνου flusilazole στο μεταβολικό προφίλ στελεχών του S. cerevisiae.



Εικόνα 22. Δομή του YCF1 μεταφορέα. Το N-terminal extention (NTE) περιλαμβάνει το διαμεμβρανικό τμήμα (Membrane Spanning Domain, MSD0) και τον κυτταροπλασματικό βρόχο (Linker 0). Ο ABC πυρήνας αποτελείται από 2 διαμεμβρανικά τμήματα (MSD1, MSD2), και δυο περιοχές δέσμευσης νουκλεοτιδίων (NBD1. NBD2). Φωσφορυλιωμένες θέσεις αμινοξέων Ser-908 και Thr-911 απαραίτητες για τη λειτουργία του μεταφορέα και η θέση Ser-251 η φωσφορυλίωση της οποίας επιδρά αρνητικά στη λειτουργία του μεταφορέα (Paumi et al., 2008).



**Εικόνα 23.** Μηχανισμός αποτοξικοποίησης ουσιών μέσω του YCF1 μεταφορέα, ο οποίος περιλαμβάνει ενεργοποίηση του μορίου (Phase 1), σύζευξη (Phase 2) και απομόνωση του στο κενοτόπιο (Phase 3) (Paumi et al., 2009).

# 1.4.7. Εργαλεία βιοπληροφορικής (bioinformatics) για «ομικές» αναλύσεις Yeast

Οι «ομικές» αναλύσεις υψηλής ρυθμό-απόδοσης (high-throughput), απαιτούν την ανάπτυξη και εφαρμογή προηγμένων λογισμικών βιοπληροφορικής (bioinformatics) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).Τα λογισμικά βιοπληροφορικής που είναι πλέον διαθέσιμα για την πραγματοποίηση «ομικών» αναλύσεων, δίνουν σημαντικά πλεονεκτήματα και βοήθεια στην έρευνα με χρήση του *S. cerevisiae* (Πίνακας 3) (Wishart, 2015).

Όπως προαναφέρθηκε, η βάση δεδομένων πάνω στην οποία βασίστηκε η μελέτη της βιολογίας του S. cerevisiae είναι η Saccharomyces Genome **Database** (https://www.yeastgenome.org/).  $\Sigma \varepsilon$   $\alpha u \tau \eta v$ ,  $\varepsilon i v \alpha i$   $\delta i \alpha \theta \epsilon \sigma i \mu \epsilon \zeta$  oi πληροφορίες για το γονιδίωμα της ζύμης, τα γονίδια που το αποτελούν, τις πρωτεΐνες, τα βιοχημικά μονοπάτια, την ονοματολογία των γονιδίων (gene ontology) κ.ά. (Cherry et al., 2012). Η βάση δεδομένων μεταβολιτών της ζύμης, Yeast Metabolome Database (YMDB, http://www.ymdb.ca), παρέχει πληροφορίες για μεταβολίτες του οργανισμού όπως περιγραφή μεταβολιτών, ονοματολογία, φυσικοχημικές ιδιότητες, φάσματα NMR και φάσματα μαζών (ανιχνευτές MS), εμπλεκόμενα μονοπάτια, αλληλουχίες γονιδίων και πρωτεϊνών 2012). Τέλος, βάση δεδομένων κ.α. (Jewison et al.. ŋ YeastCvc (https://yeast.biocyc.org/), περιγράφει τη σχέση μεταξύ γονιδιακής αλληλουχίας και μεταβολικών μονοπατιών. Επιπλέον δίνεται η δυνατότητα οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων ομικών αναλύσεων, με απεικόνιση σύνθετων μονοπατιών και των διαφοροποιήσεων των μεταβολιτών τους ανά εφαρμογή (Caspi et al., 2016).

Μία ακόμα βάση δεδομένων, εξειδικευμένη στη μελέτη του *S. cerevisiae*, είναι αυτή για τους πρωτεϊνικούς μεταφορείς, Yeast transport database (http://ytpdb.biopark-it.be/ytpdb/index.php/Main\_Page), όπου παρέχει πληροφορίες για την πιο καλά μελετημένη ομάδα πρωτεϊνών (Brohée et al., 2010).

Πίνακας 3. Λογισμικά βιοπληροφορικής που είναι πλέον διαθέσιμα για την πραγματοποίηση «ομικών» αναλύσεων δίνουν σημαντικά πλεονεκτήματα και βοήθεια στην έρευνα με χρήση του Saccharomyces cerevisiae.

Λογισμικό	Σύνδεσμος	Αναφορά
Saccharomyces Genome Database	https://www.yeastgenome.org/	(Cherry et al., 2012)
Yeast Metabolome Database	http://www.ymdb.ca	(Jewison et al., 2012)
YeastCyc	https://yeast.biocyc.org/	(Caspi et al., 2016)
Yeast transport database	http://ytpdb.biopark- it.be/ytpdb/index.php/Main_Page	(Brohée et al., 2010)

### 1.5. Μεταβολομική

### 1.5.1. Έννοια της μεταβολομικής ανάλυσης

Οι νέες «ομικές» μέθοδοι υψηλής ρυθμό-απόδοσης (high-throughput), σε συνδυασμό με τη χρήση πρότυπων βιολογικών συστημάτων για εφαρμογές στη βιοτεχνολογία, μπορούν να βοηθήσουν σημαντικά στην καλύτερη μελέτη και κατανόηση του προβλήματος της ανθεκτικότητας και να προσφέρει πολύτιμες λύσεις. Μία από τις ταχύτατα αναπτυσσόμενες «ομικές» τεχνικές αποτελεί η μεταβολομική (metabolomics), η οποία λειτουργεί ως συνδετικός κρίκος μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου (*Εικόνα 24*) (Aliferis and Jabaji, 2011). Το μεταβολικό προφίλ ενός οργανισμού αποτελεί το αποτέλεσμα της μεταγραφής και μετάφρασης του γονιδιώματος, της ρύθμισης αυτών από μετά-μεταγραφικών (post-translational) και μετά-μεταφραστικών (post-translational) παραγόντων καθώς και της επίδρασης περιβαντολλογικών συνθηκών στην ανάπτυξη του οργανισμού (Xu et al., 2014).

Η μεταβολομική, ορίζεται ως η ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών ενός βιολογικού συστήματος (Fiehn, 2002). Μέσω της ταυτόχρονης καταγραφής μεταβολιτών και κατά επέκταση των μεταβολικών

δικτύων στα οποία εμπλέκονται, είναι δυνατή η ανίχνευση αλλαγών στο μεταβολικό προφίλ του οργανισμού κατά την έκθεσή του σε βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες και η ανακάλυψη των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών που τη χαρακτηρίζουν (biomarkers) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).



Εικόνα 24 Αριθμός παραθέσεων και δημοσιεύσεων σχετικά με μεταβολομικές αναλύσεις σε ζύμες, για το χρονικό διάστημα 01/2001 έως 03/2018 μετά από αναζήτηση δημοσιεύσεων για τους όρους «yeast metabolomics» στη βάση δεδομένων Web of knowledge (https://webofknowledge.com/)

# 1.5.2. Μεταβολομική ανάλυση: Αναλυτικά μηχανήματα και βιοπληροφορική ανάλυση

Η μεταβολομική ανάλυση στηρίζεται στη χρήση σύγχρονων αναλυτικών οργάνων για την καταγραφή μεταβολικών προφίλ και για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών και σε προγράμματα βιοπληροφορικής για την ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

### 1.5.2.1 Αναλυτικά μηχανήματα για αναλύσεις μεταβολομικής

Μία από τις βασικές διαφορές μεταξύ των αναλυτικών μηχανημάτων που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική, είναι η ευαισθησία τους στην ανίχνευση μεταβολιτών σε μικρές συγκεντρώσεις.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στις μεταβολομικές αναλύσεις λόγω της μεγάλης επαναληψιμότητάς της (reproducibility) και των περιορισμένων χειρισμών στην προετοιμασία των δειγμάτων, όμως το όριο ανίχνευσης με NMR ανιχνευτή είναι μικρό (1-5 μM) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Η ανίχνευση μεταβολιτών με φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS) συνδυασμένη με αέρια (Gas Chromatography, GC) ή υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) είναι η πλέον διαδεδομένη για μεταβολομικές αναλύσεις λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας της και των διαθέσιμων μεταβολικών βιβλιοθηκών (πχ NIST, MassBank) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Σε αναλύσεις φασματομετρίας μάζας, απαιτείται η διάκριση μεταξύ των μεταβολικών χαρακτηριστικών του βιολογικού δείγματος και αυτών που δεν προέρχονται από το δείγμα (π.χ. ρύπανση του μηχανήματος ή του δείγματος, μη καθαρότητα των διαλυτών, στήλη, χρήση χημικών αντιδραστηρίων). Με την ανάλυση τυφλών δειγμάτων (blank samples), τα οποία προετοιμάζονται με το ίδιο πρωτόκολλο με τα βιολογικά δείγματα, είναι δυνατή η διάκριση μεταξύ των δυο κατηγοριών (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Επιπλέον, η χρήση προηγμένων ανιχνευτών, όπως ο ανιχνευτής πτήσης ιόντων (Time of Flight, TOF), σε συνδυασμό με ανιχνευτή MS στον αέριο χρωματογράφο και ο ανιχνευτής υγρή χρωματογραφία, έχουν βελτιώσει την ευαισθησία των μεταβολομικών αναλύσεων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

### 1.5.2.2. Βιοπληροφορική ανάλυση δεδομένων μεταβολομικής

Η ανάλυση των δεδομένων μεταβολομικής πραγματοποιείται με στατιστικά προγράμματα που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανάλυση τεράστιων όγκων δεδομένων (Wishart, 2015). Η πολυπαραγοντική ανάλυση εφαρμόζεται μέσω της

μεθόδου μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS), όπου μέσω μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης περιγράφει τη γραμμική σχέση μεταξύ των προγνωστικών μεταβλητών X και των μεταβλητών Y (Wiklund et al., 2008). Η μέθοδος μερικών ελαχίστων τετραγώνων-διακριτικής ανάλυσης (Partial Least Squares-Discriminant Analysis, PLS-DA)  $\varepsilon \pi i \tau v \chi \dot{\alpha} v \varepsilon i$   $\mu i \alpha \pi \epsilon \rho i \sigma \tau \rho \phi \dot{\eta} \tau \eta \zeta$ προβολής για να ανακαλυφθούν οι κρυφές μεταβλητές που συμβάλλουν στο διαχωρισμό και ομαδοποίηση των δειγμάτων (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Μία επέκταση της PLS-DA αποτελεί η OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis, OPLS-DA), η οποία αναγνωρίζει και αφαιρεί τη διακύμανση των μεταβλητών Χ, η οποία είναι κάθετη προς τις προγνωστικές μεταβλητές Υ. Από την ανάλυση προκύπτουν τρεις παράμετροι, ο συντελεστής συσχέτισης R<sup>2</sup>X και R<sup>2</sup>Y και η προγνωστική ικανότητα Q<sup>2</sup>, των οποίων οι τιμές πλησιάζουν τη μονάδα όσο αυξάνεται η αξιοπιστία του μοντέλου (Wiklund et al., 2008).

2. Σκοπός της μελέτης

Σκοπό της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης αποτέλεσε η ανάπτυξη μεθοδολογίας μεταβολομικής ανάλυσης του Saccharomyces cerevisiae, και η εφαρμογή της στη μελέτη του φαινομένου της ανθεκτικότητας μυκήτων σε Φ.Π., η οποία οφείλεται στη λειτουργία ABC μεταφορέων. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν δ.ο. που δρουν ως πιθανά υποστρώματα για το μεταφορέα YCF1 και ανήκουν στην ομάδα των SBIs και των SDHIs. Με βάση τα αποτελέσματα, η έρευνα επικεντρώθηκε στο flusilazole για τη μελέτη της επίδρασης ABC μεταφορέων στην τοξικότητά του και την αντίστοιχη καταγραφή της επίδρασης στο μεταβολισμό του *S. cerevisiae*.

3. Υλικά και μέθοδοι

### 3.1. Χημικά και αντιδραστήρια

Στις βιοδοκιμές αξιολόγησης της ευαισθησίας στελεχών του *S. cerevisiae* χρησιμοποιήθηκαν οι δ.ο. cycloheximide (PanReac, AppliChem, Barcelona, Spain), flusilazole (99%  $\beta/\beta$ , DuPont, Wilmington, Delaware, USA), prochloraz (99,5%  $\beta/\beta$ , Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), fenpropimorph (99,6%  $\beta/\beta$ , BASF, Ludwigshafen, Germany), benzovindiflupyr (99%  $\beta/\beta$  Syngenta International AG, Basel, Switzerland) και chlorothalonil (99%  $\beta/\beta$ , Syngenta International AG). Οι δ.ο. διαλύονταν σε μεθανόλη (GC/MS grade, 99.9%, Carlo Erba Reagents, val de Reuil, France) για την παρασκευή διαλυμάτων συγκεντρώσεων 10, 100, 1.000 και 10.000 μg·mL<sup>-1</sup>, τα οποία διατηρούνταν στους -20°C.

Για την εκχύλιση μεταβολιτών του ενδο-μεταβολόματος του *S. cerevisiae*, αξιολογήθηκαν τα συστήματα μεθανόλη και μίγμα μεθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα 50:50, v/v (GC/MS grade, καθαρότητας 99.9%, Carlo Erba Reagents, val de Reuil, France). Για την προετοιμασία των δειγμάτων για GC/EI/MS μεταβολομική ανάλυση, χρησιμοποιήθηκε πυριδίνη (99.8%), methoxylamine hydrochloride (MeOX) (98% β/β), N-methyl-N-(trimethyl-silyl) trifluoroacetamide (MSTFA) (Sigma-Aldrich). Τα αναλυτικά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν για την απόλυτη ταυτοποίηση των μεταβολιτών ήταν επίσης της εταιρίας Sigma-Aldrich.

### 3.2. Βιολογικό υλικό

Το άγριο και τα μεταλλαγμένα στελέχη του *S. cerevisiae* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα, παραχωρήθηκαν από την ομάδα της Καθηγήτριας Susan Michaelis του John Hopkins University (School of Medicine, Department of Cell Biology, USA). Τα ονόματα και οι αντίστοιχοι γονότυποι των στελεχών αναφέρονται στον *Πίνακα* 4. Όλα τα στελέχη είναι συζευκτικού τύπου *MATa*.

Το στέλεχος *BY4741*, το οποίο από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως **wildtype** (**Wt**), προέρχεται από το στέλεχος *S288C*. Οι μεταλλαγές που περιέχονται στο γονιδίωμα του στελέχους, περιλαμβάνουν μεταλλαγές στα γονίδια της ιστιδίνης (*his3*), λευκίνης (*leu2*), ουρακίλης (*ura3*) και μεθειονίνης (*met15*) (Huyer et al., 2004).

Κωδική	Κωδικοί	Γονότυπος	Βιβλιογραφία
ονομασία	Στελεχών		
Wt	BV4741	his3 lou2 mot15 ura3	(Huyer et al.,
		niss leuz metro uras	2004)
Avef1	SM5270	his 2 lou 2 mot 15 ura 3 VCE1. Kan MX	(Paumi et al.,
дуст	01010270		2007)
∆pdr5	SM5867	his3 leu2 met15 ura3 pdr5∆::KAN	Μη δημοσιευμένο
	trp1 leu2 ura3 his4 can1 ∆ycf1	(Mason and	
puras-ruri	5-1CF1 51014517	[2µ URA3 YCF1]	Michaelis, 2002)
pURA3	SM4516	trp1 leu2 ura3 his4 can1 ∆ycf1	(Mason and
		[2µ <i>URA3</i> ]	Michaelis, 2002)

Πίνακας 4. Γενετικά χαρακτηριστικά και κωδικές ονομασίες στελεχών Saccharomyces cerevisiae τα οποία μελετήθηκαν.

Το στέλεχος *SM5270*, το οποίο από εδώ και στο εξής θα αναφέρεται ως **Δycf1**, είναι ισογονιδιακό με το Wt και ταυτόχρονα μέσω μετασχηματισμού, έχει διαγραφεί το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ABC μεταφορέα, YCF1, με την κασέτα KanMX η οποία προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη (resistance marker) (Paumi et al., 2007).

Το στέλεχος SM5867 (μη δημοσιευμένο), το οποίο στη συνέχεια θα αναφέρεται ως **Δpdr5**, είναι ισογονιδιακό με το Wt και όπως στο Δycf1, έχει διαγραφή το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ABC μεταφορέα PDR5 με τη κασέτα KanMX.

Το στέλεχος *SM4517*, που θα αναφέρετε στην παρούσα μελέτη ως **pURA3**-**YCF1**, υπερεκφράζει το μεταφορέα YCF1 (Mason and Michaelis, 2002). Πιο συγκεκριμένα, έχει μεταλλαγές στα γονίδια που κωδικοποιούν για τρυπτοφάνη (*trp1*), λευκίνη (*leu2*), ουρακίλη (*ura3*), ιστιδίνη (*his4*) και για την περμεάση αργινίνης (*can1*). Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί διαγραφή του γονιδίου του YCF1 μεταφορέα, στο χρωμοσωμικό του DNA, και το στέλεχος φέρει πλασμίδιο το οποίο περιέχει το γονίδιο παραγωγής ουρακίλης (*URA3*) (marker gene) και αντίγραφο του γονιδίου του YCF1 μεταφορέα υπό τον έλεγχο υποκινητή που οδηγεί στην υπερέκφρασή του.

Το στέλεχος SM4516 που θα αναφέρεται στη παρούσα μελέτη ως **pURA3** είναι ισογενετικό με το pURA3-YCF1 καθώς προέρχονται από το ίδιο γονικό στέλεχος (SM3851) (Mason and Michaelis, 2002), με τη διαφορά ότι το πλασμίδιο που περιέχει φέρει μόνο το γονίδιο ουρακίλης (URA3).

# 3.3. Δομές δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη και συσχέτισή τους

Οι τρισδιάστατες χημικές δομές των δ.ο. που αξιολογήθηκαν, οπτικοποιήθηκαν σε διαστάσεις μέσω TOU προγράμματος UCSF Chimera τρεις (https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/), εισάγοντας τον κωδικό CID της βάσης δεδομένων PubChem (Pettersen et al., 2004). Στη συνέχεια, μέσω της ηλεκτρονικής πλατφόρμας ChemMine Tools, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των δομών με βάση τον συντελεστή Tanimoto (Tanimoto Coefficient, Tc) οποίος εκφράζει την ομοιότητα μεταξύ χημικών ουσιών (binary fingerprinting) (Cao et al., 2008, Backman et al., 2011) Όταν ο συντελεστής Τς πλησιάζει το μηδέν οι συγκρινόμενες ουσίες διαφέρουν σημαντικά ενώ όταν πλησιάζει τη μονάδα είναι όμοιες (Jónsdóttir et al., 2005).

Πιο συγκεκριμένα, τα δεδομένα εισήχθησαν στην πλατφόρμα σύμφωνα με τον κωδικό CID της βάσης δεδομένων PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/), όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά συστάδες (Hierarchical Clustering) για τη σύγκριση της ομοιότητας των δομών σύμφωνα με την εξίσωση 1-Tc και στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη συσσωρευτική μέθοδο (agglomerative clustering) με πλήρη σύνδεση των δεδομένων (complete linkage) δημιουργώντας το τελικό heatmap( (Backman et al., 2011).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε πολυδιάστατη κανονικοποίηση (MultiDimensinal Scaling, MDS) σε δυο διαστάσεις για την οπτικοποίηση της ομοιότητας των χημικών δομών με όριο ομοιότητας (similarity cutoff) το 0.9 σύμφωνα με τον συντελεστή Tanimoto.

# 3.4. Θρεπτικά υποστρώματα για την καλλιέργεια του αγρίου και μεταλλαγμένων στελεχών του Saccharomyces cerevisiae

## 3.4.1. Θρεπτικό υπόστρωμα Yeast extract Peptone (YPD)

Η παρασκευή του θρεπτικού υλικού YPD και YPD agar πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρωτόκολλο που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Bergman, 2001) (Πίνακας 5).

Κατάλληλες ποσότητες εκχυλίσματος ζύμης (HiMedia Laboratories Mumbai, India), πεπτόνης (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) και bacto agar (Lab M Limited, Lancanshire, United Kingdom) στην περίπτωση της στερεής καλλιέργειας, προστίθονταν σε μπουκάλια τύπου Duran που περιείχαν επιθυμητή ποσότητα απεσταγμένου νερού και ακολουθούσε αποστείρωσή τους σε κλίβανο υγρής θερμότητας (120°C, 20 λεπτά). Κατά την δημιουργία υγρού θρεπτικού υλικού YPD δεν πραγματοποιούνταν προσθήκη άγαρ. Για τη D-γλυκόζη (Sigma-Aldrich), παρασκευαζόταν stock διάλυμα 20% β/ό σε απεσταγμένο νερό, το οποίο στη συνέχεια αποστειρωνόταν με φίλτρα (διάμετρος πόρων 0,2 μm, Filtres Fioroni). Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, ακολουθούσε προσθήκη κατάλληλης ποσότητας γλυκόζης, ώστε η τελική της συγκέντρωσή της στο θρεπτικό υπόστρωμα να είναι 2% (β/ό).

Υλικό	Ποσότητα (g·L⁻¹)
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	10
Πεπτόνη από καζεΐνη	20
Bacto Agar	15
D-γλυκόζη	2% β/ό (τελική συγκέντρωση)

Πίνακας 5. Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος Yeast extract Peptone (YPD) για την καλλιέργεια στελεχών του Saccharomyces cerevisiae.

# 3.4.2.Θρεπτικό υπόστρωμα Standard Minimal (SD)

Για την ανάπτυξη και μελέτη των στελεχών που περιείχαν πλασμίδια, παρασκευαζόταν κατάλληλο θρεπτικό υλικό χωρίς αμινοξέα με τις κατάλληλες αυξοτροφίες (*Πίνακας* 6) (Schwelberger, 2012). Τα διαλύματα συμπυκνωμένων αμινοξέων 200X παρασκευάστηκαν με την προσθήκη της επιθυμητής ποσότητας των αμινοξέων σε κρυσταλλική μορφή, σε αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό.

Πίνακας 6. Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος SD και SD agar για την ανάπτυξη στελεχών pURA3-YCF1 και pURA3 του Saccharomyces cerevisiae.

Υλικό	Ποσότητα
Yeast extract χωρίς αμινοξέα	6,7 g·L⁻¹
Bacto Agar	15 g⋅L <sup>-1</sup>
20% D-γλυκόζη	2% (β/ό) τελική συγκέντρωση
L-histidine	20 µg⋅mL⁻¹
L-leucine	60 µg⋅mL⁻¹
L-tryptophan	40 µg∙mL⁻¹
Δημιουργία συμπυκνωμάτων αμινοξέων:	
L-histidine (συμπύκνωμα 200X) L-leucine (συμπύκνωμα 200X)	40 mg 10 mL <sup>-1</sup> 120 mg 10 mL <sup>-1</sup>

Η κατάλληλη ποσότητα του εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) προστίθονταν σε μπουκάλια τύπου Duran και αποστειρωνόταν σε κλίβανο υγρής θερμότητας (120°C, 20 λεπτά). Κατά την δημιουργία υγρού θρεπτικού υλικού SD δεν πραγματοποιούνταν προσθήκη Bacto Agar (Lab M Limited). Μετά το πέρας της αποστείρωσης, ακολουθούσε η προσθήκη D-γλυκόζης (Sigma-Aldrich) και αμινοξέων υπό ασηπτικές συνθήκες. Η γλυκόζη προερχόταν από διάλυμα stock (20% β/ό), το οποίο είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με φίλτρα (διάμετρος πόρων 0,2 μm, Filters Fioni).

80 mg 10 mL<sup>-1</sup>

L-tryptophan (συμπύκνωμα 200X)

# 3.5. Μέτρηση της πυκνότητας καλλιεργειών κυττάρων του Saccharomyces cerevisiae με χρήση αιματοκυττόμετρου

Δείγματα από υγρές καλλιέργειες (20 μL) τοποθετούνταν σε κάθε σταυρό του αιματοκυττόμετρου (Neubauer Improved Bright-Line, Hirscmann Technocolor) (*Εικόνα* 25). Η πυκνότητα των κυττάρων στο δείγμα προέκυπτε από την εξίσωση:

Συγκέντρωση κυττάρων (cell  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) = (Άθροισμα κυττάρων)  $\cdot$  (Συντελεστής αραίωσης)  $\cdot$  10<sup>4</sup>

όπου, το άθροισμα των κυττάρων προκύπτει από τη μέτρηση του αριθμού κυττάρων στα 25 τετράγωνα, τα οποία μετά την προσθήκη της καλυπτρίδας περιέχουν 0,1 mm<sup>3</sup> όγκο αιωρήματος, καθώς το βάθος του θαλαμίσκου ισούται με 0,1 mm. Το γινόμενο που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με τον παράγοντα 10<sup>4</sup>, ο οποίος αντιστοιχεί στον αριθμό κυττάρων στο 1 mL.

# 3.6. Μέτρησης οπτικής πυκνότητας καλλιεργειών κυττάρων του Saccharomyces cerevisiae με χρήση φασματοφωτόμετρου.

Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης υγρών καλλιεργειών πραγματοποιούνταν με φασματόμετρο Uvikon 922 (Kontron Instruments, Augsburg, Germany) (*Εικόνα* 26). Στη μία θέση του φασματόμετρου τοποθετούνταν κυψελίδα (χωρητικότητας 1 mL) που περιείχε 1 mL θρεπτικού υλικού για την αφαίρεση της οπτικής απορρόφησης που οφείλεται στο θρεπτικό υπόστρωμα, και στη δεύτερη θέση του φασματόμετρου τοποθετούνταν κυψελίδα (1 mL) με δείγμα από την υγρή καλλιέργεια. Η οπτική απορρόφηση μετρούνταν στα 600 nm (Bergman, 2001).

Η μέθοδος μέτρησης οπτικής πυκνότητας χρησιμοποιούνταν για την ταχεία μέτρηση της πυκνότητας των κυττάρων στις καλλιέργειες του σακχαρομύκητα σε θρεπτικό YPD. Πιο συγκεκριμένα, μετά τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης, υπολογιζόταν η πυκνότητα των κυττάρων στο αιώρημα σύμφωνα με την εξίσωση


**Εικόνα 25.** Αντικειμενοφόρος αιματοκυττόμετρου Neubauer Improved Bright-Line, (Hirscmann Technocolor). Κάθε θέση μέτρησης (σταυρός) αποτελείται από 9 μεγάλα τετράγωνα που το καθένα διαιρείται σε 25 μικρότερα. Κάθε ένα από τα 25 τετράγωνα διαιρείται σε 16 μικρότερα τετράγωνα, με το καθένα να έχει εμβαδόν 0,0025 mm<sup>2</sup>.



**Εικόνα 26.** Φασματοφωτόμετρο Uvikon 922 (Kontron Instruments, Augsburg, Germany) για την καταγραφή της οπτικής απορρόφησης υγρών καλλιεργειών του Saccharomyces cerevisiae σε YPD θρεπτικό.

που προέκυψε από την καμπύλη συσχέτισης οπτικής απορρόφησης-αριθμού κυττάρων (*Εικόνα* 39):

$$x = \frac{y \cdot 10^8}{9}$$

όπου, x = αριθμός κυττάρων και y = οπτική απορρόφηση που καταγράφηκε στα 600 nm.

### 3.7. Αξιολόγηση της ζωτικότητας κυττάρων του Saccharomyces cerevisiae χρησιμοποιώντας μπλε του μεθυλενίου

Η διάκριση των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα πραγματοποιούνταν με βαφή των κυττάρων με μπλε του μεθυλενίου. Μετά από καλή ανάδευση των καλλιεργειών μεταφέρονταν 20 μL σε αντικειμενοφόρο και προστίθονταν απευθείας πάνω στη σταγόνα που δημιουργούνταν, 5 μL μπλε του μεθυλενίου. Μετά το πέρας 10 λεπτών πραγματοποιούνταν παρατήρηση στο μικροσκόπιο. Τα ζωντανά κύτταρα μεταβολίζουν τη βαφή και αποκτούν λευκό χρώμα, ενώ τα νεκρά κύτταρα δεν τη μεταβολίζουν παραμένοντας μπλε (Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza, 2014).

#### 3.8. Διατήρηση στελεχών του Saccharomyces cerevisiae

#### 3.8.1. Μικρής διάρκειας διατήρηση

Η μικρής διάρκειας διατήρηση των στελεχών του *S. cerevisiae* πραγματοποιούνταν σε τρυβλία Petri (90x15 mm), τα οποία περιείχαν 20 mL θρεπτικού υλικού YPD agar ή SD agar με τις κατάλληλες αυξοτροφίες. Οι καλλιέργειες σφραγίζονταν με ταινία parafilm για την αποφυγή ξήρανσής τους. Η επώαση των καλλιεργειών πραγματοποιούνταν σε θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία (30°C) στο σκοτάδι. Μετά την επώαση των καλλιεργειών για χρονικό

διάστημα 6 ήμερων, μεταφέρονταν και αποθηκεύονταν σε ψυγείο (θερμοκρασία 4°C) (*Εικόνα 27*). Ανά τρεις μήνες, πραγματοποιούνταν ανανεώσεις των τρυβλίων, με καινούργιες αποικίες εμβολιασμένες από τα stock γλυκερόλης που ήταν αποθηκευμένα στον υπερκαταψύκτη (-80°C).



**Εικόνα 27.** Αποικίες στελέχους Saccharomyces cerevisiae σε στερεή καλλιέργεια (YPD agar) μετά την επώαση τους στους 30 °C για 6 ήμερες.

#### 3.8.2. Μακράς διάρκειας διατήρηση

Για τη μακρά διατήρηση των στελεχών, δημιουργήθηκαν stock γλυκερόλης, τα οποία περιείχαν γλυκερόλη (Carlo Erba Reagents), ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate-buffered saline (PBS) και ποσότητα υγρής καλλιέργειας των στελεχών (*Πίνακας 7*). Τα στελέχη αναπτύσσονταν σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPD ή SD και επωάζονταν έως ότου η καλλιέργεια να φτάσει στη στατική φάση ανάπτυξης. Το ρυθμιστικό διάλυμα PBS, παρασκευαζόταν με την προσθήκη των κατάλληλων ποσοτήτων αλάτων (*Πίνακας 8*), στον επιθυμητό όγκο απεσταγμένου νερού, και το pH ρυθμίζονταν στο 7,4. Στη συνέχεια το ρυθμιστικό διάλυμα αποστειρωνόταν σε κλίβανο υγρής θερμότητας (120°C, 20 λεπτά) και αποθηκευόταν στο ψυγείο στους 4°C. Τα stock αποθηκεύθηκαν στον υπερκαταψύκτη (-80 °C).

Πίνακας 7. Σύσταση stock γυκερόλης για μακράς διάρκειας διατήρηση στελεχών Saccharomyces cerevisiae.

Υλικό	Ποσότητα (μL)
PBS ρυθμιστικό διάλυμα	380
Υγρή καλλιέργεια στη στατική φάση ανάπτυξης	750
Γλυκερόλη	380

Πίνακας 8. Σύσταση PBS ρυθμιστικού διαλύματος για δημιουργία stock μακράς διάρκειας διατήρηση στελεχών Saccharomyces cerevisiae.

Άλατα	Συγκέντρωση (g·L⁻¹)
NaCl	8
KCI	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.42
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24

# 3.9. Προετοιμασία καλλιεργειών για τη μελέτη της ευαισθησίας των στελεχών στα επιλεγμένα μυκητοκτόνα και τα πειράματα μεταβολομικής

Οι βιοδοκιμές για τη μελέτη της ευαισθησίας των στελεχών στα επιλεγμένα μυκητοκτόνα και τα πειράματα μεταβολομικής, πραγματοποιούνταν με κύτταρα καλλιεργειών που βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Για τη δημιουργία καλλιέργειας σε εκθετική φάση ανάπτυξης, αρχικά εμβολιαζόταν καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (YPD ή SD), με εμβόλιο 2-3 αποικίες από τα τρυβλία μικρής διάρκειας διατήρησης. Στις βιοδοκιμές

στελεχών Wt, Δycf και Δpdr5 που αναπτύσσονται σε πλούσιο θρεπτικό υλικό YPD, χρησιμοποιούνταν είτε μπουκάλια τύπου Duran (250 mL) που περιείχαν 50 mL θρεπτικού υλικού είτε πλαστικοί σωλήνες τύπου falcon (50 mL) με 10 mL θρεπτικού υλικού, στα οποία πραγματοποιούνταν ο εμβολιασμός των στελεχών από τα τρυβλία μικρής διάρκειας. Στις βιοδοκιμές στελεχών pURA3 και pURA3-YCF1, τα οποία αναπτύσσονταν σε SD θρεπτικό υλικό χρησιμοποιούνταν πλαστικοί σωλήνες τύπου falcon (50 mL) με 5 mL θρεπτικού υλικού. Η επώαση των καλλιεργειών πραγματοποιούνταν σε οριζόντιο θάλαμο υπό συνεχόμενη ανακίνηση (30°C, 250 rpm) (ZHWY-211B, Rocking incubator, Zhicheng, Shanghai, China) (Εικόνα 28). Την επόμενη μέρα, οι καλλιέργειες είχαν αναπτυχθεί, χωρίς να είναι δυνατός ο προσδιορισμός της φάσης ανάπτυξής τους. Ακολουθούσε νέος εμβολιασμός με συγκεκριμένο όγκο εμβολίου και συγκέντρωση κυττάρων, ανάλογα με τη μεθοδολογία του πειράματος, σε μπουκάλια ή πλαστικούς σωλήνες τύπου falcon, που παρείχαν τα κατάλληλα θρεπτικά υλικά. Ακολουθούσε επώαση των καλλιεργειών και η εκθετική φάση ανάπτυξης αναμενόταν σε χρονικό διάστημα που είχε προκύψει από την καταγραφή του ρυθμού ανάπτυξης και κατά το οποίο γινόταν το εκάστοτε πείραμα.

### 3.10.Συσχέτιση της πυκνότητας υγρών καλλιεργειών του Saccharomyces cerevisiae με την οπτική τους πυκνότητα

Για την αυτοματοποίηση της μέτρησης της πυκνότητας καλλιεργειών του *S.* cerevisiae απαιτούνταν η συσχέτιση μεταξύ της οπτικής απορρόφησης και πυκνότητάς τους. Από καλλιέργειες που είχαν αναπτυχθεί έως τη στατική φάση, μεταφέρονταν 1 mL σε eppendorf tubes για τη μέτρηση του αριθμού των κυττάρων στο αιματοκυττόμετρο και ταυτόχρονα 1 mL σε δοκιμαστικούς σωλήνες για τη μέτρηση της οπτικής τους απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο (*Εικόνα 29*). Πραγματοποιούνταν 3 επαναλήψεις.



**Εικόνα 28.** Οριζόντιος επωαστικός ZHWY-211B, Rocking incubator (Zhicheng Instruments, Shanghai, China) που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη καλλιεργειών στελεχών του σακχαρομύκητα σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα YPD και SD.



**Εικόνα 29.** Πειραματική διαδικασία σχεδιασμού καμπύλης συσχέτισης πυκνότητας-οπτικής απορρόφησης καλλιεργειών κυττάρων, στελέχους του Saccharomyces cerevisiae σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα YPD.

Ακολουθούσε μέτρηση στο αιματοκυττόμετρο και υπολογισμός της πυκνότητας των κυττάρων στην αρχική καλλιέργεια. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (600 nm) στο φασματοφωτόμετρο. Αρχικά μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση στο αρχικό δείγμα και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις (1/10 και ½) έως ότου η τιμή της οπτικής απορρόφησης ήταν μικρότερη από 0,001. Στη συνέχεια, υπολογιζόταν ο αριθμός των κυττάρων που αντιστοιχεί στις αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο και σχεδιάστηκε η καμπύλη συσχέτισης οπτικής απορρόφηση.

Η εξίσωση που περιγράφει τη γραμμή τάσης, χρησιμοποιούνταν για το γρήγορο υπολογισμό του αριθμού κυττάρων σε υγρές καλλιέργειες με YPD θρεπτικό υλικό.

#### 3.11. Μελέτη ρυθμού ανάπτυξης υγρών καλλιεργειών των στελεχών του Saccharomyces cerevisiae

Ο ρυθμός ανάπτυξης της εκάστοτε καλλιέργειας του S. cerevisiae επηρεάζεται από τον όγκο και τη συγκέντρωση του εμβολίου, τον όγκο και το είδος του θρεπτικού υλικού (φτωχό ή πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά). Λόγω των διαφορετικών πειραματικών αναγκών, πραγματοποιούνταν καταγραφή της ανάπτυξης κάθε φορά που άλλαζε μία από αυτές τις παραμέτρους.

Για την καταγραφή του ρυθμού ανάπτυξης των στελεχών pURA3 και pURA3-YCF1 σε φτωχό θρεπτικό υλικό, από υγρές καλλιέργειές τους σε υλικό SD, ηλικίας μίας ημέρας, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός 10 μL αιωρήματος, συγκέντρωσης 10<sup>6</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup>, σε πλαστικούς σωλήνες τύπου falcon (50 mL) οι οποίοι περιείχαν 5 mL θρεπτικού υλικού με τις κατάλληλες αυξοτροφίες. Οι καλλιέργειες επωάζονταν υπό συνεχή ανακίνηση στον οριζόντιο επωαστικό (30°C, 250 rpm). Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν καταγραφή της συγκέντρωσης των κυττάρων στο αιματοκυττόμετρο μετά από 22, 47 και 72 ώρες επώασης.

Η καταγραφή του ρυθμού ανάπτυξης των στελεχών Wt, Δycf1 και Δpdr5 σε YPD θρεπτικό υπόστρωμα, πραγματοποιούνταν σε όγκο θρεπτικού υλικού, 10 mL. Πιο συγκεκριμένα, από υγρές καλλιέργειες των στελεχών Wt, Δycf1 και Δpdr5 ηλικίας μίας ημέρας, πραγματοποιούνταν εμβολιασμός 10 μL αιωρήματος, συγκέντρωσης 10<sup>5</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup> σε πλαστικούς σωλήνες τύπου falcon (50 mL) που περιείχαν 10 mL θρεπτικού υλικού YPD. Οι καλλιέργειες επωάζονταν υπό συνεχή ανακίνηση σε οριζόντιο επωαστικό θάλαμο (30°C, 250 rpm). Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν αυτοματοποιημένα ο υπολογισμός της πυκνότητας των κυττάρων, μετά από τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των καλλιεργειών στα 600 nm μετά από 21, 26, 44, 48, και 70 ώρες επώασης.

Τέλος, καταγράφηκε ο ρυθμός ανάπτυξης του Wt σε 50 mL YPD θρεπτικού υλικού. Από υγρές καλλιέργειες του στελέχους Wt, ηλικίας μιας ημέρας πραγματοποιούνταν εμβολιασμός 10 μL αιωρήματος, συγκέντρωσης 10<sup>5</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup> σε μπουκάλια τύπου Duran των 250 mL που περιείχαν 50 mL θρεπτικού υλικού YPD. Οι καλλιέργειες επωάζονταν με συνεχή ανακίνηση στον οριζόντιο επωαστικό (30°C, 250 rpm). Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν αυτοματοποιημένα ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων μετά από μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (600 nm) στο φασματόμετρο. μετά από 17, 24, 26, 41, 45, 50, 68 και 120 ώρες επώασης.

#### 3.12. Αξιολόγηση ευαισθησίας των στελεχών pURA3 και pURA3-YCF1 του Saccharomyces cerevisiae σε μυκητοκτόνα

Για τη μελέτη της τοξικότητας μυκητοκτόνων στα στελέχη που διαθέτουν πλασμίδια, παρασκευαζόταν κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού SD με κατάλληλες αυξοτροφίες (*Πίνακας* 6). Μετά την επώαση της καλλιέργειας έως την εκθετική φάση (44 ώρες επώασης), πραγματοποιούνταν αραίωση των κυττάρων σε συγκέντρωση 10<sup>6</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup> σε θρεπτικό υλικό SD και εμβολιάζονταν 10 μL του αιωρήματος σε πλαστικούς σωλήνες τύπου falcon (50 mL) που περιείχαν 5 mL θρεπτικού υλικού με τα μυκητοκτόνα flusilazole, fenpropimorph, prochloraz και benzovindiflupyr στις συγκεντρώσεις των 0,01 και 1 μg·mL<sup>-1</sup>. Με σκοπό να συνυπολογιστεί η τοξικότητα του διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε, προστίθονταν ίση ποσότητα διαλύτη στο μάρτυρα (50 μL μεθανόλης).

Μετά την επώαση των καλλιεργειών για 47 ώρες (τέλος εκθετικής φάσης) στον οριζόντιο θάλαμο με συνεχή ανακίνηση (30°C, 250 rpm), υπό ασηπτικές συνθήκες

απομακρύνονταν 500 μL από κάθε καλλιέργεια και ακολουθούσε μέτρηση της συγκέντρωσης στο αιματοκυττόμετρο. Πραγματοποιούνταν 3 επαναλήψεις ανά επέμβαση.

Ο αριθμός των κυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία των μυκητοκτόνων καταγραφόταν και στη συνέχεια υπολογιζόταν η σχετική ανάπτυξη ανά δ.ο. σύμφωνα με την εξίσωση:

Σχετική ανάπτυξη στελέχους =  ${A 
ho ι heta \mu ext{ o} \zeta ext{ kutt t} heta 
ho w \pi heta 
ho v u heta 
ho \mu heta ext{ kutt}} A 
ho ι heta \mu heta ext{ kutt} heta 
ho w \mu heta 
ho ext{t} heta 
ho w$ 

Στη συνέχεια υπολογιζόταν η σχετική ανάπτυξη του στελέχους με υπερεκφρασμένο το μεταφορέα (pURA3-YCF1) με το στέλεχος με διαγεγραμμένο το γονίδιο που κωδικοποιεί τον YCF1 μεταφορέα (pURA3), ως εξής:

Σχετική ανάπτυξη (μη ευαισθησία) =  $\frac{\Sigma \chi ετική ανάπτυξη pURA3 - YCF1}{\Sigma \chi ετική ανάπτυξη pURA3}$ 

# 3.13. Αξιολόγηση ευαισθησίας του αγρίου (Wt) και μεταλλαγμένων στελεχών Δycf1, Δpdr5 του Saccharomyces cerevisiae στο cycloheximide

To cycloheximide επιλέχθηκε για την αξιολόγηση του μεταφορά YCF1 σε σχέση με τον PDR5 καθώς είναι γνωστό πως αποτελεί υπόστρωμα του PDR5 μεταφορέα (Golin et al., 2000, Snider et al., 2013). Ο μηχανισμός δράσης του περιλαμβάνει την παρεμπόδιση πρωτεϊνοσύνθεσης, κατά τη μετατόπιση του tRNA (translocation step) (Schneider-Poetsch et al., 2010).

Μετά την επώαση των καλλιεργειών έως την εκθετική φάση ανάπτυξης, πραγματοποιούνταν αραίωση των κυττάρων σε συγκέντρωση 10<sup>5</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup> και εμβολιασμός 10 μL του αιωρήματος, σε πλαστικούς σωλήνες τύπου falcon (50 mL) που περιείχαν 10 mL YPD θρεπτικού υλικού με το cycloheximide σε συγκεντρώσεις των 0,01, 0,05, 0,1 και 1 μg·mL<sup>-1</sup>. Στον μάρτυρα προστίθονταν ίση ποσότητα του διαλύτη (100 μL μεθανόλης) για να συνυπολογιστεί η τοξικότητα του διαλύτη της δ.ο. Μετά την επώαση των καλλιεργειών για 27 ώρες (εκθετική φάση ανάπτυξης) στο οριζόντιο θάλαμο υπό συνεχή ανακίνηση (30°C, 250rpm), απομακρύνονταν υπό ασηπτικές συνθήκες 1 mL ανά επέμβαση, και καταγραφόταν η οπτική απορρόφηση στο φασματόμετρο. Πραγματοποιούνταν 3 επαναλήψεις.

# 3.14. Αξιολόγηση ευαισθησίας του αγρίου (Wt) και μεταλλαγμένων στελεχών Δycf1, Δpdr5 του Saccharomyces cerevisiae σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα

Κατά την αξιολόγηση ευαισθησίας των στελεχών σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα ακολουθήθηκε η μεθοδολογία που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.13. Η συγκέντρωση στην οποία εξετάστηκαν τα στελέχη ήταν 1 μg·mL<sup>-1</sup> για τις δ.ο. prochloraz, flusilazole, fenpropimorph, και 0,1 μg·mL<sup>-1</sup> για το chlorothalonil. Μετά την επώαση των καλλιεργειών για 27 ώρες (εκθετική φάση ανάπτυξης) στους 30°C με συνεχή ανάδευση (250rpm), υπό ασηπτικές συνθήκες απομακρύνονταν 1 mL ανά επέμβαση και καταγραφόταν η οπτική απορρόφηση. Πραγματοποιούνταν 3 επαναλήψεις.

# 3.15. Προσδιορισμός της δόσης μέσης παρεμπόδισης (EC<sub>50</sub>) του τριαζολικού μυκητοκτόνου flusilazole στο Saccharomyces cerevisiae

Για την εύρεση της επίδρασης του μυκητοκτόνου flusilazole πραγματοποιήθηκε πείραμα αξιολόγησης της τοξικότητάς του, κατά το οποίο ο οργανισμός εκτέθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις του μυκητοκτόνου. Σε μπουκάλια τύπου Duran των 250mL, που περιείχαν 50 mL πλούσιου θρεπτικού υλικού (YPD), προστίθονταν κατάλληλες ποσότητες flusilazole και δημιουργούνταν οι συγκεντρώσεις 0,001, 0,005, 0,01, 0,03, 0,05 και 1 μg·mL<sup>-1</sup>. Το εμβόλιο αποτελούνταν από 10<sup>5</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup>, ηλικίας μιας ημέρας και είχε όγκο 10 μL. Μετά την επώασή τους (30 °C) για 39 ώρες (εκθετική φάση ανάπτυξης), καταγραφόταν η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 600 nm και σχεδιάστηκε η καμπύλη δραστικότητας σύμφωνα με την παρεμπόδιση επί τοις εκατό του μάρτυρα. Πραγματοποιούνταν 3 επαναλήψεις. Τέλος με τη μεθόδο Probit, πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός της τιμής EC<sub>50</sub>.

## 3.16. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση πρωτόκολλου εκχύλισης του ενδο-μεταβολόματος (endo-metabolome) του Saccharomyces cerevisiae.

Από καλλιέργεια του Wt δημιουργήθηκαν 3 δείγματα με πυκνότητες κυττάρων 2.10<sup>8</sup>, 10<sup>8</sup> και 10<sup>7</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup>. Στα δείγματα πραγματοποιούνταν διακοπή του μεταβολισμού (quenching) με κρύα μεθανόλη (-40°C) και η παραλαβή των κυττάρων σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Canelas et al. (Canelas et al., 2008). Οι διαλύτες που εξετάστηκαν για την εκχύλιση των μεταβολιτών του ενδομεταβολόματος (endometabolome) ήταν η κρύα μεθανόλη (Canelas et al., 2008) και το σύστημα διαλυτών μεθανόλη : οξικού αιθυλεστέρα (1:1, v/v) (Aliferis and al., 2013). Н Jabaji, 2010, Aliferis et εξαγωγή των μεταβολιτών πραγματοποιούνταν σύμφωνα με τη μεθοδολογία "Freezing-Thawing in Methanol Extraction (FTM) " (Canelas et al., 2009) με τροποποιήσεις. Η μεθοδολογία παρουσιάζεται στην Εικόνα **30**. Μετά то τέλος της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων.

Στη συνέχεια, ακολουθούσε κοινός χειρισμός για όλα τα δείγματα, όπου τοποθετούνταν σε λουτρό υπερήχων (Branson 1210, Danbury, USA) για 20 λεπτά και στη συνέχεια σε οριζόντιο αναδευτήρα (GFL 3006, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burfwedel, Germany), για 45 λεπτά. Τα δείγματα φιλτράρονταν με φίλτρο 0.2 μm (Macherey-Nagel, Duren, Germany) και τοποθετούνταν σε νέα eppendorf tubes και ακολουθούσε εξάτμιση των δειγμάτων σε συμπυκνωτή κενού (vacum concentrator, Labconco, Kansas City, MO,USA).

Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν παραγωγοποίηση των δειγμάτων, κατά την οποία προστίθονταν 80 μL MeOX (O-methylhydroxylamine hydrochloride σε πυριδίνη) και τα δείγματα μεταφέρονταν σε υδατόλουτρο (Daihan Labtech, Gyeonggi-do, Korea) για 2 ώρες (Aliferis et al., 2013). Στο στάδιο, αυτό σταθεροποιούνται οι καρβονυλικές ομάδες των μεταβολιτών και δημιουργούνται θερμικά σταθερά παράγωγα των μεταβολιτών (methoximation). Ακολουθούσε η

83

προσθήκη 80μl MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) και η μεταφορά των δειγμάτων σε υδατόλουτρο, όπου παρέμειναν για 1 ώρα και 30 λεπτά. Στο στάδιο αυτό (silylation), πραγματοποιείται η αντικατάσταση των υδρογόνων των πλευρικών ομάδων των μεταβολιτών με [–Si(CH<sub>3</sub>)3] (trimethylsilyl group).

Ακολουθούσε η ανάλυση των δειγμάτων με χρήση GC/EI/MS και η σύγκριση των χρωματογραφημάτων. Τα δεδομένα από τη καλύτερη μεθοδολογία εκχύλιση του ενδο-μεταβολόματος αναλύονταν με το πρόγραμμα AMDIS (AMDIS software v.2.66, NIST; Gaithersburg, MD, USA). Δυνητική ταυτοποίηση των μεταβολιτών πραγματοποιούνταν όταν τα φάσματα μάζας που λαμβάνονταν από τον ανιχνευτή ήταν πανομοιότυπα σε ποσοστό πάνω από 95% με αυτά της βάσης NIST 08 (National Institute of Standards and Technology library, Gaithersburg, MD, USA). Η απόλυτη ταυτοποίηση επιλεγμένων μεταβολιτών πραγματοποιούνταν αναλύοντας πρότυπα διαλύματα όπως προβλέπεται από το Metabolomics Standarad Initiative (MSI) (Fiehn et al., 2007).



Εικόνα 30. Απεικόνιση πειραματικής διαδικασίας για τη παραλαβή του ενδομεταβολόματος του Saccharomyces cerevisiae, τριών δειγμάτων διαφορετικών πυκνοτήτων κυττάρων και τεσσάρων μεθοδολογιών εκχύλιση μεταβολιτών.

### 3.17. Μεταβολομική ανάλυση των στελεχών Wt και Δycf1 του Saccharomyces cerevisiae παρουσία και απουσία flusilazole

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, περιλαμβάνει την έκθεση του οργανισμού σε υποθανάτιες δόσεις του μυκητοκτόνου (EC<sub>50</sub>), την εκχύλιση μεταβολιτών του ενδο-μεταβολόματος, την ανάλυση με GC/EI/MS, την ταυτοποίηση των μεταβολιτών σύμφωνα με βάσεις δεδομένων και την ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών στην τοξικότητα του μυκητοκτόνου με αναλύσεις βιοπληροφορικής (*Εικόνα 31*).



**Εικόνα 31.** Στάδια μεταβολομικής ανάλυσης για τη μελέτη της επίδρασης του μυκητοκτόνου flusilazole στο μεταβολισμό του μοντέλου οργανισμού Saccharomyces cerevisiae.

#### 3.17.1.Πειραματικός σχεδιασμός

Σε 20 μπουκάλια τύπου Duran (250mL), προστίθονταν 50 mL θρεπτικού υλικού YPD και ποσότητα flusilazole, ώστε η τελική συγκέντρωση σε κάθε καλλιέργεια να είναι 0,006 μg·mL<sup>-1</sup> (*Εικόνες 31* και 32). Στον μάρτυρα προστίθονταν ίση ποσότητα του διαλύτη (30 μL μεθανόλης) για να συνυπολογιστεί η επίδραση του

διαλύτη της δ.ο. Στη συνέχεια, εμβολιάζονταν 10 μL συγκέντρωσης 10<sup>5</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup>, από καλλιέργειες των στελεχών που βρίσκονταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Συνοπτικά οι επαναλήψεις και επεμβάσεις είχαν ως εξής (*Εικόνα 32*):

- **BWC** (Wt μάρτυρας), καλλιέργεια του στελέχους Wt παρουσία 30 μL διαλύτη (6 επαναλήψεις)
- BYC (Δycf1 μάρτυρας), καλλιέργεια του στελέχους Δycf1 παρουσία 30 μL διαλύτη (6 επαναλήψεις)
- BWF (Wt flusilazole), καλλιέργεια του στελέχους Wt παρουσία 0.006 μg⋅mL<sup>-</sup>
   <sup>1</sup> flusilazole (6 επαναλήψεις)
- BYF (Δycf1 flusilazole), καλλιέργεια του στελέχους Δycf1 παρουσία 0.006 μg·mL<sup>-1</sup> flusilazole (6 επαναλήψεις)
- QC δείγματα ποιοτικού ελέγχου (quality control) για κάθε μια από τις επεμβάσεις

Μετά την επώαση των υγρών καλλιεργειών για 39 ώρες (εκθετική φάση ανάπτυξης), πραγματοποιούνταν μέτρηση της πυκνότητας των κυττάρων με τη χρήση φασματοφωτόμετρου και στη συνέχεια ακολουθούσε η εκχύλιση των μεταβολιτών (*Εικόνα* 33).

Η άμεση διακοπή του μεταβολισμού (quenching) και η παραλαβή των κυττάρων για την ανάλυση του ενδο-μεταβολόματος (endometabolome), πραγματοποιούνταν σύμφωνα με δημοσιευμένο πρωτόκολλο μετά από βελτιστοποίηση (Canelas et al., 2008). Η εξαγωγή των μεταβολιτών πραγματοποιούνταν σύμφωνα με τη μεθοδολογία "FTM Extraction" (Canelas et al., 2009) μετά από βελτιστοποίηση. Ακολουθούσε ανάδευση, φιλτράρισμα, εξάτμιση και παραγωγοποίηση όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.16. Τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80°C έως την ανάλυσης τους.

86



**Εικόνα 32.** Επεμβάσεις και επαναλήψεις του πειράματος μεταβολομικής σε στελέχη του Saccharomyces cerevisiae: πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις και ένα δείγμα ποιοτικού ελέγχου (QC) για κάθε μάρτυρα και επέμβαση. Wt control (BWC), Δycf1 control (BYC), Wt παρουσία flusilazole (BWF), Δycf1 παρουσία flusilazole (BYF) και δημιουργήθηκε ένα δείγμα ποιοτικού ελέγχου (quality control) ανά επανάληψη,



**Εικόνα 33.** Πρωτόκολλο εκχύλισης για την ανάλυση του ενδο-μεταβολόματος του Saccharomyces cerevisiae.

#### 3.17.2. Παράμετροι αναλύσεων

Για την ανάλυση των μεταβολικών προφίλ στελεχών του *S. cerevisiae*, χρησιμοποιούνταν αέριος χρωματογράφος Agilent 6890 MS (Agilent Technologies Inc.) με αυτόματο δειγματολήπτη (autosampler) 7683, σε συνδυασμό με ανιχνευτή μάζας 5973 inert mass selective detector (MSD) (*Εικόνα 34*). Η στήλη που χρησιμοποιούνταν ήταν η HP-5MS (μήκους 30 m, διαμέτρου 0.25 mm, πάχος υμενίου 0.25 μm, Agilent Technologies Inc.). Η αναλογία έκχυσης ήταν 5:1, η θερμοκρασία 230 °C και το φέρον αέριο ήλιο, με ρυθμό ροής 1 mL min<sup>-1</sup>. Η αρχική θερμοκρασία του κλιβάνου ήταν σταθερή στους 70°C για 5 min, ακολουθούμενη από αύξηση με ρυθμό 5°C min<sup>-1</sup> μέχρι τους 295°C, όπου διατηρούνταν σταθερή για 2 min. Χρησιμοποιούνταν θετικός ιονισμός ηλεκτρονίων στα 70 eV. Τα φάσματα μάζας πλήρους σάρωσης αποκτήθηκαν στην περιοχή μαζών 50-750 Da με ρυθμό 2 σαρώσεις ανά δευτερόλεπτο με αρχική καθυστέρηση καταγραφής σημάτων 10 min. Η θερμοκρασία για τη πηγή MS ήταν 230°C. και για το τετράπολο 150°C.



Εικόνα 34. Αέριος χρωματογράφος Agilent 6890 MS με αυτόματο δειγματολήπτη 7683, σε συνδυασμό με ανιχνευτή μάζας 5973 inert (GC/EI/MS).

Για τον ποιοτικό έλεγχο της ανάλυσης (quality control), τυφλά δείγματα (blanks), για την παρασκευή των οποίων ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο παραγωγοποίησης και ανάλυσης με τα αναλυόμενα δείγματα, αναλύονταν επίσης, προκειμένου να ανιχνευθεί πιθανή ρύπανση από το χειρισμό, την προετοιμασία του δείγματος, τα αντιδραστήρια, τη στήλη ή το όργανο.

## 3.17.3. Ανάλυση των μεταβολικών προφίλ ενδο-μεταβολόματος στελεχών του Saccharomyces cerevisiae και ταυτοποίηση μεταβολιτών

Τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονταν, επεξεργάζονταν και αναλύονταν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.16.

### 3.17.4. Κατασκευή ανοιχτής πρόσβασης βάσης μεταβολιτών του Saccharomyces cerevisiae

Οι μεταβολίτες που καταγράφηκαν σε αυτή τη μελέτη θα δημοσιευθούν σε βάση δεδομένων ανοιχτής πρόσβασης (υπό κατασκευή, https://www.aua.gr/pesticidemetabolomicsgroup/Resources/default.html), με σκοπό την ενίσχυση μελετών μεταβολομικής σακχαρομυκήτων (*Παράρτημα B*). Εφαρμόστηκε μεθοδολογία παρόμοια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για τη βάση μεταβολιτών του *Aspergillus nidulans* η οποία κατασκευάστηκε από την ομάδα μας (https://www.aua.gr/pesticide-

metabolomicsgroup/Resources/libraries/Aspergillus\_nidulans\_PMG\_data\_sets/PM G\_Aspergillus\_nidulans\_metabolite\_library\_list.html ) (Kalampokis et al., 2018).

Η βάση δεδομένων κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας δεδομένα αναλύσεων GC/EI/MS και περιλαμβάνει τα φάσματα μαζών και πληροφορίες για τους μεταβολίτες όπως, τα φάσματα μαζών, το χρόνο κατακράτησης (Retention time), τη μάζα αναφοράς (quantitative mass) και τα στοιχεία Metabolites Common name, Metabolites Derivatives, Synonym(s), KEGG ID, Golm Metabolome Database ID, PubChem ID, CAS Registry Number, Biosynthetic pathway(s), Abbreviated

Biosynthetic pathway(s), Monoisotopic mass (Da), Average Molecular Mass (Da), Molecular Formula και Chemical group (*Παράρτημα B*).

Οι πληροφορίες για τη συμπλήρωση των δεδομένων λαμβάνονταν από τις βάσεις δεδομένων Kegg (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes-GenomeNet, http://www.genome.jp/kegg), PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm. nih.gov/) και Golm Metabolome Database (<u>http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/</u>). Επίσης στη βάση δεδομένων θα περιλαμβάνονται οι πλήρεις συνθήκες ανάλυσης (π.χ. αναλυτής, συνθήκες ανάλυσης).

## 3.17.5. Βιοπληροφορική-μεταβολομική ανάλυση και ανακάλυψη μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του flusilazole στο μεταβολισμό στελεχών του Saccharomyces cerevisiae

Τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονταν, υπόκεινταν σε επεξεργασία για μεταβολομική ανάλυση με το λογισμικό MS DIAL (Tsugawa et al., 2015). Το λογισμικό επιτρέπει την αυτοματοποίηση της προεπεξεργασίας των χρωματογραφημάτων, όπως ευθυγραμμίσεις, διόρθωση των γραμμών βάσης, συμπλήρωμα των κενών δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκαν οι προτεινόμενες ρυθμίσεις για την ανάλυση GC/EI/MS δεδομένων.

Η μήτρα που πρόεκυψε από την ανάλυση με το MS DIAL, εξήχθη στο MS Excel® για περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα, με βάση την ανάλυση των χρωματογραφημάτων με το AMDIS, κορυφές που αντιστοιχούσαν σε ουσίες άσχετες με το αναλυόμενο βιολογικό υλικό και κορυφές με δεδομένα σε λιγότερο από το 50% των επαναλήψεων για κάθε επέμβαση, αφαιρούνταν από περαιτέρω ανάλυση με σκοπό την ενίσχυση της αξιοπιστίας και ακρίβειας της ανάλυσης. Μετά την επεξεργασία αυτή, η μήτρα εξαγόταν στο λογισμικό SIMCA-P v.13.0.3 (Umetrics, MKS Instruments Inc. Umeå, Sweden) για την ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στα δεδομένα και την ανακάλυψη των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών με εφαρμογή πολυπαραγοντικής ανάλυσης (multivariate analysis) (Aliferis and Jabaji, 2010, Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Η ανίχνευση πιθανών ακραίων τιμών πραγματοποιήθηκε με Principal Component Analysis (PCA) και ακολούθησε η ανακάλυψη των βιοσημαντών της επίδρασης του

flusilazole στο μεταβολισμό του *S. cerevisiae* με εφαρμογή Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA, P<0.05) (Aliferis and Jabaji, 2012, Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011). Επίσης, στα δεδομένα εφαρμόστηκε ιεραρχική ανάλυση σε συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA) (Aliferis and Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

Η ανακάλυψη των βιοσημαντών πραγματοποιούνταν με τη χρήση Coefficient plots για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα για τα ζεύγη των επιλεγμένων συγκρίσεων, με διαστήματα εμπιστοσύνης που προέρχονταν από jack-knifing (95%) και S-plots (Wiklund et al., 2008). Τέλος σχεδιάστηκαν οι μεταβολικοί χάρτες (metabolic maps) χρησιμοποιώντας ως διακύμανση για τους μεταβολίτες τιμή Coefficient >2,5 και <-2,5. Για επιλεγμένους μεταβολίτες κατασκευάστηκαν trend plot της διακύμανσης τους παρουσία και απουσία δ.ο.

4.Αποτελέσματα και συζήτηση

### 4.1 Απεικόνιση χημικών δομών δραστικών ουσιών και μελέτη ομοιότητας τους

Η απεικόνιση των χημικών δομών των δ.ο. που χρησιμοποιήθηκαν, πραγματοποιήθηκε με το λογισμικού UCSF Chimera και παρουσιάζονται στις *Εικόνες* 35 και 36). Από τη σύγκριση των χημικών δομών των δ.ο. μέσω του προγράμματος ChemMine Tools, βρέθηκε ομοιότητα μεταξύ των δ.ο. flusilazole και fenpropimorph, benzovindifupyr και prochloraz ενώ οι δ.ο. chlorothalonil, cycloheximide βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά από τις υπόλοιπες εξεταζόμενες δ.ο. (*Εικονα* 37 και 38).



**Εικόνα 35** Τρισδιάστατη απεικόνιση των χημικών δομών μυκητοκτόνων που ανήκουν στους DMIs, flusilazole, fenpropimorph, prochloraz και του βενζιμιδαζολικού benomyl, μέσω του λογισμικού UCSF Chimera.



**Εικόνα 36**. Τρισδιάστατη απεικόνιση των χημικών δομών του benzovindiflupyr (SDHIs), του επιφανειοδραστικού chlorothalonil, και του αντιβιοτικού cylcoheximide, μέσω του λογισμικού UCSF Chimera.



**Εικόνα 37.** MultiDimensional Scaling (MDS) ανάλυση των δομών με το λογισμικό Chemmine Tools, σε δυο διαστάσεις για τις χημικές δομές δ.ο.. με όριο ομοιότητας 0.9.



**Εικόνα 38.** Heatmap με ανάλυση κατά συστάδες (Hierarchical Clustering) μέσω του λογισμικού Chemmine Tools, για την σύγκριση δομών Φ.Π. σύμφωνα με την εξίσωση Tanimoto (Tc), ανάλυση με πλήρη σύνδεση των δεδομένων (complete linkage) και δημιουργία δενδρογράμματος.

### 4.2. Καμπύλη συσχέτισης αριθμού κυττάρων του Saccharomyce cerevisiae και οπτικής πυκνότητας των υγρών καλλιεργειών του

Για την αυτοματοποίηση του υπολογισμό της πυκνότητας των υγρών καλλιεργειών του *S. cerevisiae*, με βάση την οπτική απορρόφηση που καταγράφηκε στο φασματοφωτόμετρο, υπολογίστηκε η καμπύλη συσχέτισης της οπτικής απορρόφησης των καλλιεργειών στα 600 nm και της αντίστοιχης πυκνότητας κυττάρων. Η εξίσωση που περιγράφει τη καμπύλη που προέκυψε ήταν:

 $y = 9 \ 10^{-8} \ x \ (Eikova \ 39).$ 



Αριθμός κυττάρων

Εικόνα 39. Συσχέτιση οπτικής απορρόφησης (600 nm) και αριθμού κυττάρων μετά από διαδοχικές αραιώσεις καλλιέργειας του αγρίου στελέχους του Saccharomyces cerevisiae που βρισκόταν στη στατική φάση ανάπτυξης, σε θρεπτικό υλικό YPD. Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.

### 4.3. Ευαισθησία των στελεχών pURA3 και pURA3-YCF1 του Saccharomyces cerevisiae σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα

Για την ανακάλυψη μυκητοκτόνων στων οποίων την τοξικότητα εμπλέκεται ο μεταφορέας YCF1, πραγματοποιήθηκε πείραμα ευαισθησίας σε επιλεγμένες δ.ο. Ο ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών καταγράφηκε (*Εικόνα 40*) και η εκθετική φάση ανάπτυξης προσδιορίστηκε μετά τις 22 ώρες ανάπτυξης και η στατική μετά από 48 ώρες επώασης.

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η σχετική ανάπτυξη του στελέχους pURA3-YCF1 με το στέλεχος pURA3 και στα αποτελέσματα (*Εικόνα 41*) φαίνεται η στατιστικώς σημαντική μη ευαισθησία του στελέχους που υπερεκφράζει το μεταφορέα, στη συγκέντρωση του 1μg·mL<sup>-1</sup> flusilazole. Το στέλεχος pURA3-YCF1 έχει περίπου 6 φορές μεγαλύτερη ανάπτυξη από το στέλεχος με διαγραμμένο το γονίδιο του μεταφορέα το οποίο υποδηλώνει πως το flusilazole αποτελεί υπόστρωμα του YCF1, κάτι που δεν συμβάινει στην περίπτωση των υπολοίπων SBIs και του SDHI benzovindiflupyr, τα οποία μελετήθηκαν.



Εικόνα 40. Ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών pURA3-YCF1 και pURA3 του Saccharomyces cerevisiae. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε 5 mL υγρού θρεπτικού υλικού SD, με τις κατάλληλες αυξοτροφίες σε οριζόντιο επωαστικό θάλαμο υπό συνεχή ανακίνηση (30°C, 250 rpm). Καταγράφηκε μέσω του αιματοκυττόμετρου η συγκέντρωση των κυττάρων μετά από 22, 47 και 72 ώρες επώασης. Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.



Εικόνα 41. Σχετική ανάπτυξη των στελεχών pURA3-YCF1 και pURA3 του Saccharomyces cerevisiae που ισούται με τον λόγο του αριθμού κυττάρων του στελέχους pURA3-YCF1 προς τον αριθμό κυττάρων του pURA3. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονταν σε SD minimal θρεπτικό με τις κατάλληλες αυξοτροφίες, παρουσία δ.ο. μυκητοκτόνων στις συγκεντρώσεις 0,01 και 1 μg·mL<sup>-1</sup>. Η καταγραφή του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιούνταν στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των καλλιεργειών (47 ώρες επώασης) σε συνθήκες σκότους, υπό συνεχή ανακίνηση (30°C,250 rpm). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τριών επαναλήψεων. Τα διαφορετικά γράμματα στις ράβδους υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές τους με βάση τη στατιστική ανάλυση Student's t-test (α=0,05).

# 4.4. Ευαισθησία του αγρίου στελέχους (Wt) του Saccharomyces cerevisiae και των μεταλλαγμένων στελεχών Δycf1, Δpdr5, στο cycloheximide

Για την εκτίμηση της ευαισθησίας του YCF1 μεταφορέα σε σύγκριση με το PDR5 μεταφορέα, πραγματοποιήθηκε πείραμα τοξικότητας με δ.ο. που είναι γνωστό πως μεταφέρεται από τον PDR5. Ο ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών στο πείραμα, καταγράφηκε (*Εικόνα 42*) και διαπιστώθηκε εκθετική φάση ανάπτυξης μετά τις 22 ώρες επώασης και στατική φάση μετά τις 48 ώρες.

Από τα αποτελέσματα του πειράματος τοξικότητας (*Εικόνα* 43), διαπιστώθηκε πως η συγκέντρωση των 0,1µg·mL<sup>-1</sup> cycloheximide ήταν θανατηφόρα για όλα τα εξεταζόμενα στελέχη. Ενδιαφέρουσα είναι η συγκέντρωση των 0,05 µg·mL<sup>-1</sup> cycloheximide όπου το άγριο στέλεχος (Wt) αναπτύσσεται και ταυτόχρονα τα στελέχη Δycf1, Δpdr5 παρουσιάζουν µηδενική ανάπτυξη. Η ευαισθησία των στελεχών Δycf1 και Δpdr5, σε συνδυασμό με την ταυτόχρονη ανάπτυξη του αγρίου στελέχους, υποδηλώνει ότι η έλλειψη του γονιδίου YCF1 είναι πιθανό να προκαλεί συσσώρευση της δ.ο. ή μεταβολίτες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του, στο κυτόπλασμα και τη θανάτωση των κυττάρων.



Εικόνα 42. Ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών Wt, Δycf1 και Δpdr5 σε 10 mL υγρού θρεπτικού YPD μετά την επώαση των καλλιεργειών σε οριζόντιο επωαστικό υπό συνεχή ανακίνηση (30°C, 250 rpm). Καταγράφηκε ο αριθμός των κυττάρων στις καλλιέργειες μετά από 21, 26, 44, 48 και 70 ώρες επώασης. Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.



**Εικόνα 43**. Ανάπτυξη των στελεχών Wt, Δycf1 και Δpdr5 απουσία και παρουσία cycloheximide στις συγκεντρώσεις 0,01, 0,05, 0,1 και 1µg·mL<sup>-1</sup> σε 10mL υγρού θρεπτικού YPD μετά την επώαση των καλλιεργειών σε οριζόντιο επωαστικό υπό συνεχή ανακίνηση (30°C, 250 rpm). Για τον συνυπολογισμό της τοξικότητας του φαρμάκου προστέθηκε στο μάρτυρα ίση ποσότητα διαλύτη. Η καταγραφή του αριθμού των κυττάρων έγινε μετά από 27 ώρες επώασης (εκθετική φάση ανάπτυξης). Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις. Τα διαφορετικά γράμματα στις ράβδους υποδεικνύουν τη στατιστικώς σημαντικές διαφορές τους με βάση τη στατιστική ανάλυση Student's t-test (α= 0,05).

### 4.5. Ευαισθησία του αγρίου στελέχους (Wt) του Saccharomyces cerevisiae και των μεταλλαγμένων στελεχών Δycf1, Δpdr5 σε επιλεγμένα μυκητοκτόνα

Για την εκτίμηση πιθανών υποστρωμάτων του μεταφορέα YCF1, εξετάσθηκαν επιλεγμένες δ.ο. της ομάδας των SBIs (flusilazole, fenpropimorph, prochloraz) καθώς και μια δ.ο. με προστατευτική δράση, το chlorothalonil. Ο ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών ήταν αυτός που καταγράφηκε στην παράγραφο 4.4 (Εικόνα 42), καθώς όλες παράμετροι ανάπτυξης ήταν ίδιες. Ο αριθμός των κυττάρων μετά την επώαση των καλλιεργειών για 27 ώρες (εκθετική φάση ανάπτυξης) δίνεται στις Εικόνες 44 και 45. Τα flusilazole και fenpropimorph βρέθηκαν αποτελεσματικά στη συγκέντρωση του 1 μg·mL<sup>-1</sup> και τα δύο μεταλλαγμένα στελέχη (Εικόνα 44 Α,Β), το οποίο υποδηλώνει πως η έλλειψη των μεταφορέων προκαλεί ευαισθησία στα κύτταρα όταν εκτίθενται στα συγκεκριμένα μυκητοκτόνα.

Το prochloraz (*Εικόνα 45A*), φαίνεται να μην είναι τοξικό στα μεταλλαγμένα στελέχη στη συγκέντρωση του 1 μg·mL<sup>-1</sup>, ενώ ταυτόχρονα το Wt θανατώνεται. Αυτός ο φαινότυπος, μπορεί να οφείλεται στη λειτουργία άλλων βιοχημικών αντιδράσεων αποτοξικοποίησης. Τέλος, το chlorothalonil (*Εικόνα 45B*), βρέθηκε να παρεμποδίζει την ανάπτυξη του Wt και του μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 στη συγκέντρωση του 0,1μg·mL<sup>-1</sup>, ενώ το στέλεχος Δpdr5 είχε μειωμένη ανάπτυξη.



Εικόνα 44. Ανάπτυξη στελεχών wt, Δycf1 και Δpdr5, απουσία και παρουσία A) flusilazole και B) fenpropimorph στη συγκέντρωση 1μg·mL<sup>-1</sup> σε 10mL υγρού θρεπτικού YPD, μετά την επώαση των καλλιεργειών σε οριζόντιο επωαστικό υπό συνεχή ανακίνηση (30°C, 250rpm). Για τον συνυπολογισμό της τοξικότητας του

φαρμάκου προστέθηκε στο μάρτυρα ίση ποσότητα διαλύτη. Η καταγραφή του αριθμού των κυττάρων έγινε μετά από 27 ώρες επώασης (εκθετική φάση ανάπτυξης). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 επαναλήψεων. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιούνταν με την δοκιμή Student's T-test (α=0,05). Διαφορετικά γράμματα στις στήλες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



**Εικόνα 45** Ανάπτυξη στελεχών Wt, Δycf1 και Δpdr5, απουσία και παρουσία **A**) prochloraz και **B**) chlorothalonil στη συγκέντρωση 1 και 0,1 μg·mL<sup>-1</sup>, αντίστοιχα, σε 10 mL υγρού θρεπτικού YPD, μετά την επώαση των καλλιεργειών σε οριζόντιο επωαστικό υπό συνεχή ανακίνηση (30°C, 250 rpm). Για τον συνυπολογισμό της τοξικότητας του φαρμάκου προστέθηκε στο μάρτυρα ίση ποσότητα διαλύτη. Η καταγραφή του αριθμού των κυττάρων έγινε μετά από 27 ώρες επώασης (εκθετική φάση ανάπτυξης). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο 3 επαναλήψεων. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιούνταν με την δοκιμή Student's T-test (α=0,05). Διαφορετικά γράμματα στις στήλες υποδεικνύουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

### 4.6. Το μυκητοκτόνο flusilazole παρουσιάζει υψηλή βιοδραστικότητα στο Saccharomyces cerevisiae

Το flusilazole επιλέχτηκε για τη μελέτη της επίδρασης του στο μεταβολισμό των στελεχών Wt και Δycf1 του σακχαρομύκητα με εφαρμογή μεταβολομικής, λόγω της δραστικότητάς του (*Εικόνα 44A*) και της μειωμένης ευαισθησίας που παρουσιάζει το στέλεχος με υπερεκφρασμένο το γονίδιο του YCF1 μεταφορέα, σε αυτό (*Εικόνα 41*). Ο προσδιορισμός της EC<sub>50</sub> στις 39 ώρες επώασης, ήταν απαραίτητος για την αποτελεσματική εφαρμογή μεταβολομικής, καθώς απαιτείται η ελάχιστη δυνατή διατάραξη του μεταβολισμού και όχι η πλήρης παρεμπόδισή του.

Ο ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών Wt και Δycf1 καταγράφηκε και διαπιστώθηκε ότι η εκθετική φάση ανάπτυξης σημειωνόταν μετά από 27 ώρες και η στατική φάση μετά από 68 ώρες επώασης (θερμοκρασία 30°C, συνεχή ανάδευση 250 rpm) (*Εικόνα 46*). Με βάση τις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης των καλλιεργειών, σχεδιάστηκε η καμπύλη δραστικότητας για το flusilazole (*Εικόνα 47*) και χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Probit, υπολογίστηκε η τιμή EC<sub>50</sub>, η οποία ήταν 0,006 μg·mL<sup>-1</sup>.



Εικόνα 46. Ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών Wt και Δycf1 του Saccharomyces cerevisiae σε 50 mL υγρού θρεπτικού YPD μετά την επώαση των καλλιεργειών σε οριζόντιο επωαστικό υπό συνεχή ανακίνηση (30°C, 250 rpm). Ο αριθμός των κυττάρων στις καλλιέργειες καταγράφηκε μετά από 17, 24, 26, 41, 45, 50, 68 και 120 ώρες επώασης. Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.



**Εικόνα 47.** Καμπύλη συσχέτισης δραστικότητας-παρεμπόδισης του Saccharomyces cerevisiae στο μυκητοκτόνο flusilazole (συγκεντρώσεις 0,001, 0,005, 0,01, 0,03, 0,05 και 1 μg·mL<sup>-1</sup> κατά την εκθετική φάση ανάπτυξης (39 ώρες επώασης) μετά από εμβολιασμό. Για τον συνυπολογισμό της τοξικότητας του φαρμάκου προστέθηκε στο μάρτυρα ίση ποσότητα διαλύτη. Οι κάθετες γραμμές αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα για 3 επαναλήψεις.

#### 4.7. Ανάλυση μεταβολικού προφίλ του Saccharomyces cerevisiae

Μετά то τέλος της διαδικασίας εκχύλισης ενδο-μεταβολόματος, του πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση των κυττάρων, οπότε διαπιστώθηκε η δημιουργία παραμορφώσεων και λύση τους (Εικόνα 48), το οποίο υποδηλώνει την επιτυχημένη διάσπαση των μεμβρανών.

Από τα αναλυτικά πρωτόκολλα που αξιολογήθηκαν, τα καλύτερα μεταβολικά προφίλ ενδο-μεταβολόματος GC/EI/MS του *S. cerevisiae* καταγράφηκαν με εφαρμογή της μεθοδολογίας 3 (*Εικόνα 30*), ενώ η πυκνότητα των καλλιεργειών 10<sup>8</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup> ήταν ικανοποιητική για την ποσοτική και ποιοτική καταγραφή μεταβολιτών. Πιο συγκεκριμένα, η εκχύλιση των δειγμάτων με χρήση συστήματος μεθανόλης : οξικού αιθυλεστέρα (1:1, v/v) υπολειπόταν αυτής με χρήση μεθανόλης (*Εικόνα 49*). Η πλύση των κυττάρων με κρύα μεθανόλη για την απομάκρυνση των συστατικών του θρεπτικού υλικού καθώς και του έξω-μεταβολόματος ήταν

αναγκαία για την καταγραφή του ενδο-μεταβολόματος. Τέλος, η συγκέντρωση των κυττάρων η οποία ήταν επαρκής για τη πλήρη καταγραφή του μεταβολικού προφίλ του μύκητα ήταν 10<sup>8</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup> (*Εικόνα 50*).

Η ανάλυση του GC/EI/MS μεταβολικού προφίλ του S. cerevisiae είχε ως αποτέλεσμα την ανίχνευση συνολικά 198 μεταβολικών χαρακτηριστικών από τα οποία 90 ταυτοποιήθηκαν, είτε απόλυτα είτε δυνητικά, ενώ για 108 δεν κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση τους. Τα 90 ταυτοποιημένα μεταβολικά χαρακτηριστικά (metabolic features) αποτελούνταν από 69 μοναδικούς μεταβολίτες (Παράρτημα **B**). Το καταγεγραμμένο μεταβολικό προφίλ αποτελείται στο μεγαλύτερο ποσοστό του (αριθμητικά και όχι με βάση την περιεκτικότητα) από υδρογονάνθρακες (35%) και υδατάνθρακες (27%) (Εικόνα 51), ενώ ένα μικρό ποσοστό μεταβολιτών (8%) ανήκουν σε άλλες χημικές ομάδες όπως αμίδια, φαινόλες, κινόνες, τερπενοειδή, παράγωγα φωσφορικού οξέος και ανόργανα οξέα.



Εικόνα 48. Μικροσκοπική παρατήρηση κύτταρων Saccharomyces cerevisiae μετά από χρώση με μπλε του μεθυλενίου για την παρατήρηση ζωντανών (λευκά) και νεκρών κυττάρων (μπλε) (Α), ζωντανών κυττάρων χωρίς χρώση πριν (Β) και μετά (Γ) της εφαρμογής του πρωτοκόλλου εκχύλισης του ενδο-μεταβολόματος.



**Εικόνα 49.** Επικαλυπτόμενα χρωματογραφήματα GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης Saccharomyces cerevisiae με εκχύλιση ενδο-μεταβολόματος με μεθανόλη (μπλε κορυφές) ή μίγμα μεθανόλης : οξικού αιθυλεστέρα (1:1, v/v) (μαύρες κορυφές).



**Εικόνα 50**. Επικαλυπτόμενα χρωματογραφήματα GC/EI/MS μεταβολομικής ανάλυσης Saccharomyces cerevisiae με εκχύλιση ενδο-μεταβολόματος μεταβολομικής ανάλυσης ενδο-μεταβολόματος με πυκνότητες κυττάρων 10<sup>7</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup> (μπλε κορυφές) και 10<sup>8</sup> κύτταρα·mL<sup>-1</sup> (μαύρες κορυφές).



**Εικόνα 51.** GC/EI/MS μεταβολικό προφίλ του ενδο-μεταβολόματος του Saccharomyces cerevisiae. Από τα 198 μεταβολικά χαρακτηριστικά που καταγράφηκαν 90 ταυτοποιήθηκαν, τα οποία αποτελούνταν από 69 μοναδικούς μεταβολίτες.

#### 4.8. Επίδραση του μυκητοκτόνου flusilazole στο μεταβολισμό του Saccharomyces cerevisiae

#### 4.8.1. Επισκόπηση της μεταβολομικής ανάλυσης στελεχών του Saccharomyces cerevisiae παρουσία ή απουσία του μυκητοκτόνου flusilazole

Η μήτρα (matrix) που δημιουργήθηκε από τη βιοπληροφορική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με εφαρμογή μεταβολομικής με το πρόγραμμα MS-Dial, αποτελούνταν από 28 στήλες (επεμβάσεις) και 158 γραμμές (μεταβολικά χαρακτηριστικά).

Για την επισκόπηση των αποτελεσμάτων της μεταβολομικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση PCA, από τα αποτελέσματα της οποίας διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχαν outliers και η επαναληψιμότητα των βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων και πρωτοκόλλων βιοπληροφορικής ανάλυσης. Η
ανακάλυψη των τάσεων ανάμεσα στις επεμβάσεις και των αντίστοιχων μεταβολιτών-βιοσημαντών βασίστηκε στην εφαρμογή OPLS-DA (*Εικόνες 52* και *54*). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητα και η επαναληψιμότητα των βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων και πρωτοκόλλων βιοπληροφορικής. Με την OPLS-DA (*Εικόνα 52*) έγινε κατάταξη των δεδομένων σε ομάδες και βρέθηκαν οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης R<sup>2</sup>X (78,2%) και *R*<sup>2</sup>Y (88,1%) και η τιμής της προγνωστικής ικανότητας του μοντέλου (*Q*<sup>2</sup>) (76,1%). Οι τιμές αυτές επιβεβαιώνουν την επαναληψιμότητα μεταξύ των καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ του σακχαρομύκητα η οποία οφείλεται στην ομοιομορφία των πειραματικών χειρισμών και της επεξεργασίας των δειγμάτων για GC/EI/MS μεταβολομική.

Επιπλέον, είναι φανερή η επίδραση του μυκητοκτόνου στα μεταβολικά προφίλ των στελεχών, καθώς φαίνεται πως οι επαναλήψεις με flusilazole (WF, YF) διαφέρουν σημαντικά με τους αντίστοιχους μάρτυρες (WC,YC) (*Εικόνες 52* και *54*). Πρέπει να σημειωθεί ότι στα OPLS-DA Score plots, οι αποστάσεις μεταξύ των σημείων είναι ανάλογες των διαφορών στα καταγεγραμμένα μεταβολικά προφίλ.

Συμπληρωματικά της OPLS-DA πραγματοποιήθηκε ανάλυση ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες (Hierarchical cluster analysis), τα αποτελέσματα της οποίας είναι σε συμφωνία με αυτή (*Εικόνα* 53). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται πολύ καλός διαχωρισμός μεταξύ των επαναλήψεων ανάλογα με τις επεμβάσεις. Επιπλέον φαίνεται πως μεγαλύτερη επίδραση στο μεταβολικό προφίλ έχει η επέμβαση με flusilazole ακολουθούμενη από το γονότυπο.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση OPLS-DA ανά ζεύγη (Pairwise Analysis) για την επιβεβαίωση επίδρασης του φαρμάκου στα μεταβολικά προφίλ των δυο στελεχών. Τα αποτελέσματα της OPLS-DA για το Wt (*Εικόνα 54A*) και του Δycf1 (*Εικόνα 54B*) επιβεβαιώνουν την ποιότητα των πειραματικών και βιοαναλυτικών πρωτοκόλλων και φαίνεται η επίδραση της δ.ο.

Τα παραπάνω καθιστούν ξεκάθαρη την επίδραση του γονοτύπου και φαρμάκου στο μεταβολισμό των στελεχών και δείχνουν τη δυναμική της μεταβολομικής ανάλυσης καθώς και την εφαρμοσιμότητα μιας τέτοιας ανάλυσης. Για τη καλύτερη κατανόηση των αποτελεσμάτων και των φαινοτύπων θα πρέπει να αναλύσουμε τα αποτελέσματα με εφαρμογή προηγμένων μεθόδων στατιστικής για την ανακάλυψη βιοσημαντών (biomarkers). Μέσω της μεθόδου, η ανίχνευση του flusilazole ήταν αδύνατη, καθώς η συγκέντρωση που εφαρμόστηκε ήταν μικρή και κατά την προεπεξεργασία των δεδομένων πιθανότατα τα ιόντα που του ανήκαν απορρίπτονταν από το λογισμικό λόγω του χαμηλού τους σήματος (*Παράρτημα A*).



**Εικόνα 52.** OPLS-DA score plot για το διαχωρισμό μεταξύ των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ του άγριου (W) και μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 (Y) του Saccharomyces cerevisiae, παρουσία flusilazole 0.006μg·mL<sup>-1</sup> (F) ή απουσία του (C), 39 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hoteling's T<sup>2</sup> σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Component). Η επαναληψιμότητα της πειραματικής διαδικασίας και των αναλύσεων αποδεικνύεται από τις υψηλές τιμές των συντελεστών  $R^2X_{(cum)}=78.2\%$ ,  $R^2Y_{(cum)}=88.1\%$  και  $Q^2=76.1\%$ .



Εικόνα 53. Δενδρόγραμμα ιεραρχικής ανάλυσης κατά συστάδες (Hierarchical cluster analysis, HCA dendrogram) των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ του άγριου (W) και μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 (Y) του Saccharomyces cerevisiae, παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole 0.006 μg·mL<sup>-1</sup> (F) ή απουσία του (C), 39 ώρες μετά τις επεμβάσεις.



**Εικόνα 54.** OPLS-DA score plot (pairwise analysis) για το διαχωρισμό μεταξύ των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ **A**) του άγριου στελέχους παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole 0.006 μg·mL<sup>-1</sup> (WF) ή απουσία του (WC), **B**) του μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole 0.006μg·mL<sup>-1</sup> (YF) ή απουσία του (YC), **Γ**) του άγριου στελέχους και του Δycf1, απουσία του μυκητοκτόνου, WC και YC αντίστοιχα, και **Δ**) του άγριου στελέχους και του Δycf1 παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole 0.006ημg·mL<sup>-1</sup>, WF και YF αντίστοιχα, 39 ώρες, μετά τις επεμβάσεις. Η επαναληψιμότητα από την πειραματική διαδικασία έως και την ανάλυση των δειγμάτων, αποδεικνύεται από τις υψηλές τιμές των συντελεστών A) R<sup>2</sup>X<sub>(cum)</sub>=63,9%, R<sup>2</sup>Y(cum)=98,8%, Q<sup>2</sup>=97,5%, B) R<sup>2</sup>X<sub>(cum)</sub>=56,8%, R<sup>2</sup>Y(cum)=95,2%, Q<sup>2</sup>=86,8%, Γ) R<sup>2</sup>X<sub>(cum)</sub>=60,4%, R<sup>2</sup>Y(cum)=97,2%, Q<sup>2</sup>=89,5% και Δ) R<sup>2</sup>X<sub>(cum)</sub>=46,2%, R<sup>2</sup>Y(cum)=95,4%, Q<sup>2</sup>=86,5%. Η έλλειψη αντιπροσωπεύει το Hoteling's T<sup>2</sup> σε διάστημα εμπιστοσύνης 95% (PC: Κύριες Συνιστώσες, Principal Component).

## 4.8.2. Η επέμβαση με το μυκητοκτόνο flusilazole είχε σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό του αγρίου (Wt) και του μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 του Saccharomyces cerevisiae: μεταβολίτες-βιοσημαντές

Η επέμβαση με το μυκητοκτόνο flusilazole είχε σημαντική επίδραση στο μεταβολισμό τόσο του αγρίου (Wt) όσο και του μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 του *S. cerevisiae* (*Εικόνες 52, 53, 54, 55, 56, 57* και *58*). Μεγάλος αριθμός μεταβολιτών τους ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερες σχετικές συγκεντρώσεις σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ επίσης ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από την επέμβαση με το μυκητοκτόνο. Η ανακάλυψη των μεταβολιτών-βιοσημαντών της επίδρασης του flusilazole βασίστηκε στη χρήση Coefficient plots (*Εικόνες 55* και *57*) (Aliferis et al., 2014) σε συνδυασμό με προηγμένες στατιστικές αναλύσεις OPLS-DA, S-plots (*Εικόνες 56* και *58*) (Wiklund et al., 2008).

Πιο συγκεκριμένα, μετά την εφαρμογή του flusilazole καταγράφηκε αυξημένη σχετική περιεκτικότητα των μεταβολιτών glycerol, myo-inositol-1-phosphate, glycerol, L-leucine, L-serine, propanoate και hexadecanoate ως μια κοινή αντίδραση και των δυο στελεχών. Αντίθετα, μειωμένη περιεκτικότητα μεταβολιτών και στα δυο στελέχη καταγράφηκε μονό για το αμινοξύ L-glutamine (*Εικόνες 55,* 57 και 59). Το γεγονός ότι από τους 71 ταυτοποιημένους μόνο 7 μεταβολίτες εμφάνισαν κοινή αντίδραση στην επέμβαση με το μυκητοκτόνο μεταξύ των δυο στελεχών, αποτελεί απόδειξη των μεγάλων διαφορών μεταξύ του μεταβολισμού τους ως αποτέλεσμα της αντικατάστασης του YCF1 μεταφορέα

Επιπλέον, για τους μεταβολίτες L-valine, L-asparagine, *a,a*-trehalose, phosphate και, η επέμβαση με το μυκητοκτόνο προκάλεσε μειωμένη σχετική περιεκτικότητα στο άγριο στέλεχος και αντίθετα αυξημένη περιεκτικότητα στο Δycf1. Αντίστροφη εικόνα καταγράφηκε για τους μεταβολίτες malate, fumarate, L-Threonine, L-lysine και octadecanoate, για τους οποίους στο άγριο στέλεχος καταγράφηκε αύξηση της περιεκτικότητάς τους ενώ αντίθετα μείωση στο Δycf1 μετά από επέμβαση με flusilazole.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν επίσης οι μεταβολίτες για τους οποίους παρατηρείται σημαντική μεταβολή μόνο σε ένα από τα δύο στελέχη ως αντίδραση

στην επέμβαση: η αύξηση της περιεκτικότητας των μεταβολιτών glycerol-3phosphate, L-tryptophan, L-aspartate και pyroglutamate και η μειωμένη σχετική περιεκτικότητα των L-isoleucine, succinate και D-glucose ανακαλύφθηκε ως μια σημαντική αντίδραση του αγρίους στελέχους στην επέμβαση με το μυκητοκτόνο. Αντίθετα, η αυξημένη σχετική περιεκτικότητα glycine και η μειωμένη σχετική περιεκτικότητα GABA και L-tyrosine, ανακαλύφθηκε ως μια βασική αντίδραση μόνο στο στέλεχος Δycf1.

Παρά τη γενική επίδραση των επεμβάσεων στο μεταβολισμό του σακχαρομύκητα, ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές (*Εικόνες 55, 57* και *59*). Ανάμεσα σε αυτούς, οι μεταβολίτες L-cystein, L-methionine, L-phenylalanine, L-alanine, L-proline, L-ornithine, D-myo-inositol, oxalate, D-sorbitol, citrate, adenosine, uracil acetate, benzoate, adipate, dodecanoate, tetradecanoate, eicosanoate, hexanoate, n-caprate, nonanoate, heptadacanoate, octadecenoate και palmitoleate.



**Εικόνα 55** Coefficient Plot στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ του άγριου στελέχους του *S. cerevisiae* παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole 0.006μg·mL<sup>-1</sup> (WF) και απουσία του (WC), 39 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης προέρχονται από jack-knifing (95%). Θετικές τιμές αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που υπο-βιοσυντέθηκαν (πράσινο) ενώ αρνητικές τιμές σε αυτούς που υπερ-βιοσυντέθηκαν (κόκκινο βέλος), ως αντίδραση στην επέμβαση με το μυκητοκτόνο.



**Εικόνα 56. A**)S-plot στο οποίο απεικονίζεται το OPLS-DA component loading. Το S-plot χρησιμοποιείται για την απεικόνιση τόσο της συνάφειας όσο και της δομής συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών και του predictive score. Διακρίνονται οι τιμές των συντελεστών (Coefficients) για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ του άγριου στελέχους παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole 0,006 μg·mL<sup>-1</sup> (WF) και απουσία του (WC), 39 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι μεταβολίτες που ευρίσκονται στα άκρα του «S» εμφανίζουν μεγάλη επίδραση στον παρατηρούμενο διαχωρισμό και αποτελούν μεταβολίτες-βιοσημαντές. **B**) Μεγέθυνση των περιοχών του S-plot που περιλαμβάνουν πιθανούς βιοσημαντές.



**Εικόνα 57**. Coefficient Plot στο οποίο διακρίνονται οι τιμές των Coefficients για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ του στελέχους μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole 0.006 μg·mL-1(YF) και απουσία του (YC), 39 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές των συντελεστών (coefficient) είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης προέρχονται από jack-knifing (95%).



**Εικόνα 58**.S-plot στο οποίο απεικονίζεται το OPLS-DA component loading. Το S-plot χρησιμοποιείται για την απεικόνιση τόσο της συνάφειας όσο και της δομής συσχέτισης μεταξύ των μεταβλητών και του predictive score. Διακρίνονται οι τιμές των συντελεστών (Coefficients) για τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ του στελέχους Δycf1 παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole 0.006 μg·mL-1 (YF) και απουσία του (YC), 39 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι μεταβολίτες που ευρίσκονται προς τα άκρα του «S» εμφανίζουν μεγάλη επίδραση στον παρατηρούμενο διαχωρισμό και αποτελούν μεταβολίτες-βιοσημαντές.





# 4.8.3. Συγκριτικές μεταβολικές διαφορές μεταξύ του αγρίου (Wt) και του μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1 του Saccharomyces cerevisiae παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole: μεταβολίτες-βιοσημαντές

Επιπλέον της επίδρασης του flusilazole στο μεταβολισμό του αγρίου και του μεταλλαγμένου στελέχους Δycf1, μελετήθηκαν και οι διαφορές στο μεταβολισμό μεταξύ των δύο στελεχών μετά από επεμβάσεις με το μυκητοκτόνο. Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς με τον τρόπο αυτό μπορεί να διευκρινιστεί η επίδραση της μεταλλαγής υπό διαφορετικές συνθήκες καταπόνησης.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε αύξηση της σχετικής περιεκτικότητας του μύκητα στους μεταβολίτες *a*,*a*-trehalose, L-aspartate, glycerol, glycine, hexadecanoate, D-glucose, phosphate, L-leucine, succinate, propanoate, L-valine, και L-asparagine στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δycf1 (Εικόνες 60B και 61), και ταυτόχρονα, μειωμένη περιεκτικότητα καταγράφηκε στους μεταβολίτες fumarate. malate, L-glutamine, L-lysine, pyroglutamate. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μεταβολίτες που δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή. Ανάμεσα σε αυτούς glycerol-3-phosphate, L-isoleucine, acetate, L-cysteine, Lmethionine, L-alanine, L-threonine L-serine, oxalate, GABA, L-proline, L-ornithine, L-phenylalanine, L-tryptophan, L-tyrosine, D-sorbitol, myo-inositol-1-phosphate, Dmyo-inositol, citrate, adenosine, orotate, adipate, benzoate, uracil, octadecanoate, dodecanoate, tetradecanoate, eicosanoate, hexanoate, n-caprate, nonanoate, heptadacanoate, octadecenoate και palmitoleate.



Plots Εικόνα *60*. Coefficient Jμ τις αντίστοιχες τιμές Coefficients νια τα κανονικοποιημένα και κεντραρισμένα δεδομένα (scaled and centered data) για τη σύγκριση μεταξύ των μεταβολικών προφίλ του αγρίου στελέχους (W) και του μεταλλαγμένου Δycf1 (Y) του απουσία (C) (A), και παρουσία του μυκητοκτόνου flusilazole 0.006 μg·mL-1(F) (B),39 ώρες μετά τις επεμβάσεις. Οι απόλυτες τιμές των συντελεστών (coefficient) είναι ανάλογες τις βαρύτητας των αντίστοιχων μεταβολιτών στον παρατηρούμενο διαχωρισμό. Τα διαστήματα εμπιστοσύνης προέρχονται από jackknifing (95%). Θετικές αντιστοιχούν μεταβολίτες που υποτιμές σε βιοσυντέθηκαν (πράσινο) ενώ αρνητικές αυτούς που υπερτιμές σε βιοσυντέθηκαν (κόκκινο βέλος), ως αντίδραση στην επέμβαση με το μυκητοκτόνο.





### 4.8.4. Επίδραση της αντικατάστασης του γονιδίου YCF1 στο μεταβολισμό του Saccharomyces cerevisiae: μεταβολίτεςβιοσημαντές

Ως μια τελευταία συγκριτική μεταβολομική ανάλυση, μελετήθηκε η επίδραση της διαγραφής YCF1 μεταφορέα στο μεταβολισμό του *S. cerevisiae* (*Εικόνες 60A* και 61). Αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την εξακρίβωση της επίδρασης της διαγραφής του γονιδίου του YCF1 μεταφορέα στο συνολικό μεταβολισμό του οργανισμού. Ο YCF1 ανήκει στους ABC μεταφορείς και βρίσκεται στην μεμβράνη του κενοτοπίου. Ο ρόλος του μεταφορέα είναι η μεταφορά διαφόρων ουσιών στο εσωτερικό του κενοτοπίου. Από όσο γνωρίζουμε, στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές σχετικές με την επίδραση του μεταφορέα στο συνολικό μεταβολισμό μικροοργανισμών, γεγονός που προσδίδει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στα αποτελέσματα της συγκριτικής μεταβολομικής μελέτης μεταξύ του αγρίου και του μεταλλαγμένου Δycf1 στελέχους.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης επιβεβαίωσαν στο στέλεχος Δycf1 αυξημένη περιεκτικότητα των μεταβολιτών L-threonine, L-aspartate, malate, succinate, pyroglutamate, octadecanoate, hexadecanoate, L-lysine, glycerol, L-tyrosine, Dglucose και L-leucine . Αντίθετα, καταγράφηκε μειωμένη περιεκτικότητα των μεταβολιτών *a,a*-trehalose, phosphate, L-glutamine, L-serine και L-asparagine. Επίσης ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών δεν παρουσίασε σημαντική διακύμανση (*Εικόνες 60A* και *61*). Ανάμεσα σε αυτούς, περιλαμβάνονται οι glycerol-3-phosphate, L-isoleucine, acetate, L-cysteine, L-methionine, L- alanine, oxalate, GABA, L-proline, L-ornithine, L-valine, L-phenylalanine, L-tryptophan, Dsorbitol, myo-inositol-1-phosphate, D-myo-inositol, citrate, fumarate, glycine, propanoate, adenosine, orotate, uracil, adipate, benzoate, dodecanoate, tetradecanoate, eicosanoate, hexanoate, n-caprate, nonanoate, heptadacanoate, octadecenoate και palmitoleate.

# 4.8.5. Ρόλος επιλεγμένων μεταβολιτών-βιοσημαντων της επίδρασης του flusilazole και της αντικατάστασης του γονιδίου YCF1 στο μεταβολισμό και φυσιολογία του Saccharomyces cerevisiae

Με βάση τα αποτελέσματα των αναλύσεων βιοπληροφορικής (*Εικόνες 54, 55, 57, 59,* και 61), διαπιστώθηκε η διαταραχή του μεταβολισμού τόσο του αγρίου όσο και του Δycf1 στελέχους μετά από επεμβάσεις με flusilazole αλλά και η επίδραση της αντικατάστασης του γονιδίου που κωδικοποιεί τον μεταφορέα YCF1 στο μεταβολισμό του σακχαρομύκητα. Οι κυριότερες ομάδες μεταβολιτών οι οποίες εμφάνισαν τις μεγαλύτερες διακυμάνσεις ήταν τα αμινοξέα, υδατάνθρακες, καρβοξυλικά οξέα. Αντίθετα δεν ανακαλύφθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην περιεκτικότητα του σακχαρομύκητα στην πλειονότητα των λιπαρών οξέων που καταγράφηκαν. Καθώς στόχο της παρούσας μελέτης δεν αποτέλεσε η πλήρης καταγραφή της επίδρασης του μυκητοκτόνου στο μεταβολισμό του *S. cerevisiae*, παρακάτω αναλύεται η επίδραση των επεμβάσεων με το μυκητοκτόνο και των διαφορών του γονοτύπου σε επιλεγμένους μεταβολίτες-βιοσημαντές, οι οποίοι έχουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία και μεταβολισμό του.

#### 4.8.5.1. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες στους ετερότροφους οργανισμούς χρησιμοποιούνται είτε ως πηγή ενέργειας, είτε ως αρχικά δομικά μόρια για τη σύνθεση πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών. Σημαντικές ομάδες αποτελούν οι εξόζες, οι οποίες είναι μονοσακχαρίτες με 6 άτομα άνθρακα (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαννόζη), οι δισακχαρίτες (μαλτόζη, σουκρόζη) (Rodrigues et al., 2006). Οδούς καταβολισμού των υδατανθράκων αποτελούν η γλυκόλυση, κατά την οποία η γλυκόζη μετατρέπεται σε pyruvate, με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας σε μορφή ATP και NADPH, η μετατροπή του pyruvate σε acetyl-coA στα μιτοχόνδρια, ο κύκλος τρικαρβονικών οξέων (κύκλος Krebs), κατά τον οποίο οξειδώνεται η πλειονότητα των υδατανθράκων και παράγονται μεταβολίτες που αποτελούν πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση αμινοξέων (Compagno et al., 2014). Ο αναβολισμός των υδατανθράκων περιλαμβάνει τη γλυκονεογένεση είτε μέσω του κύκλου Krebs είτε μέσω του εναλλακτικού glyoxylate cycle όπου συντίθεται γλυκόζη από pyruvate, το μονοπάτι βιοσύνθεσης γλυκογόνου (glycogen) και το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών (pentose phosphate pathway, PPP) όπου παράγονται μόρια NADH και δημιουργούνται πολυπλοκότερα μόρια σακχάρων (Rodrigues et al., 2006, Compagno et al., 2014).

Στις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε σημαντική επίδραση των επεμβάσεων στην περιεκτικότητα των GC/EI/MS μεταβολικών προφίλ που καταγράφηκαν σε υδατάνθρακες. Ανάμεσα σε αυτούς, η *a,a-trehalose, glycerol,* και myo-inositol-1-phoshate ήταν οι μεταβολίτες που σημείωσαν τις πιο σημαντικές μεταβολές.

Η *a,a*-trehalose αποτελεί μεταβολίτη που σχετίζεται με την αποθήκευση υδατανθράκων στα ευκαρυωτικά κύτταρα και με την αντοχή και λειτουργικότητα των κυτταρικών μεμβρανών όταν οι οργανισμοί βρίσκονται υπό συνθήκες έντονης καταπόνησης (π.χ. χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, χαμηλές θερμοκρασίες) (Iturriaga et al., 2009, Aliferis and Jabaji, 2010), προστατεύει τα κύτταρα από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και ρυθμίζει το γλυκολυτικό κύκλο (glycolytic cycle) στις ζύμες (Elbein et al., 2003, Eleutherio et al., 2015).Μεγάλες συγκεντρώσεις *a,a*-trehalose έχουν βρεθεί σε ανυδροβιοτικούς οργανισμούς (anhydrobiotic) καθώς μόρια της προσδένονται μεταξύ των καρβοξυλικών ομάδων των υδατανθράκων και των πολικών κεφαλών (polar head) των λιπιδίων (Eleutherio et al., 2015). Επιπλέον η αύξηση της συγκέντρωσης της τρεχαλόζης προστατεύει τα κύτταρα από ακραίες θερμοκρασίες (Elbein et al., 2003).Συσσώρευση της *a,a*-trehalose έχουν μειωμένες πηγές άνθρακα, και κατά τη στατική φάση ανάπτυξης σε πλούσιο θρεπτικό μέσο (Eleutherio et al., 2015).

Η *a,a*-trehalose μαζί με το glycogen, θεωρείται ως μία κεντρική μεταβολική αντίδραση ζυμών σε καταπονήσεις (Francois and Parrou, 2001). Στο *S. cerevisiae* η βιοσύνθεση της *a,a*-trehalose ξεκινά από μόρια D-glucose τα μετατρέπονται σε glucose-6-phosphate και μέσω της trehalose-6-phosphate synthase (TPS), μετατρέπονται σε trehalose-6-phosphate. Στη συνέχεια, μέσω της φωσφατάσης trehalose-6-phosphate phosphatase παράγεται *a,a*-trehalose και απελευθερώνεται Pi (phosphate) (Walker, 1998, Eleutherio et al., 2015). Στη ζύμη *Candida albicans* έχει βρεθεί άμεση συσχέτιση της μείωσης του συνολικού Pi (phosphate pool) με

την συσσώρευση trehalose-6-phosphate που αποτελεί το προγενέστερο μεταβολίτη της *a,a-*trehalose (Van Dijck et al., 2002).

Η μεταβολομική ανάλυση έδειξε μετά την εφαρμογή του flusilazole στο άγριο στέλεχος του S. cerevisiae μειωμένη περιεκτικότητα των μεταβολικών προφίλ σε a,a-trehalose, ενώ αντίθετα αυξημένη στο στέλεχος Δycf1 (*Εικόνα 59*). Παράλληλα μειωμένη περιεκτικότητα καταγράφηκε για την D-glucose, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα για την a,a-trehalose, καθώς αποτελούν διαδοχικά στάδια του μεταβολισμού του μύκητα (*Εικόνα 59*). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει την σημασία του μεταφορέα YCF1 στην τοξικότητα του μυκητοκτόνου καθώς όταν ο μεταφορέας αυτός είναι διαγεγραμμένος, ο μύκητας φαίνεται να καταπονείται και να βιοσυνθέτει με αυξημένο ρυθμό a,a-trehalose ώστε να ανταποκριθεί στην προκαλούμενη καταπόνηση, καθώς ο ρόλος του μεταβολίτη ως αντίδραση του σακχαρομύκητα σε διαφορές καταπόνησης είναι πρώτη αναφορά σχετική με την εμπλοκή της a,a-trehalose στην τοξικότητα του flusilazole στο σακχαρομύκητα.

Ο μεταβολίτης **glycerol** ανακαλύφθηκε ως ένας επίσης σημαντικός βιοσημαντής της τοξικότητας του flusilazole στο σακχαρομύκητα. Ο μεταβολίτης χρησιμοποιείται από μύκητες και ζύμες για την βιοσύνθεση της ραχοκοκαλιάς των φωσφολιπιδίων, τα οποία αποτελούν δομικά συστατικά των μεμβρανών. Έχει αναφερθεί, υπερβιοσύνθεση και συσσώρευση glycerol σε κύτταρα ζυμών ως αποτέλεσμα αντίδρασης σε έκθεση σε παράγοντες καταπόνησης, όπως αυξημένη ωσμωτική πίεση και θερμική καταπόνηση (Klein et al., 2017). Η αυξημένη σχετική περιεκτικότητα σε glycerol μετά από επεμβάσεις με flusilazole τόσο στο άγριο όσο και στο Δycf1, επιβεβαιώνουν την παραπάνω παρατήρηση υπογραμμίζοντας την σημασία του μεταβολίτη ως μια βασική αντίδραση στην καταπόνηση. Επίσης, ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ο μεταβολίτης ανιχνεύθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο στέλεχος Δycf1 σε σχέση με το άγριο τόσο μετά την επέμβαση με flusilazole όσο και στους μάρτυρες.

Ο μεταβολίτης **myo-inositol-1-phosphate** αποτελεί πρόδρομο μεταβολίτη για την βιοσύνθεση myo-inositol, η οποία εμπλέκεται σε πάρα πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η μεταφορά σημάτων (signaling transduction), μεταφορά εκκριτικών κυστιδίων (vesicle trafficking) και στο σχηματισμό μεμβρανών (Bruggeman et al., 2015). Η βιοσύνθεση της myo-inositol ξεκινά από glucose, η

οποία φωσφορυλιώνεται από την hexokinase σε glucose-6-phosphate, η οποία με τη σειρά της με τη δράση του myo-inositol 1-phosphate synthase (MIPS) μετατρέπεται σε myo-inositol-1-phosphate. Από το τελικό αυτό προϊόν, απομακρύνεται η φωσφορική ομάδα (dephosphorylation) μέσω της myo-inositol monophosphatase και παράγεται myo-inositol (Deranieh et al., 2013).

Οι ζύμες έχουν ένα αντίγραφο του γονιδίου που κωδικοποιεί για *MIPS*, σε αντίθεση με τα φυτά τα οποία έχουν πολλαπλά (Dastidar et al., 2006). Σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε στο *Arabidopsis thaliana* βρέθηκε πως το *MIPS1* είναι απαραίτητο για τη σωστή ανάπτυξη των φυτών και δρα ως καταστολέας του αιφνίδιου κυτταρικού θανάτου (spontaneous cell death) (Donahue et al., 2010). Επιπλέον, έχει καταγραφεί υπερέκφραση γονιδίων που ανήκουν στα *MIPS* σε φυτά *A. thaliana* ως αντίδραση σε αβιοτικές καταπονήσεις, όπως ξηρασία και κρύο (Khurana et al., 2017).

Οι επεμβάσεις με το flusilazole τόσο στα στελέχη Wt όσο και στο Δycf1 του S. *cerevisiae*, αύξησαν τη σχετική περιεκτικότητά του σε **myo-inositol-1-phosphate**, ενώ κατά τις συγκρίσεις απουσία του παρεμποδιστή αλλά και μεταξύ των δυο στελεχών παρουσία flusilazole δεν καταγράφηκαν διαφορές(*Εικόνες* 59 και 61). Με βάση τα παραπάνω, μπορεί να υποστηριχτεί ρόλος του μεταβολίτη στη καταπόνηση που οφείλεται στην τοξική δράση του μυκητοκτόνου στο S. *cerevisiae*. Αντίθετα, ο γονότυπος φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα του μεταβολίτη.

#### 4.8.5.2. Αμινοξέα

Τα αμινοξέα αποτελούν δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών και συμμετέχουν στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών χωρίς την χρήση ριβοσωμάτων (Nonribosomal peptide synthesis, NRPS) (Bayram et al., 2016) και στην ανάπτυξη του οργανισμού (cell growth) (Kim and Kim, 2017). Ανάμεσα σε αυτά, τα αμινοξέα **L-tryptophan**, **L-phenylalanine** και **L-tyrosine** αποτελούν την ομάδα των αρωματικών αμινοξέων τα οποία είναι εξαιρετικά κοστοβόρα για την σύνθεση τους (Braus, 1991) και τα οποία αποτελούν τις βασικές πρόδρομες ενώσεις για την βιοσύνθεση φαινυλπροπανοϊκών, διάφορων αλκαλοειδών και μεταβολισμός τροπενίου και πυριδίνης (*Εικόνες* 59 και 61). Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του μύκητα (π.χ. παθογένεια, αντίδραση σε καταπονήσεις) (Dixon et al., 2002, Naoumkina et al., 2010). Με εξαίρεση την L-phenylalanine, της οποίας η περιεκτικότητα δε μεταβλήθηκε σημαντικά μετά από επέμβαση με flusilazole και στα δυο στελέχη που μελετήθηκαν, η L-tyrosine μειώθηκε στο YCF1, γεγονός που είναι πιθανό να υποδηλώνει μειωμένη downstream βιοσυνθετική δραστηριότητα.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, μέσω της πιθανής επίδρασης στο δευτερογενή μεταβολισμό του μύκητα, υποδηλώνουν έμμεσα την αυξημένη καταπόνηση του flusilazole στο μεταλλαγμένο στέλεχος σε σχέση με το άγριο. Με βάση αυτό επιβεβαιώνεται η εμπλοκή του μεταφορέα YCF1 στην ευαισθησία του σακχαρομύκητα στο μυκητοκτόνο.

Το **GABA** (γ-aminobutyric acid), είναι επίσης ένας μεταβολίτης ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία οργανισμών (Kinnersley and Turano, 2000). Στα φυτά, βοηθά στη ρύθμιση του pH και σχετίζεται με την αντίδρασή τους σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες καταπόνησης και την άμυνα των φυτών, είτε άμεσα είτε έμμεσα, λειτουργώντας ως σήμα (signaling molecule) (Aliferis and Jabaji, 2012, Bach et al., 2009). Στο *S. cerevisiae* η παρεμβολή του GABA μεταξύ L-glutamate και succinate (GABA shunt) είναι αναγκαία για την αύξηση της αντοχής στην οξειδωτική καταπόνηση (Nugroho et al., 2015, Bach et al., 2009). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του GABA shunt ως αντίδραση σε οξειδωτική καταπόνηση, αυξάνει την παραγωγή NADPH, το οποίο χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση glutathione (GSH) (Nugroho et al., 2015).

Η μεταβολομική ανάλυση έδειξε εμπλοκή του GABA στην αντίδραση του στελέχους Δycf1 στο flusilazole. Με βάση τις φαινοτυπικές παρατηρήσεις, το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να υποδεικνύει μια συσχέτιση των επιπέδων του μεταβολίτη με την ευαισθησία του μύκητα στο μυκητοκτόνο, κυρίως λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο του ως σήμα (*Εικόνες 59* και *61*).

Τέλος, το αμινοξύ **L-glutamine** είναι ένας μεταβολίτης που σχετίζεται με τη βιοσύνθεση πουρίνων (Wise and Thompson, 2010), καθώς και με την ενεργοποίηση πρωτεινικών κινασών (mitogenic activated protein kinases. MAP kinases) για τη μεταφορά σήματος μέσω φωσφορυλίωσης πρωτεινών (Yang et al., 2013, Saito, 2010, Mok et al., 2008). Η μειωμένη περιεκτικότητα των

καταγεγραμμένων μεταβολικών προφίλ σε L-glutamine για όλες τις επεμβάσεις υποδηλώνει ότι τόσο η επίδραση του flusilazole όσο και η διαγραφή του *YCF1*, δεν προκάλεσαν την ενεργοποίηση αυτού του σημαντικού μηχανισμού. Επιπρόσθετα, είναι πιθανό να υποδηλώνει τη μειωμένη βιοσύνθεση πουρινών.

#### 4.8.5.3. Λιπαρά οξέα

Τα λιπίδια που απαντώνται στο S. cerevisiae διακρίνονται σε λιπαρά οξέα, γλυκερολιπίδια, γλυκεροφωσφολιπίδια, στερόλες. παράγωγα στερολών, σφιγγολιπίδια, γλυκολιπίδα και πολυκετίδια. Τα σύνθετα λιπίδια αποτελούνται από λιπαρά οξέα (Klug and Daum, 2014), τα οποία είναι είτε δεσμευμένα δημιουργώντας δομές όπως τα φωσφολιπίδια, είτε ελεύθερα (Free fatty acids). Τα σημαντικότερα λιπαρά οξέα στο σακχαρομύκητα είναι το palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (octadecenoic acid, C18:1), palmitic acid (hexadecanoic acid, C16:0), stearic acid (octadecanoic acid, C18:0), myristic acid (tetradecanoic acid, C14:0), cerotic acid (hexacosanoic acid, C26:0) (Klug and Daum, 2014), η πλειονότητά τους ανιχνεύθηκε με την πραγματοποίηση μεταβολομικής ανάλυσης GC/EI/MS (Εικόνες 59, 61, και Παράρτημα Α). Ανάμεσα σε αυτά, η περιεκτικότητα του μύκητα σε αντιστοιχεί στο 30-40% των λιπαρών οξέων, ενώ το octadecanoate στο 10-15% (Le Guedard et al., 2009).

Ο κύριος ρόλος τους είναι δομικός, καθώς αποτελούν το κύριο συστατικό των κυτταροπλασματικών μεμβρανών, εμπλέκονται σε πρωτεϊνικές τροποποιήσεις, στη βιοσύνθεση μεταβολιτών όπως σφιγγολιπίδια και επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τον οργανισμό ως πηγή άνθρακα (Santomartino et al., 2017). Στους μύκητες παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση μυκητοτοξινών, στην παραγωγή κονιδίων καθώς και στη διαφοροποίηση των κυττάρων (Aliferis and Jabaji, 2010). Η βιοσύνθεσή τους ξεκινά από το acetyloacetyl-CoA, το οποίο αποτελείται από 2 μόρια acetylo-CoA (Klug and Daum, 2014).

Τα αποτέλεσμα των αναλύσεων μεταβολομικής έδειξαν ότι τα λιπαρά οξέα, με εξαίρεση τα octadecanoate (strearic acid) και hexadecanoate (palmitic acid), δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τις επεμβάσεις με το flusilazole ή τη διαγραφή του

μεταφορέα YCF1 (*Εικόνες* 59 και 61). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι επεμβάσεις με το μυκητοκτόνο έχουν μικρή επίδραση στο μεταβολισμό και βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων του μύκητα.

#### 4.8.5.4. Λοιποί μεταβολίτες-βιοσημαντές

Ανάμεσα στους λοιπούς μεταβολίτες των οποίων τα επίπεδα επηρεάστηκαν σημαντικά μετά την επέμβαση με flusilazole ήταν το phosphate (**φωσφορικό οξύ**) (*Εικόνες 59, 61* και 62). Είναι ένας σημαντικός μεταβολίτης με πολύπλευρο ρόλο στο μεταβολισμό των οργανισμών, με τη μεταφορά σημάτων (signal transduction), να είναι ένας από αυτούς (Ding et al., 2009). Η μείωση της συγκέντρωσης του φωσφορικού έχει αποδοθεί σε αυξημένη οξειδωτική φωσφορυλίωση (μετατροπή ADP σε ATP) κατά τη γλυκόλυση και την οξείδωση του κιτρικού οξέος (TCA cycle) (Ding et al., 2009). Επίσης, ανόργανο φωσφορικό οξέα αποθηκεύεται στο εσωτερικό των κενοτόπιων με τη μορφή polyP μορίων (Jiménez et al., 2016). Λόγω της συμμετοχής του ανόργανου οξέος σε διάφορες λειτουργίες δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με την εμπλοκή του στην αντίδραση του σακχαρομύκητα στο μυκητοκτόνο.

Τέλος, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η περιεκτικότητα του phosphate παρουσιάζει τις ίδιες διακυμάνσεις με αυτή της *a,a*-trehalose για όλες τις συγκρίσεις, το οποίο θα μπορούσε εν μέρει να οφείλεται στην παραγωγή φωσφορικού κατά το τελευταίο στάδιο βιοσύνθεσης *a,a*-trehalose (*Εικόνα 59* και 63) (Walker, 1998).



Εικόνα 62. Trend plot της διακύμανση περιεκτικότητας του μεταβολίτη phosphate στο στέλεχος Δycf1 του Saccharomyces cerevisiae απουσίας (YC) και παρουσίας του μυκητοκτόνου flusilazole 0.006 μg·mL-1 (YF), 39 ώρες μετά τις επεμβάσεις.



Εικόνα 63. Βιοσύνθεση τρεχαλόζης στα κύτταρα του Saccharomyces cerevisiae (Walker, 1998).

### 5. Συμπεράσματα

Η ανθεκτικότητα φυτοπαθογόνων σε μυκητοκτόνα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για τη φυτοπροστασία, με τους μηχανισμούς που τη διέπουν να μην είναι ακόμα πλήρως εξακριβωμένοι. Αυτό υπογραμμίζει την αναγκαιότητα ανάπτυξης σύγχρονων μεθόδων προσέγγισης του προβλήματος. Με την εφαρμογή μεταβολομικής στο μοντέλο οργανισμό *S. cerevisiae,* κατέστη δυνατή η μελέτη του YCF1 μεταφορέα, ενός ABC μεταφορέα που βρίσκεται στη μεμβράνη του κενοτοπίου, και της επίδρασής του στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι ο μεταφορέας YCF1 παίζει ρόλο στην ανθεκτικότητα (μειωμένη ευαισθησία) στο τριαζολικό μυκητοκτόνο flusilazole, το οποίο δεν έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα. Το flusilazole, φαίνεται να αποτελεί υπόστρωμα του μεταφορέα, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία που συσχετίζει τους ABC μεταφορείς με τα τριαζολικά μυκητοκτόνα (Ammar et al., 2014, Price et al., 2015). Η μεταβολομική ανάλυση έδειξε πως παρουσία του μυκητοκτόνου προκαλείται διατάραξη των μεταβολικών προφίλ τόσο του αγρίου όσο και του μεταλλαγμένου στελέχους (Δycf1), με διακριτές διαφορές μεταξύ τους.

Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί ο μεταφορέας YCF1 (Paumi et al., 2009), παρουσιάζει ομοιότητες με έναν από τους μηχανισμούς ανάπτυξης ανθεκτικότητας ζιζανίων στα ζιζανιοκτόνα που δεν σχετίζεται με το στόχο δράσης (Non-Target Site Mechanisms of Resistance, NTSR). Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα ζιζανίων σε ζιζανιοκτόνα μέσω του μηχανισμού απομάκρυνσης και απομόνωσης δ.ο. στα χυμοτόπια των φυτών *Conyza canadensis και Arabidopsis thaliana* (Ghanizadeh and Harrington, 2017)

Ο ρόλος των ABC μεταφορέων στην ανθεκτικότητα μυκήτων και ζιζανίων χρήζει περεταίρω μελέτης και προσοχής κατά την έρευνα και ανάπτυξη νέων Φ.Π. Επίσης, οι πληροφορίες που αποκτήθηκαν, θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την καλύτερη κατανόηση του φαινομένου της ανθεκτικότητας με περεταίρω μεταβολομική ανάλυση του σακχαρομύκητα και των κενοτοπίων του σε συνδυασμό με προηγμένες «ομικές» όπως proteomics, shotgun proteomics, RNA sequencing για την εις βάθος μελέτη του, εφαρμόζοντας μια προσέγγιση βιολογίας συστημάτων (systems biology).

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ALBI, T. & SERRANO, A. 2016. Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer. *World J Microbiol Biotechnol*, 32, 27.
- ALIFERIS, K. & JABAJI, S. 2010. 1H NMR and GC-MS metabolic fingerprinting of developmental stages of *Rhizoctonia solani* sclerotia. *Metabolomics*, 6, 96-108.
- ALIFERIS, K. A. & CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. 2011. Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. *Metabolomics*, **7**, 35-53.
- ALIFERIS, K. A., CUBETA, M. A. & JABAJI, S. 2013. Chemotaxonomy of fungi in the Rhizoctonia solani species complex performing GC/MS metabolite profiling. *Metabolomics*, 9, 159-169.
- ALIFERIS, K. A., FAUBERT, D. & JABAJI, S. 2014. A metabolic profiling strategy for the dissection of plant defense against fungal pathogens. *PloS one*, 9, e111930.
- ALIFERIS, K. A. & JABAJI, S. 2011. Metabolomics–A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and physiology*, 100, 105-117.
- ALIFERIS, K. A. & JABAJI, S. 2012. FT-ICR/MS and GC-EI/MS metabolomics networking unravels global potato sprout's responses to *Rhizoctonia solani* infection. *PLoS One*, **7**, e42576.
- AMMAR, G., TRYONO, R., BECHER, R., DEISING, H. & WIRSEL, S. Contribution of ABC transporters to azole resistance and virulence in *Fusarium graminearum*. Modern fungicides and antifungal compounds VII. Proceedings of the 17th International Reinhardsbrunn Symposium, April 21-25 2013, Friedrichroda, Germany, 2014. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft eV Verlag, 117-122.
- ANGELINI, R. M. D. M., POLLASTRO, S. & FARETRA, F. 2015. Genetics of Fungicide Resistance. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer.
- ASHBURNER, M., BALL, C. A., BLAKE, J. A., BOTSTEIN, D., BUTLER, H., CHERRY, J. M., DAVIS, A. P., DOLINSKI, K., DWIGHT, S. S., EPPIG, J. T., HARRIS, M. A., HILL, D. P., ISSEL-TARVER, L., KASARSKIS, A., LEWIS, S., MATESE, J. C., RICHARDSON, J. E., RINGWALD, M., RUBIN, G. M. & SHERLOCK, G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 25, 25-9.
- BACH, B., MEUDEC, E., LEPOUTRE, J.-P., ROSSIGNOL, T., BLONDIN, B., DEQUIN, S. & CAMARASA, C. 2009. New Insights into γ-Aminobutyric Acid Catabolism: Evidence for γ-Hydroxybutyric Acid and Polyhydroxybutyrate Synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4231-4239.
- BACKMAN, T. W., CAO, Y. & GIRKE, T. 2011. ChemMine tools: an online service for analyzing and clustering small molecules. *Nucleic acids research*, 39, W486-W491.
- BALCIOĞLU, G. & GÖNDER, Z. B. 2014. Recovery of baker's yeast wastewater with membrane processes for agricultural irrigation purpose: Fouling characterization. *Chemical Engineering Journal*, 255, 630-640.
- BAYRAM, Ö., FEUSSNER, K., DUMKOW, M., HERRFURTH, C., FEUSSNER, I. & BRAUS, G. H. 2016. Changes of global gene expression and secondary metabolite accumulation during lightdependent *Aspergillus nidulans* development. *Fungal Genetics and Biology*, 87, 30-53.
- BERGMAN, L. W. 2001. Growth and maintenance of yeast. *Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols*, 9-14.
- BERNARD, B. & LUX, A. 2017. How to feed the world sustainably: an overview of the discourse on agroecology and sustainable intensification. *Regional Environmental Change*, 17, 1279-1290.
- BONNER, M. R. & ALAVANJA, M. C. R. 2017. Pesticides, human health, and food security. *Food and Energy Security*, 6, 89-93.

- BOTSTEIN, D. & FINK, G. R. 2011. Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Genetics*, 189, 695-704.
- BRACONI, D., BERNARDINI, G. & SANTUCCI, A. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. *Journal of Proteomics*, 137, 19-34.
- BRAUS, G. H. 1991. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiological reviews*, 55, 349-370.
- BROHÉE, S., BARRIOT, R., MOREAU, Y. & ANDRÉ, B. 2010. YTPdb: A wiki database of yeast membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1798, 1908-1912.
- BRUGGEMAN, Q., PRUNIER, F., MAZUBERT, C., DE BONT, L., GARMIER, M., LUGAN, R., BENHAMED, M., BERGOUNIOUX, C., RAYNAUD, C. & DELARUE, M. 2015. Involvement of Arabidopsis Hexokinase1 in Cell Death Mediated by <em>Myo</em>-Inositol Accumulation. *The Plant Cell*, 27, 1801-1814.
- CANELAS, A. B., RAS, C., TEN PIERICK, A., VAN DAM, J. C., HEIJNEN, J. J. & VAN GULIK, W. M. 2008. Leakage-free rapid quenching technique for yeast metabolomics. *Metabolomics*, 4, 226-239.
- CANELAS, A. B., TEN PIERICK, A., RAS, C., SEIFAR, R. M., VAN DAM, J. C., VAN GULIK, W. M. & HEIJNEN, J. J. 2009. Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. *Analytical chemistry*, **81**, 7379-7389.
- CAO, Y., JIANG, T. & GIRKE, T. 2008. A maximum common substructure-based algorithm for searching and predicting drug-like compounds. *Bioinformatics*, 24, i366-i374.
- CASPI, R., BILLINGTON, R., FOERSTER, H., FULCHER, C. A., KESELER, I., KOTHARI, A., KRUMMENACKER, M., LATENDRESSE, M., MUELLER, L. A. & ONG, Q. 2016. BioCyc: Online Resource for Genome and Metabolic Pathway Analysis. *The FASEB Journal*, 30, Ib192-Ib192.
- CASTRILLO, J. I. & OLIVER, S. G. 2006. Metabolomics and Systems Biology in *Saccharomyces cerevisiae*. *In:* BROWN, A. J. P. (ed.) *Fungal Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- CHAMBERS, P. J. & PRETORIUS, I. S. 2010. Fermenting knowledge: the history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Reports*, 11, 914-920.
- CHERRY, J. M., HONG, E. L., AMUNDSEN, C., BALAKRISHNAN, R., BINKLEY, G., CHAN, E. T., CHRISTIE, K. R., COSTANZO, M. C., DWIGHT, S. S., ENGEL, S. R., FISK, D. G., HIRSCHMAN, J. E., HITZ, B. C., KARRA, K., KRIEGER, C. J., MIYASATO, S. R., NASH, R. S., PARK, J., SKRZYPEK, M. S., SIMISON, M., WENG, S. & WONG, E. D. 2012. Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 40, D700-D705.
- COMPAGNO, C., DASHKO, S. & PIŠKUR, J. 2014. Introduction to Carbon Metabolism in Yeast. *In:* PIŠKUR, J. & COMPAGNO, C. (eds.) *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- DASTIDAR, K. G., CHATTERJEE, A., CHATTERJEE, A. & MAJUMDER, A. L. 2006. Evolutionary divergence of L-myo-inositol 1-phosphate synthase: significance of a "core catalytic structure". *Biology of Inositols and Phosphoinositides.* Springer.
- DE WAARD, M. A., ANDRADE, A. C., HAYASHI, K., SCHOONBEEK, H.-J., STERGIOPOULOS, I. & ZWIERS, L.-H. 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science*, 62, 195-207.
- DEBIEU, D. & LEROUX, P. 2015. Sterol Biosynthesis Inhibitors: C-4 Demethylation. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens.* Springer.
- DECOTTIGNIES, A., KOLACZKOWSKI, M., BALZI, E. & GOFFEAU, A. 1994. Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast. *J Biol Chem*, 269, 12797-803.

- DEMIR, A. B. & KOÇ, A. 2015. High-copy overexpression screening reveals PDR5 as the main doxorubicin resistance gene in yeast. *PloS one*, 10, e0145108.
- DERANIEH, R. M., HE, Q., CARUSO, J. A. & GREENBERG, M. L. 2013. Phosphorylation Regulates myo-Inositol-3-phosphate Synthase: A NOVEL REGULATORY MECHANISM OF INOSITOL BIOSYNTHESIS. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 26822-26833.
- DING, M.-Z., TIAN, H.-C., CHENG, J.-S. & YUAN, Y.-J. 2009. Inoculum size-dependent interactive regulation of metabolism and stress response of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by comparative metabolomics. *Journal of Biotechnology*, 144, 279-286.
- DIXON, R. A., ACHNINE, L., KOTA, P., LIU, C. J., REDDY, M. & WANG, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular plant pathology*, 3, 371-390.
- DONAHUE, J. L., ALFORD, S. R., TORABINEJAD, J., KERWIN, R. E., NOURBAKHSH, A., RAY, W. K., HERNICK, M., HUANG, X., LYONS, B. M., HEIN, P. P. & GILLASPY, G. E. 2010. The *Arabidopsis thaliana Myo*-Inositol 1-Phosphate Synthase1 Gene Is Required for *Myo*inositol Synthesis and Suppression of Cell Death. *The Plant Cell*, 22, 888-903.
- DOS SANTOS, S. C. & SÁ-CORREIA, I. 2015. Yeast toxicogenomics: lessons from a eukaryotic cell model and cell factory. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 183-191.
- DOWNES, M. T., MEHLA, J., ANANTHASWAMY, N., WAKSCHLAG, A., LAMONDE, M., DINE, E., AMBUDKAR, S. V. & GOLIN, J. 2013. The transmission interface of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug transporter Pdr5: Val-656 located in intracellular loop 2 plays a major role in drug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **57**, 1025-1034.
- ELBEIN, A. D., PAN, Y. T., PASTUSZAK, I. & CARROLL, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13, 17r-27r.
- ELEUTHERIO, E., PANEK, A., DE MESQUITA, J. F., TREVISOL, E. & MAGALHÃES, R. 2015. Revisiting yeast trehalose metabolism. *Current Genetics*, 61, 263-274.
- ERNST, R., KLEMM, R., SCHMITT, L. & KUCHLER, K. 2005. Yeast ATP-Binding Cassette Transporters: Cellular Cleaning Pumps. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- EUROPEAN FOOD SAFETY, A. 2014. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flutianil. *EFSA Journal*, 12, 3805-n/a.
- EUROPEANCOMMISSION 2015. Final Review report for the active substance benzovindiflupyr. SANCO/11259/2015 rev. 1. EU Pesticides database.
- FIEHN, O. 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology*, 48, 155-171.
- FIEHN, O., ROBERTSON, D., GRIFFIN, J., VAN DER WERF, M., NIKOLAU, B., MORRISON, N., SUMNER, L. W., GOODACRE, R., HARDY, N. W. & TAYLOR, C. 2007. The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*, **3**, 175-178.
- FLETCHER, J. I., WILLIAMS, R. T., HENDERSON, M. J., NORRIS, M. D. & HABER, M. 2016. ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates*, 26, 1-9.
- FRAC. *Definition of fungicide resistance* [Online]. Available: <u>http://www.frac.info/resistance-</u> <u>overview/what-is-resistance-</u> 2017].
- FRAC 2017a. FRAC Code List ©2017: Fungicides sorted by mode of action. February 2017 ed.
- FRAC. 2017b. List of plant pathogenic organism resistant to disease control agents. Available: http://www.frac.info/publications/downloads.
- FRANCOIS, J. & PARROU, J. L. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol Rev, 25, 125-45.
- GHANIZADEH, H. & HARRINGTON, K. C. 2017. Non-target Site Mechanisms of Resistance to Herbicides. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36, 24-34.
- GIAEVER, G. & NISLOW, C. 2014. The Yeast Deletion Collection: A Decade of Functional Genomics. *Genetics*, 197, 451-465.

- GODDARD, M. R. & GREIG, D. 2015. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS Yeast Research*, 15, fov009-fov009.
- GOFFEAU, A., BARRELL, B. G., BUSSEY, H., DAVIS, R. W., DUJON, B., FELDMANN, H., GALIBERT, F., HOHEISEL, J. D., JACQ, C., JOHNSTON, M., LOUIS, E. J., MEWES, H. W., MURAKAMI, Y., PHILIPPSEN, P., TETTELIN, H. & OLIVER, S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science*, 274, 546, 563-7.
- GOLIN, J. & AMBUDKAR, SURESH V. 2015. The multidrug transporter Pdr5 on the 25th anniversary of its discovery: an important model for the study of asymmetric ABC transporters. *Biochemical Journal*, 467, 353-363.
- GOLIN, J., BARKATT, A., CRONIN, S., ENG, G. & MAY, L. 2000. Chemical Specificity of the *PDR5* Multidrug Resistance Gene Product of *Saccharomyces cerevisiae* Based on Studies with Tri-*n*-Alkyltin Chlorides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 134-138.
- GOLIN, J., KON, Z. N., WU, C. P., MARTELLO, J., HANSON, L., SUPERNAVAGE, S., AMBUDKAR, S. V.
  & SAUNA, Z. E. 2007. Complete inhibition of the Pdr5p multidrug efflux pump ATPase activity by its transport substrate clotrimazole suggests that GTP as well as ATP may be used as an energy source. *Biochemistry*, 46, 13109-19.
- GUICHERIT, E., BARTLETT, D., DALE, S., HAAS, H., SCALLIET, G. & WALTER, H. 2014. Solatenol-the second generation benzonorbornene SDHI carboxamide with outstanding performance against key crop diseases. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VII*, 67-72.
- GUNTER, A. B., HERMANS, A., BOSNICH, W., JOHNSON, D. A., HARRIS, L. J. & GLEDDIE, S. 2016. Protein engineering of *Saccharomyces cerevisiae* transporter Pdr5p identifies key residues that impact *Fusarium* mycotoxin export and resistance to inhibition. *MicrobiologyOpen*, 5, 979-991.
- HAHN, M. & LEROCH, M. 2015. Multidrug efflux transporters. *Fungicide resistance in plant pathogens.* Springer.
- HARTWELL, L., HOOD, L., GOLDBERG, M., REYNOLDS, A., SILVER, L. & VERES, R. 2014. Genetics: from genes to genomes. 2000. *Chapter*, 11, P408-410.
- HERMAN, P. K. 2002. Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 5, 602-607.
- HILLOCKS, R. J. 2012. Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. *Crop Protection*, 31, 85-93.
- HIRAGA, K., WANIGASEKERA, A., SUGI, H., HAMANAKA, N. & ODA, K. 2001. A Novel Screening for Inhibitors of a Pleiotropic Drug Resistant Pump, Pdr5, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 1589-1595.
- HOLLOMON, D. W. 2015. Fungicide resistance: 40 years on and still a major problem. *Fungicide resistance in plant pathogens*. Springer.
- HUYER, G., PILUEK, W. F., FANSLER, Z., KREFT, S. G., HOCHSTRASSER, M., BRODSKY, J. L. & MICHAELIS, S. 2004. Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 38369-38378.
- ISHII, H. 2015. Stability of resistance. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer.
- ITURRIAGA, G., SUÁREZ, R. & NOVA-FRANCO, B. 2009. Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 3793-3810.
- JEWISON, T., KNOX, C., NEVEU, V., DJOUMBOU, Y., GUO, A. C., LEE, J., LIU, P., MANDAL, R., KRISHNAMURTHY, R., SINELNIKOV, I., WILSON, M. & WISHART, D. S. 2012. YMDB: the Yeast Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, 40, D815-D820.
- JIMÉNEZ, J., BRU, S., PC RIBEIRO, M. & CLOTET, J. 2016. Phosphate: from stardust to eukaryotic cell cycle control. *International Microbiology*, 19, 133-141.
- JÓNSDÓTTIR, S. Ó., JØRGENSEN, F. S. & BRUNAK, S. 2005. Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drugs and drug candidates. *Bioinformatics*, 21, 2145-2160.

- JUNGWIRTH, H. & KUCHLER, K. 2006. Yeast ABC transporters—a tale of sex, stress, drugs and aging. *Febs Letters*, 580, 1131-1138.
- KALAMPOKIS, I. F., KAPETANAKIS, G. C., ALIFERIS, K. A. & DIALLINAS, G. 2018. Multiple nucleobase transporters contribute to boscalid sensitivity in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*.
- KATHAWALA, R. J., GUPTA, P., ASHBY, C. R. & CHEN, Z.-S. 2015. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. *Drug Resistance Updates*, 18, 1-17.
- KHURANA, N., SHARMA, N. & KHURANA, P. 2017. Overexpression of a heat stress inducible, wheat myo-inositol-1-phosphate synthase 2 (TaMIPS2) confers tolerance to various abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Agri Gene*, 6, 24-30.
- KIM, J. & KIM, K. H. 2017. Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*.
- KINNERSLEY, A. M. & TURANO, F. J. 2000. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19, 479-509.
- KLEIN, M., SWINNEN, S., THEVELEIN, J. M. & NEVOIGT, E. 2017. Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities. *Environmental microbiology*, 19, 878-893.
- KLIS, F. M., BOORSMA, A. & DE GROOT, P. W. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces* cerevisiae. Yeast, 23, 185-202.
- KLUG, L. & DAUM, G. 2014. Yeast lipid metabolism at a glance. FEMS Yeast Res, 14, 369-88.
- KOLACZKOWSKI, M., CYBULARZ-KOLACZKOWSKA, A., SOUMILLION, J.-P., KONINGS, W. N. & ANDRÉ, G. 1996. Anticancer drugs, ionophoric peptides, and steroids as substrates of the yeast multidrug transporter Pdr5p. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 31543-31548.
- KOLACZKOWSKI, M., KOLACZKOWSKA, A., LUCZYNSKI, J., WITEK, S. & ANDRÉ, G. 1998. *In vivo* characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microbial drug resistance*, 4, 143-158.
- KRETSCHMER, M., LEROCH, M., MOSBACH, A., WALKER, A.-S., FILLINGER, S., MERNKE, D., SCHOONBEEK, H.-J., PRADIER, J.-M., LEROUX, P. & DE WAARD, M. A. 2009. Fungicidedriven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathog*, 5, e1000696.
- KULAKOVSKAYA, T., RYASANOVA, L., DMITRIEV, V. & ZVONAREV, A. 2016. The Role of Inorganic Polyphosphates in Stress Response and Regulation of Enzyme Activities in Yeast. In: KULAKOVSKAYA, T., PAVLOV, E. & DEDKOVA, E. N. (eds.) Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells. Cham: Springer International Publishing.
- KWOLEK-MIREK, M. & ZADRAG-TECZA, R. 2014. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 14, 1068-1079.
- LAMICHHANE, J. R., DACHBRODT-SAAYDEH, S., KUDSK, P. & MESSÉAN, A. 2016. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. *Plant Disease*, 100, 10-24.
- LAZARD, M., HA-DUONG, N.-T., MOUNIÉ, S., PERRIN, R., PLATEAU, P. & BLANQUET, S. 2011. Selenodiglutathione uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar ATP-binding cassette transporter Ycf1p. *Febs Journal*, 278, 4112-4121.
- LE GUEDARD, M., BESSOULE, J. J., BOYER, V., AYCIRIEX, S., VELOURS, G., KULIK, W., EJSING, C. S., SHEVCHENKO, A., COULON, D. & LESSIRE, R. 2009. *PSI1* is responsible for the stearic acid enrichment that is characteristic of phosphatidylinositol in yeast. *The FEBS journal*, 276, 6412-6424.
- LEGRAS, J.-L., MERDINOGLU, D., CORNUET, J.-M. & KARST, F. 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 16, 2091-2102.

- LEROCH, M., PLESKEN, C., WEBER, R. W., KAUFF, F., SCALLIET, G. & HAHN, M. 2013. Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea*. *Applied and environmental microbiology*, 79, 159-167.
- LI, S. C. & KANE, P. M. 2009. The Yeast Lysosome-like Vacuole: Endpoint and Crossroads. *Biochimica et biophysica acta*, 1793, 650-663.
- LIU, Y., PAN, X. & LI, J. 2015. A 1961–2010 record of fertilizer use, pesticide application and cereal yields: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 83-93.
- MA, Z. & MICHAILIDES, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 24, 853-863.
- MASON, D. L. & MICHAELIS, S. 2002. Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATP-binding cassette transporter. *Molecular biology of the cell*, 13, 4443-4455.
- MATTANOVICH, D., SAUER, M. & GASSER, B. 2014. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. *Microbial Cell Factories*, 13, 34.
- MATTHIESSEN, P. & WELTJE, L. 2015. A review of the effects of azole compounds in fish and their possible involvement in masculinization of wild fish populations. *Crit Rev Toxicol*, 45, 453-67.
- MERNKE, D., DAHM, S., WALKER, A. S., LALEVE, A., FILLINGER, S., LEROCH, M. & HAHN, M. 2011. Two promoter rearrangements in a drug efflux transporter gene are responsible for the appearance and spread of multidrug resistance phenotype MDR2 in *Botrytis cinerea isolates* in French and German vineyards. *Phytopathology*, 101, 1176-83.
- MICHAELIS, S. & BARROWMAN, J. 2012. Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone a-factor, from yeast mating to human disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76, 626-651.
- MIKABERIDZE, A. & MCDONALD, B. A. 2015. Fitness cost of resistance: Impact on management. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens.* Springer.
- MOK, E., CONSTANTIN, B., FAVREAU, F., NEVEUX, N., MAGAUD, C., DELWAIL, A. & HANKARD, R. 2008. I-Glutamine administration reduces oxidized glutathione and MAP kinase signaling in dystrophic muscle of mdx mice. *Pediatric research*, 63, 268.
- MÜLLEDER, M., CALVANI, E., ALAM, M. T., WANG, R. K., ECKERSTORFER, F., ZELEZNIAK, A. & RALSER, M. 2016. Functional Metabolomics Describes the Yeast Biosynthetic Regulome. *Cell*, 167, 553-565.e12.
- MUSTACCHI, R., HOHMANN, S. & NIELSEN, J. 2006. Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast*, 23, 227-38.
- NANDY, S. K. & SRIVASTAVA, R. K. 2018. A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications. *Microbiological Research*, 207, 83-90.
- NAOUMKINA, M. A., ZHAO, Q., GALLEGO-GIRALDO, L., DAI, X., ZHAO, P. X. & DIXON, R. A. 2010. Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular plant pathology*, 11, 829-846.
- NISLOW, C., WONG, L. H., LEE, A. H.-Y. & GIAEVER, G. 2016. Functional Genomics Using the *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Deletion Collections. *Cold Spring Harbor Protocols,* 2016, pdb. top080945.
- NUGROHO, R. H., YOSHIKAWA, K. & SHIMIZU, H. 2015. Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120, 396-404.
- OERKE, E.-C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144, 31-43.
- OLIVER, S. G. 2002. Functional genomics: lessons from yeast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357, 17-23.

- PASTEUR, L. 1876. Études sur la bière: ses maladies, causes qui les provoquent, procédé pour la rendre inaltérable, Gauthier-Villars.
- PAUMI, C. M., CHUK, M., CHEVELEV, I., STAGLJAR, I. & MICHAELIS, S. 2008. Negative regulation of the yeast ABC transporter Ycf1p by phosphorylation within its N-terminal extension. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 27079-27088.
- PAUMI, C. M., CHUK, M., SNIDER, J., STAGLJAR, I. & MICHAELIS, S. 2009. ABC transporters in Saccharomyces cerevisiae and their interactors: new technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73, 577-93.
- PAUMI, C. M., MENENDEZ, J., ARNOLDO, A., ENGELS, K., IYER, K. R., THAMINY, S., GEORGIEV, O., BARRAL, Y., MICHAELIS, S. & STAGLJAR, I. 2007. Mapping Protein-Protein Interactions for the Yeast ABC Transporter Ycf1p by Integrated Split-Ubiquitin Membrane Yeast Two-Hybrid Analysis. *Molecular Cell*, 26, 15-25.
- PERLIN, M. H., ANDREWS, J. & SAN TOH, S. 2014. Essential Letters in the Fungal Alphabet: ABC and MFS Transporters and Their Roles in Survival and Pathogenicity. *In:* THEODORE FRIEDMANN, J. C. D. & STEPHEN, F. G. (eds.) *Advances in Genetics*. Academic Press.
- PETTERSEN, E. F., GODDARD, T. D., HUANG, C. C., COUCH, G. S., GREENBLATT, D. M., MENG, E. C. & FERRIN, T. E. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25, 1605-1612.
- PRASAD, R., KHANDELWAL, N. K. & BANERJEE, A. 2016. Yeast ABC transporters in lipid trafficking. *Fungal Genetics and Biology*, 93, 25-34.
- PRICE, C. L., PARKER, J. E., WARRILOW, A. G., KELLY, D. E. & KELLY, S. L. 2015. Azole fungicides understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest management science*, 71, 1054-1058.
- REAVES, M. L. & RABINOWITZ, J. D. 2011. Metabolomics in systems microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 17-25.
- RICHARDS, A., VESES, V. & GOW, N. A. R. 2010. Vacuole dynamics in fungi. *Fungal Biology Reviews*, 24, 93-105.
- RODRIGUES, F., LUDOVICO, P. & LEÃO, C. 2006. Sugar metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer.
- ROGERS, B., DECOTTIGNIES, A., KOLACZKOWSKI, M., CARVAJAL, E., BALZI, E. & GOFFEAU, A. 2001. The pleitropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, **3**, 207-214.
- RUTLEDGE, R. M., ESSER, L., MA, J. & XIA, D. 2011. Toward understanding the mechanism of action of the yeast multidrug resistance transporter Pdr5p: A molecular modeling study. *Journal of Structural Biology*, 173, 333-344.
- SAIARDI, A. 2016. Functions of Inositol Polyphosphate and Inorganic Polyphosphate in Yeast and Amoeba. In: KULAKOVSKAYA, T., PAVLOV, E. & DEDKOVA, E. N. (eds.) Inorganic Polyphosphates in Eukaryotic Cells. Cham: Springer International Publishing.
- SAITO, H. 2010. Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 677-683.
- SANGLARD, D. 2016. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Frontiers in medicine*, 3, 11.
- SANTOMARTINO, R., RIEGO-RUIZ, L. & BIANCHI, M. M. 2017. Three, two, one yeast fatty acid desaturases: regulation and function. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 89.
- SCHNEIDER-POETSCH, T., JU, J., EYLER, D. E., DANG, Y., BHAT, S., MERRICK, W. C., GREEN, R., SHEN, B. & LIU, J. O. 2010. Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nature chemical biology*, 6, 209-217.

- SCHWELBERGER, H. 2012. Growth media for yeast (Saccharomyces cerevisiae) [Online]. Histamine Methods & Tools Database. Available: https://www.imed.ac.at/hmtd/genmeth/cellmethods/docs/mediayeast.pdf.
- SEEGER, M. A., BORDIGNON, E. & HOHL, M. 2016. ABC Exporters from a Structural Perspective. *ABC Transporters-40 Years on.* Springer.
- SHARMA, K. G., MASON, D. L., LIU, G., REA, P. A., BACHHAWAT, A. K. & MICHAELIS, S. 2002. Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a Saccharomyces cerevisiae MRP-type ABC transporter. Eukaryotic Cell, 1, 391-400.
- SIEROTZKI, H. 2015. Respiration inhibitors: complex III. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens.* Springer.
- SNIDER, J., HANIF, A., LEE, M. E., JIN, K., YU, A. R., GRAHAM, C., CHUK, M., DAMJANOVIC, D., WIERZBICKA, M., TANG, P., BALDERES, D., WONG, V., JESSULAT, M., DAROWSKI, K. D., SAN LUIS, B.-J., SHEVELEV, I., STURLEY, S. L., BOONE, C., GREENBLATT, J. F., ZHANG, Z., PAUMI, C. M., BABU, M., PARK, H.-O., MICHAELIS, S. & STAGLJAR, I. 2013. Mapping the functional yeast ABC transporter interactome. *Nat Chem Biol*, 9, 565-572.
- STAMMLER, G., WOLF, A., GLAETTLI, A. & KLAPPACH, K. 2015. Respiration inhibitors: complex II. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens.* Springer.
- STEFKOVA, J., POLEDNE, R. & HUBACEK, J. A. 2004. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*, 53, 235-43.
- STEWART, G. G. 2014. SACCHAROMYCES | Saccharomyces cerevisiae A2 Batt, Carl A. In: TORTORELLO, M. L. (ed.) Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). Oxford: Academic Press.
- SZCZYPKA, M. S., WEMMIE, J. A., MOYE-ROWLEY, W. S. & THIELE, D. J. 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *J Biol Chem*, 269, 22853-7.
- SZÖLLŐSI, D., ROSE-SPERLING, D., HELLMICH, U. A. & STOCKNER, T. 2017. Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*.
- TAKAGAKI, M. 2015. Melanin biosynthesis inhibitors. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer.
- TALAVERA, N., NAVARRO, M., SIFONTES, Á. B., DÍAZ, Y., VILLALOBOS, H., NIÑO-VEGA, G., BOADA-SUCRE, A. A. & GONZÁLEZ, I. 2013. 5. Green synthesis of nanosized vanadium pentoxide using Saccharomyces cerevisiae as biotemplate. Recent Research Developments in Materials Science, 10, 89.
- TEIXEIRA, M. C., FERNANDES, A. R., MIRA, N. P., BECKER, J. D. & SÁ-CORREIA, I. 2006. Early transcriptional response of Saccharomyces cerevisiae to stress imposed by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Yeast Research*, 6, 230-248.
- TER BEEK, J., GUSKOV, A. & SLOTBOOM, D. J. 2014. Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology*.
- THEODOULOU, F. L. & KERR, I. D. 2015. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions*, 43, 1033-1040.
- TSUGAWA, H., CAJKA, T., KIND, T., MA, Y., HIGGINS, B., IKEDA, K., KANAZAWA, M., VANDERGHEYNST, J., FIEHN, O. & ARITA, M. 2015. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature methods*, **12**, **523**-526.
- VAN DIJCK, P., DE ROP, L., SZLUFCIK, K., VAN AEL, E. & THEVELEIN, J. M. 2002. Disruption of the Candida albicans TPS2 gene encoding trehalose-6-phosphate phosphatase decreases infectivity without affecting hypha formation. Infect Immun, 70, 1772-82.
- WALKER, G. M. 1998. Yeast physiology and biotechnology, John Wiley & Sons.
- WEZEL, A., CASAGRANDE, M., CELETTE, F., VIAN, J.-F., FERRER, A. & PEIGNÉ, J. 2014. Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. Agronomy for sustainable development, 34, 1-20.

- WIKLUND, S., JOHANSSON, E., SJOSTROM, L., MELLEROWICZ, E. J., EDLUND, U., SHOCKCOR, J. P., GOTTFRIES, J., MORITZ, T. & TRYGG, J. 2008. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem*, 80, 115-22.
- WILKENS, S. 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*, 7, 14.
- WISE, D. R. & THOMPSON, C. B. 2010. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 35, 427-433.
- WISHART, D. S. 2015. Introduction to Cheminformatics. *Current Protocols in Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc.
- XIE, J. L., POLVI, E. J., SHEKHAR-GUTURJA, T. & COWEN, L. E. 2014. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future microbiology*, 9, 523-542.
- XU, Y.-J., WANG, C., HO, W. E. & ONG, C. N. 2014. Recent developments and applications of metabolomics in microbiological investigations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 56, 37-48.
- YANG, S.-H., SHARROCKS, A. D. & WHITMARSH, A. J. 2013. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*, 513, 1-13.
- YOUNG, D. H. 2015. Anti-tubulin Agents. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer.
- ZAMPIERI, M. & SAUER, U. 2017. Metabolomics-driven understanding of genotype-phenotype relations in model organisms. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 28-36.
- ZIOGAS, B. N. & MALANDRAKIS, A. A. 2015. Sterol biosynthesis inhibitors: C14 demethylation (DMIs). *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer.
- ΖίΩΓΑς, Β. & ΜΑΡΚΌΓΛΟΥ, Α. 2010. Γεωργική Φαρμακολογία, Ελληνικής Εκδοσης, 2010.
Παράρτημα

,

## Παράρτημα Α

Χρωματογράφημα GC/EI/MS του μυκητοκτόνου flusilazole (10  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>).



## Παράρτημα Β

Μεταβολική βάση δεδομένων GC/EI/MS (matrix) του Saccharomyces cerevisiae. Ανιχνεύθηκαν 198 μεταβολικά χαρακτηριστικά, εκ των οποίων 90 ταυτοποιήθηκαν.

	A	-	0	0	2		9	I	-	-	K		W	N	0	a
		Quant						Golm		CAS Registry	Abbreviat	ed Mor	loisotopic	Average Molecular	Molecular	
	RT (min) *	T mass (m	Metabolites (Raw)	Metabolites (Common name)	(Derivatives)	Synonym(s)	KEGG D	Metabolome Database *	PubChem ID	Number 🔫	Biosynthetic pathway(s) Biosynthet	H P	ass (Da	Mass (Da)	Formula	Chemical group
N	10,34	116	L-Alanine, N-(trimethylsilyl)-, trimethyl	I L-Alanine	L-Alanine (2TMS)	L-Alanine; L-2-Aminol	C00041	A110001	5950	58-41-7	map00250Alanine, aspart map00250	1 map00: 89.	04767847	89,0932	C3H7NO2	Amino acids
m	10,57	73	Tris(trimethylsilyl)hydroxylamine	Tris(trimethylsilyl)hydroxyl	arr Tris(trimethylsilyl)hydro	ox (Reagent)	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
4	10,86	102	Glycine, N-(trimethylsilyl)-, trimethylsil	I Glycine	Glycine (2TMS)	Aminoacetic acid; Am	C00037	A133001	750	56-40-6	map00230Purine metabo map00230	map00: 75	6,032028	75,0666	C2H5NO2	Amino acids
5	11.37	147	Oxalic acid, bis(trimethylsilyl) ester	Oxalic acid	Oxalic acid (2TMS)	Oxalate;Oxalic acid;E	C00209	A113002	971	18294-04-7	map00825Chloroalkane a map00825	5 map00 8	19,9953	90,0349	C2H2O4	Carboxylic acids
10	11,42	142	RT11.42	RT11.42	RT11.42	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
~	11,54	147	5.6 -Dihydrouracil (2TMS)	5.6 -Dihydrouracil	5.6 -Dihydrouracil (211	M 5.6-Dihydrouracil; Dih	C00429	n/a	649	504-07-4	map00240Pyrimidine mel map0024 r	map004	14,0429	114,1026	C4HBN2O2	Nucleic acids, nucle
60	11,85	86	L-Leucine, trimethylsilyl ester	L-Leucine	L-Leucine (TMS)	L-Leucine; 2-Amino-4	C00123	A129002	3423	61-90-5	map00280Valine, leucine map00280	1 map00: 1	31,0946	131,0946	C6H13NO2	Amino acids
0	12.33	20	L-Proline, trimethylsilyl ester	L-Proline	L-Proline (TMS)	L-Proline; 2-Pyrrolidin	C00148	A132003	145742	147-85-3	map00330 Arginine and pi map00330	1 map001 1.	15,0633	115,1305	C6H9NO2	Amino acids
10	12.46	88	L-Isoleucine, trimethylsilyl ester	L-Isoleucine	L-Isoleucine (TMS)	2-Amino-3-methylvale	C00407	A119002	6306	73-32-5	map00280 Valine leucine map00280	1 map00: 1:	31,0946	131,1729	C6H13NO2	Amino acids
=	12,52	130	L-Tryptophan	L-Tryptophan	L-Tryptophan	L-Tryptophan; Tryptop	C00078	A223001	6305	73-22-3	map00260Glycine, serine map00260	1 map00: 2	04.0899	204,2252	C11H12N2O2	Amino acids
12	12.75	281	Pentasiloxane, dodecamethyl-	Pentasiloxane, dodecam	eth Pentasiloxane, doded	ca (Contaminant)	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
1	13.17	147	RT13.17	RT13.17	RT13.17	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	e/u	n/a	n/a
14	13,84	144	L-Valine, N-(trimethylsilyl)-, trimethyls	L-Valine	L-Valine (2TMS)	L-Valine; 2-Amino-3-n	C00183	A122001	6287	72-18-4	map00280Valine, leucine map00280	1 map00: 1.	0510,71	117,1463	C5H11NO2	Amino acids
15	14,48	179	Benzoic acid trimethylsilyl ester	Benzoic acid	Benzoic acid (TMS)	Benzoate; Benzoic ac	C00180	A128003	243	85-85-0	map00360Phenylalanine map00360	1 map00 1	22,0368	122,1213	C7H8O2	Carboxylic acids
16	14,50	189	Urea, N.N'-bis(trimethylsilyl)-	Urea	Urea (2TMS)	Urea; Carbamide	C00086	A127002	1176	18297-63-7	map00220Arginine biosyr map00220	map00 6	0.0324	60,0553	CH4N2O	Heterocyclic compo
17	14.62	281	Hexanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-,	Hexanoic acid	Hexanoic acid (2TMS)	) Hexanoic acid; Hexan	C01585	n/a	4740	142-82-1	n/a n/a	1	16,0837	116,1583	C6H12O2	Fatty acyls; Fatty ac
15	14,74	278	Carbamic acid.(trimethylsilyl)[(trimeth	Carbamic acid	Carbamic acid (3TMS)	) Aminoformic acid	C01563	A116008	277 \$	83-77-4 302-11	map00240Pyrimidine met map00240	1 map001 6	11.0164	61,04	CH3NO2	Carboxylic acids
5	14,97	60	RT14.97	RT14.97	RT14.97	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
20	14,99	132	Serine, bis(trimethylsilyl)-	Serine	Serine (2TMS)	L-Serine; L-2-Amino-3	C00065	A138001	5951	56-45-1	map00260Glycine, serine map00260	1 map00: 1	05,0426	105,0928	C3H7NO3	Amino acids
21	15.06	201	RT15.06	RT15.06	RT15.06	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
22	15,26	174	2-Aminoethanol	2-Aminoethanol	2-Aminoethanol (3TM	IS Ethanolamine; Amino	C00189	n/a	3489	141-43-5	map00564Glyoerophosph map00564	+ map01	11.0528	61,0831	C2H7NO	Alcohols; Amino alc
5	15,50	158	L-Leucine, N-(trimethylsilyl)-, trimethy	L-Leucine	L-Leucine (2TMS)	L-Leucine; 2-Amino-4	C00123	A129002	3423	61-90-5	map00280Valine, leucine map00280	1 map001 13	1.094629	131,1729	C6H13NO2	Amino acids
24	15,63	299	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1)	Phosphate	Phosphate (TMS)	Orthophosphate; Phos	C00009	A129001	3311	10497-05-9	map001900xidativephosp map00190	map00	97.9769	97,9952	H3PO4	Phosporic acid deriv
52	15.72	73	Trimethylsilyl ether of glycerol	Glycerol	Glycerol (TMS)	Glycerol: Glycerin: 1.2	C00116	A129003	3416	56-81-5	map00040Pentose and gl map0004 r	map000!	2.0473	92,0938	C3H8O3	Carbohydrates
26	15,96	184	Benzeneacetic acid, trimethylsilyl esti	Benzenescetic acid	Benzeneacetic acid (T	IN Phenylacetic acid; Be	C07086	n/a	9297	2078-18-4	map00360Phenylalanine map00360	1 map001 1	36,0524	136,1479	C8H8O2	Carboxylic acids
27	16.07	117	L-Threonine, O-(trimethylsilyl)-, trimet	t L-Threonine	L-Threonine (2TMS)	L-Threonine; 2-Amino	C00188	A132001	6288	72-19-5	msp00260Glycine, serine msp00260	1 map00: 1	19.0582	119,1192	C4H9NO3	Amino acids
28	16,10	158	L-Isoleucine, N-(trimethylsilyl)-, trimetl	L-Isoleucine	L-Isoleucine (2TMS)	L-Isoleucine; 2-Amino-3-r	C00407	A132002	8306	73-32-5	map00280Valine, leucine and map00280 n	nap00290	131,0946	131,1729	C6H13NO2	Amino acids
53	16.17	102	RT16.17	RT16.17	RT16.17	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
20	16,35	69	RT16.35	RT16.35	RT16.35	n/a	e/u	n/a	e/u	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
31	16,39	174	Glycine, N.N-bis(trimethylsilyl)-, trimet	t Glycine	Glycine (3TMS)	Aminoacetic acid; Am	C00037	A133001	750	56-40-6	map00230Purine metabo map00230	map00: 75	6,032028	75,0666	C2H5NO2	Amino acids
32	16,59	147	Succinic acid (2TMS)	Succinic acid	Succinic acid (2TMS)	Succinate; Succinic a	C00042	A134001	1110	110-15-6	map00020Citrate cycle (T map00020	1 100dem	18,088	118,0266	C4H6O4	Carboxylic acids
33	16.93	147	RT16.93	RT16.93	RT16.93	U/a	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
Z	17.08	184	RT17.08	RT21.08 (Hydrocarbon)	RT17.08(Hydrocarbon)	) n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
35	17,28	241	Uracil, 1.3-bis(trimethylsilyl)-	Uracil	Uracil (2TMS)	Uraci	C00108	A136001	3406	66-22-8	map00240Pyrimidine met map00240	11. 11.	2.027277	112,0868	C4H4N2O2	Nucleic acids, nucle
36	17.48	245	Fumaric acid, bis(trimethylsilyl) ester	Fumaric acid	Fumaric acid (2TMS)	Fumarate; (e)-2-Buten	C00122	A137001	444972	110-17-8	map00020Citrate cycle (T map00020	11 map00 11	6.010959	116,0722	C4H4O4	Carboxylic acids
37	17.63	57	RT17.63 (Hydrocarbon)	RT17.63 (Hydrocarbon)	RT17.63 (Hydrocarbon	s/u (u	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
89	17.71	215	Nonanoic acid, trimethylsilyl ester	Nonanoic acid	Nonanoic acid (TMS)	Nonanoic acid; Nonar	C01601	A138003	8158	82326-11-2	n/a n/a	÷	58.1307	158,238	C9H18O2	Fatty acyls; Fatty ac
39	17.80	188	RT17.80	RT17.80	RT17.80	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
40	18,07	204	Serine tritms	Serine	Serine (3TMS)	Serine; 2-Amino-3-hyc	C00716	n/a	3982	58-45-1	map02030Bacterial chem map02030	1	05,0428	105,0926	C3H7NO3	Amino acids
41	18,50	117	RT18.50	RT18.50	RT18.50	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
4	18,66	131	RT18.68	RT18.68	RT18.66	n/a	e/u	e/u	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
4	18,79	13	N,O,O-Tris(trimethylsilyl)-L-threonine	L-Threonine	L-Threonine (3TMS)	L-Threonine; 2-Amind	C00188	A140001	3488	72-19-5	map00260Glycine, serine map00260	map00: 11	9,058243	119,1192	C4HBNO3	Amino acids
4	18,87	239	Hydroquinone bis(trimethylsilyl) ether	Hydroquinone	Hydroquinone (2TMS)	Hydroquinone; p-Benz	C00530	D/8	3612	123-31-9	map00350Tyrosine metat map00350	1 map00: 1	10,0368	110,1106	CEHEOZ	Quinones
45	18,94	131	RT18.94	RT18.94	RT18.94	n/a	B/U	n/a	1/a	n/a	n/a n/a		D/3	n/a	n/a	n/a
40	00'61	104	00.8LTH	N119.00	N119.00	D/a	8/0	D/8	D/8	8/U	D/8		D/a	D/8	D/8	U/a
47	19,18	221	RT19.18	RT19.18	RT19.18	n/a	B/U	8/U	U/8	E/U	n/a		D/a	B/1	D/B	n/a
48	00.00	100	L-Aspartic acid, bis(trimethylsilyl) este	A	L-Aspartic actd (21 MS	<ul> <li>L-Aspartate: L-Aspartic</li> </ul>	C00048	A152002	10260	0-20-20200	mapuuzzuArginine biosyr mapuuzzu	1 nugen 1	33,03/5	133,102/	CAH/NO4	Amino acids
1 1	00'07	141	Alemond	DTON 4.4	AUDITION AN	ds-houriliate, us-hour	115000	ala	oror ala	1-1 J-00000		1 unodelli u		117, 1002	ourou o	ceruoxyric actus
3 3	20.02	000	PT-02	DT20 22	BT20.22	6/4	0/0	0/0		6/0	0/c 0/c		0/4	6/H	e/c	6/4
1	20.02	24.47	DTOD ED	DTOD ED	DTON ED	0.14 0.14	0/10		0.00	0/0	0 mi		0 mi	ala	a/a	0/s
10	20.02	218	Aminomalopic acid tristrimathylsilyl)	Aminomatonic acid	Aminomalonic acid (3	T Aminomalonate Amin	C00872	A141074	100714	1068-84-4	0/a		19.022	119.078	CSHENO4	Carbovilo acide
1 3	20.90	232	RT20.90	RT20.90	RT20.90	B/U	n/a	n/a	D/9	n/a	n/a		n/a	8/U	n/a	n/a
55	21.08	12	RT21.08 (Hvdrocarbon)	RT21.08 (Hydrocarbon)	RT21.08 (Hydrocarbor	e/u (u	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	Hvdrocarbons
56	21,17	85	RT21.17	RT21.17	RT21.17	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
57	21,29	214	RT21.29	RT21.29	RT21.29	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a
50	21,39	73	DL-Malic acid, O-trimethylsilyl-, bis(tri	Malicacid	Malicacid (3TMS)	(S)-Malate; L-Malate;	C00149	A149001	222656	97-67-6	map00020Citrate cycle (T map00020	0 map00( 13	4.021523	134,0874	C4H8O5	Carboxylic acids
59	21,57	73	3,6,9-Trioxa-2,10-disilaundecane, 2,2	2 Diethylene glycol	Diethylene glycol (211	M: Diethylene glycol; 2.2	C14689	n/a	17395688	16654-74-3	n/a n/a		06,063	106,1204	C4H10O3	Alcohols; Ethylene
8	21.63	159	RT21.63	RT21.63	RT21.63	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a		n/a	n/a	n/a	n/a

m Qua	ant mass (n	Metabolites (Raw) Metabolites (Common nar	me) Metabolites (Derivatives	Synonym(s)	KEGGID	Golm Metabolom	PubChem ID	CAS Registry Numb	He Biosynthetic pathway(s) Abbreviated Biosy	nthe Monoisotopic mas	is Average Molecular Mass	s (Da Molecular Formula	Chemical group
	273	Citric acid, tetrakis(trimethylsilyl) deriv Citric acid	Citric acid (4TMS)	Citrate; Citric acid; 2-h	C00158	A182004	311	77-92-9	map00020Citrate cycle (T map00020 ma	p00: 192,027	192,1235	C6H8O7	Carboxylic acids
14	385	Tetradecanoic acid, trimethylsilyl este Myristic acid	Myristic acid (TMS)	Tetradecanoic acid; T	C06424	n/a	8659	18603-17-3	map00061Fatty acid biosy map00061 ma	p01 228,2089	228,3709	C14H28O2	Fatty acyls: Fatty aci
	174	(L-Lysine?) L-Lysine	L-Lysine (3TMS)	Lysine acid; 2,6-Diam	C00047	A192003	5962	56-87-1	map00300Lysine biosynth map00300 ma	p00: 146,1055	146,1876	C6H14N2O2	Amino acids
	149	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-n Diisobutyl phthalate	Diisobutyl phthalate	DIBP	C15205	n/a	17396202	84-69-5	n/a n/a	278,1518	278,3435	C16H22O4	Carboxylic acids
	301	RT29.53 RT29.53	RT29.53	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	217	Carbohydrates RT29.66 (Carbohydrate	RT29.66 (Carbohydra)	te) n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	n/a	Carbohydrates
2.0	226	RT29.72 RT29.72	RT29.72	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	354	RT29.77 RT29.77	RT29.77	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
	57	(Hydrocarbon) RT (Hydrocarbon)	RT (Hydrocarbon)	n/a	e/u	n/a	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
	179	RT29.88 RT29.88	RT29.88	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
	57	(Hydrocarbon) RT29.97 (Hydrocarbon)	RT29.97 (Hydrocarbol	e/u (u	n/a	n/a	e/u	e/u	n/a n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
	245	RT29.98 RT29.98	RT29.98	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	B/U	n/a	n/a	n/a
1.0	241	RT30.06 RT30.06	RT30.06	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
	71	(Hvdrocarbon) RT30.23 (Hvdrocarbon)	RT30 23 (Hvdrocarboi	n) n/a	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	Hvdrocarbons
	22	(Hudrocarbon) RT30.31 (Hudrocarbon)	RT30 31 (Hudrocarho	a) n/a	a/u	a/u	e/u	a/u		a/1	alu	aj c	Hudrocarhone
	1.	(Hideochool) AF (Hideochool)	DT20 AF (Hidrometer	en la	0/0	0/0	0/0	0/0			0/0	0/0	Lindeo conhone
1	100	P Climent 2 2 4 5 8 antibit O think Climent	Climate (ETMO)	D Glusses Grass and	POULO	A101014	2002	20001	ma monotochastic / Clumonoto mo	000000 100 100	400 4550	accenac	Code buildentes
1	107	D-GIUGOSE, Z,S,4,D,0-PERIBAIS-O-(TIME GIUGOSE	CINCOSE (DI MO)	n-cincose; crape sug	10000		0195	1-00-00	mapuou ruciyooiysis / Giu mapuuu ru ma	0000 100,003300	100,1003	0071400	Caroonydrates
	4/1	K130.0/	K130.6/	n/a	8/L	8/U	8/0	6/U	n/a	8/1	8/0	6/L	0/3
1	319	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trime Glucose	Glucose (5TMS)	D-Glucose; Grape sug	C00031	A191001	5793	50-99-7	map00010Glycolysis / Glu map00010 ma	000 180,063388	180,1559	C6H12O8	Carbohydrates
	174	L-Lysine, N2,N8,N8-tris(trimethylsilyl)-, L-Lysine	L-Lysine (3TMS)	L-Lysine; Lysine acid;	C00047	A192003	5962	58-87-1	map00300Lysine biosynth map00300 ma	p00: 146,1055	146,1876	C6H14N2O2	Amino acids
	205	RT30.91 RT30.91	RT30.91	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	195	RT30.99 RT30.99	RT30.99	n/a	n/8	n/a	e/u	n/a	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a
	73	D-Glucose, 2.3.4.5.6-pentakis-O-(trime D-Glucose	D-Glucose (5TMS)	D-Glucose: Grape sug	C00031	A191001	5793	20-99-7	map00010Glycolysis / Glu map00010 ma	001 180.083388	180.1559	C6H12O6	Carbohvdrates
	218	L-Tvrosine N.O-bis/trimethylsilyl)- trir L-Tvrosine	L-Tyrosine (3TMS)	L-Tvrosiner (S)-3-(o-Hv	C00082	A194002	6057	80-18-4	map00130Ubiouinone an map00130: ms	000 181 0739	181 1885	C9H11NO3	Amino acids
	149	RT31.25 RT31.25	RT31.25	n/a	n/a	8/0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
	1	Indescendent D2(Hudescendent)	DT01 20(Hodrochod	ala I		010	0/0	0/0	e/c	ala.			Lindenearhane
	010	D.Manufall 1 2 2 4 6 P. havebie O. this D.manufall	D monthal (ATMS)	Mannitol: D.Mannitol	COCOCO	A100001	19CA	RORFO	man0061 Eristors and a man0061 ma	020 CO1 100	102 1710	CRUITCR	Carbohudrater: Carl
	010		Control tottered	Manaital: D.Manaital	100000	NOOCOT V	1070	0.000		1020 0020 000	402 4740	activities	Carbohinguiates, Cart
	010		(SMIO) IOIIIIIau	Commission of the second secon	10000	2000014	1070	0-00-00		0010'201 10700	102,1110	201100	Carbonydrates, Car
1	117	RI31.00(Larbonyorate) RI31.00(Larbonyorate)	RI31.00(Carbonydrat	e) u/a	6/L	6/L	B/U	6/U	n/a	8/U	E/U	6/L	Carbonydrates
	112	RI31./4 RI31./4	R131./4	U/B	B/U	8/U	B/U	0/B	U/8	8/1	0/8	8/C	D/8
	217	Carbohydrates RT31.77(Carbohydrate)	RT31.77(Carbohydrat	e) n/a	e/u	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	8/U	Carbohydrates
1	174	RT31.94 RT31.94	RT31.94	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	B/U	B/U	n/a	n/a
	212	RT32.08 RT32.08	RT32.08	n/a	e/u	n/a	n/a	e/u	n/a	n/a	e/u	n/a	n/a
	505	2,4,6-Tris(1,1-dimethylethyl)-4-methyl 2,4,6-Tris(1,1-dimethyle	ethyl) 2.4.6-Tris(1.1-dimethy	le 2,4,6-Tris(1,1-dimethy	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	276,2453	276,446	CuHuO	Terpenoids
14	04	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trime D-Glucose	D-Glucose (5TMS)	D-Glucose; Grape sug	C00031	A191001	5793	50-99-7	map00010Glycolysis / Glu map00010 ma	p001 180,063388	180,1559	C6H12O6	Carbohydrates
0	13	Palmitic acid, trimethylsilyl ester Palmitic acid	Palmitic acid(TMS)	Hexadecanoic acid; H	C00249	A205001	985	57-10-3	map00061Fatty acid biosy map00061 ma	p001 256,24023	256,4241	C16H32O2	Fatty acyls; Fatty ac
14	21	RT32.97 RT32.97	RT32.97	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
1	22	(Hydrocarbon) RT33.07 (Hydrocarbon)	RT33.07 (Hydrocarbol	e/u (u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
	218	RT33.23 RT33.23	RT33.23	n/a	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
	204	Carbohydrates RT33.31 (Carbohydrate	RT33.31 (Carbohydra)	te) n/a	e/u	e/u	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	Carbohydrates
1	LIC	RT33.252 RT33.252	RT33.252	n/a	e/u	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
	LIC	(Hvdrocarbon) RT33.76 (Hvdrocarbon)	RT33.76 (Hydrocarboi	n) n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	Hydrocarbons
	127	RT33.82 RT33.82	RT33.82	n/a	n/a	n/a	n/8	n/a	n/a	n/8	n/a	e/u	n/a
62	113	RT33.94 RT33.94	RT33.94	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	191	RT34.10 RT34.10	RT34.10	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
	305	Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(tri Myo-Inositol	Myo-Inositol (6TMS)	myo-Inositol; D-myo-Ir	C00137	A209002	892	87-89-8	map00052Galactose meti map00052 ma	000 180,063388	180,1559	C6H12O6	Carbohydrates; Carl
1	148	RT34.35 RT34.35	RT34.35	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
1	141	1H-Purine-2,6,8(3H)-trione, 4,9-dihydr Uric acid	Uric acid (4TMS)	Urate; Uric acid	C00366	n/a	3657	55530-45-5	map00230Purine metabo map00230 ma	p01 168,0283	168,1103	C5H4N4O3	Heterocyclic compo
	284	RT34.51 RT34.51	RT34.51	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	327	Heptadecanoic acid, trimethylsilyl est Heptadecanoic acid	Heptadecanoic acid (	TN Margaric acid	e/u	A214005	10465	55517-58-3	n/a n/a	270,2558803	270,4507	C17H3402	Fatty acyls; Fatty ac
11	396	RT34.71 RT34.71	RT34.71	n/a	e/u	e/u	n/a	n/a	n/a n/a	B/U	n/a	e/u	n/a
	327	Silane, trimethyl(octadecyloxy)- 1-Octadecanol	1-Octadecanol (TMS)	Stearyl alcohol	e/u	e/u	8221	112-92-5	n/a n/a	270,29	270,49	C18H38O	Fatty acyls; Fatty al
	262	RT34.96 RT34.96	RT34.96	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
	85	(Hydrocarbon) RT35.05 (Hydrocarbon)	RT35.05 (Hydrocarbo)	8/u (u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a	e/u	e/u	n/a	Hydrocarbons
	71	(Hydrocarbon) RT35.21 (Hydrocarbon)	RT35.21 (Hydrocarbol	e/u (u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons
	328	RT35.62 RT35.62	RT35.62	n/a	e/u	n/a	e/u	n/a	n/a n/a	n/a	n/a	B/U	n/a
	132	Octadecanoic acid, trimethylsilyl estel Octadecanoic acid	Octadecanoic acid (T	M: Octadecanoic acid; St	C01530	e/u	4692	18748-91-9	map00061Fatty acid biosy map00061 ma	p01( 284,2715	284,4772	C18H36O2	Fatty acyls; Fatty ac
100	188	RT35.80 RT35.80	RT35.80	n/a	n/a	e/u	n/a	e/u	n/a n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	207	Heptasiloxane, hexadecamethyl- Heptasiloxane, hexadec	came Heptasiloxane, hexad	ec (Contaminant)	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a
64	02	RT35.87 RT35.87	RT35.87	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	B/U	n/a	n/a	n/a

g.	ty aci			ty aci									ty aci		Carb			alour			
Chemical grou	Fatty acyls; Fat	Amino acids	n/a	Fatty acyls; Fat	n/a	n/a	n/a	Hydrocarbons	Hydrocarbons	n/a	n/a	n/a	Fatty acyls; Fat	n/a	Carbohydrates;	n/a	n/a	Nucleic acids,	n/a	Carbohydrates;	n/a
Molecular Formula	C18H34O2	C11H12N2O2	n/a	C18H36O2	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	C20H40O2	n/a	C6H17O21P5	n/a	C10H12N4O5	C10H13N504	n/a	C12H22O11	n/a
trage Molecular Mass (Da	282,4614	204,2252	n/a	284,4772	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	312,5304	n/a	580,0554	n/a	268,2261	267,2413	n/a	342,2965	n/a
onoisotopic mass Ave	282,25588	204,089878	n/a	284,27153	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	312,3028	n/a	579,895	n/a	268,0808	267,096754	n/a	342,116212	n/a
Abbreviated Biosynthe/Mo	map00061 map000	map00260 map00:	n/a	map00061 map01(	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	map01040	n/a	map00562 map01	n/a	map00230 map01	map00230 map04(	n/a	map00500 map02(	n/a
Biosynthetic pathway(s)	map00061Fatty acid biosy	map00260Glycine, serine	n/a	map00061Fatty acid biosy	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	map01040Biosynthesis of	n/a	map00562Inositol phosph	n/a	map00230Purine metabo	map00230Purine metabo	n/a	map00500Starch and suc	n/a
CAS Registry Numbe	112-80-1	73-22-3	e/u	57-11-4	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	55530-70-6	n/a	20298-95-7	n/a	n/a	58-61-7	e/u	99-20-7	e/u
Pubchem ID	445639	6305	n/a	5281	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	8660	e/u	439468	n/a	3588	60961	n/a	521102	n/a
Solm Metabolom	A222001	A223001	n/a	A225002	n/a	n/a	n/a	e/u	e/u	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	A284013	e/u	A274002	n/a
KEGG ID	C00712	C00078	n/a	C01530	n/a	n/a	n/a	n/a	e/u	n/a	n/a	n/a	C06425	n/a	C01284	n/a	C00294	C00212	e/u	C01083	e/u
Synonym(s)	(9Z)-Octadecenoic aci	L-Tryptophan; Tryptop	n/a	Octadecanoic acid; St	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	(Contaminant)	n/a	n/a	loosanoic acid; Eicosa	n/a	D-myo-Inositol 1,3,4,5	n/a	Inosine	Adenine nucleoside; /	n/a	alpha, alpha-Trehalos	n/a
Metabolites (Derivatives)	Oleic acid (TMS)	L-Tryptophan (3TMS)	RT36.29	Stearic acid (TMS)	RT36.99	RT37.42	RT37.73	RT38.04 (Hydrocarbon)	RT38.13 (Hydrocarbon)	Heptasiloxane, hexaded	RT38.79	RT39.44	Eicosanoic acid (TMS)	RT39.98	Myo-Inositol (7TMS)	RT 40.87	inosine (4TMS)	Adenosine (4TMS)	RT45.39	a-a-Trehalose (8TMS)	RT48.75
Metabolites (Common name)	Oleicacid	L-Tryptophan	RT36.29	Stearic acid	RT36.99	RT37.42	RT37.73	RT38.04 (Hydrocarbon)	RT38.13 (Hydrocarbon)	Heptasiloxane, hexadecame	RT38.79	RT39.44	Eicosanoic acid	RT39.98	Myo-Inositol	RT40.87	inosine	Adenosine	RT45.39	a-a-Trehalose	RT48.75
Metabolites (Raw)	Oleio acid, trimethylsilyl ester	L-Tryptophan, N.1-bis(trimethylsilyl)	RT36.29	Stearic acid, trimethylsilyl ester	RT36.99	RT37.42	RT37.73	RT38.04 (Hydrocarbon)	RT38.13 (Hydrocarbon)	Heptasiloxane, hexadecamethyl	RT38.79	RT39.44	Eicosanoic acid, trimethylsilyl ester	RT39.98	Myo-Inositol, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(trin	RT40.87	inosine, tetrakis(trimethylsilyl) ether	Adenosine-tetrakis(trimethylsilyl)-	RT45.39	a-a-Trehalose (8TMS)	RT48.75
Quant mass (m)	339	202	328	118	188	356	328	57	57	221	356	263	369	217	318	356	217	230	399	361 4	119
rerage RT (m)	35,92	36.26	36,29	36.40	36,99	37.42	37,73	38.04	38,13	38.42	38,79	39,44	39.71	39,98	40.07	40.87	42.34	43,28	45.39	45,57	48.75
AL	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201